

**ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ
РАСТЕНИЙ им. К.А.ТИМИРЯЗЕВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**



МАТЕРИАЛЫ

**Всероссийской научной конференции
с международным участием,
школы для молодых ученых**

«ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ И БИОТЕХНОЛОГИЯ: ИСТОРИЯ И ВЗГЛЯД В БУДУЩЕЕ»

**и Годичного собрания Общества
физиологов растений России**

(27 сентября – 1 октября 2021 г.)

Москва 2021г.

**Министерство науки и высшего образования РФ
Российская академия наук
Отделение биологических наук РАН
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
Общество физиологов растений России
Совет по экспериментальной биологии растений РАН
Биологический факультет Московского государственного
университета имени М.В. Ломоносова**

МАТЕРИАЛЫ

**Всероссийской научной конференции
с международным участием,
школы для молодых ученых**

«ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ И БИОТЕХНОЛОГИЯ: ИСТОРИЯ И ВЗГЛЯД В БУДУЩЕЕ»

**и Годичного собрания Общества
физиологов растений России**

(27 сентября – 1 октября 2021 г.)

Москва 2021г.

УДК 581.1
ББК 28.57

Всероссийская научная конференция с международным участием и школа для молодых ученых «Экспериментальная биология растений и биотехнология: история и взгляд в будущее». Годичное собрание общества физиологов растений России. Материалы докладов. (Москва, 27 сентября – 1 октября 2021г.) – Москва, 2021г. - 370 с.

В материалах Всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых ученых «Экспериментальная биология растений и биотехнология: история и взгляд в будущее», посвященных 130-летию ИФР РАН и 100-летию со дня рождения выдающегося ученого Р.Г. Бутенко, а так же годичного собрания общества физиологов растений России обсуждаются последние достижения в области физиологии, биохимии и экологии фотосинтеза, дыхания и фиксации азота, как теоретической основы продукционного процесса, а также вопросы регуляции экспрессии генома и трансдукции сигналов в процессах клеточной дифференцировки и онтогенеза растений. Рассматриваются адаптационные стратегии растений в связи с экологическими стрессами и глобальными биосферными явлениями. Особое место на конференции отводится биологии фототрофных и гетеротрофных клеток растений как основе развития инновационных биотехнологий. Для биохимиков, физиологов и молекулярных биологов растений, специалистов различных областей экспериментальной ботаники, фитобиологии и экологии.

Конференция проводится при поддержке гранта РНФ № 21-74-30003 и Мегагранта Правительства Российской Федерации, соглашение № 075-15-2019-1882.

Редакционная коллегия:

Д.А. Лось (отв. редактор), Вл. В. Кузнецов, А.В. Носов,
О.В. Антипина (отв. секретарь)

ISBN 978-5-4465-3388-6

СОДЕРЖАНИЕ

Вводный раздел	16
Институту физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН 130 лет	17
Раиса Георгиевна Бутенко – основатель нового раздела физиологии, цитологии и биотехнологии растений – биологии растительных клеток <i>in vitro</i>	18
Наука и личность – Р. Г. Бутенко	19
Слова благодарности	20
Раздел 1. Молекулярные и физиологические основы адаптации растений в связи с экологическими стрессами; Регуляция экспрессии генома в процессах клеточной дифференцировки и онтогенеза растений; Физиология, биохимия и экология фотосинтеза, дыхания и фиксации азота	21
Changes of the antioxidant system components in callus cells of <i>Rhodiola rosea</i> L. under the application of the natural biostimulator <i>Reglalg</i>	22
CRISPR-подобные элементы в плазидах и геноме митохондрий растений: возможные биологические функции	23
Effect of seed priming by endophytic <i>Bacillus subtilis</i> on growth and drought tolerance of <i>Triticum aestivum</i> L. cultivars of steppe Volga and forest-steppe West Siberian agroecological groups.....	24
Endophytic <i>Bacillus subtilis</i> -mediated salt stress tolerance in <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	25
<i>In silico</i> анализ промоторов генов, кодирующих апопластную инвертазу и сахарозосинтазу у березы повислой	26
JetGene – онлайн ресурс, позволяющий анализировать регуляторные области или нуклеотидные контексты у дифференциально транскрибируемых транскриптов растений	27
Stochastic fractals of biosynthesis of flavonoids are forming species-specific strange attractors	28
WOX5 поддерживает баланс в распределении ауксина между проксимальной и дистальной меристемами корня у <i>Arabidopsis thaliana</i> L.....	29
Адаптация сортов винограда Ирс и Преображение размноженных <i>in vitro</i> к условиям <i>ex vitro</i>	30
Адаптация фотосинтетического аппарата фотоморфогенетических мутантов томата типа <i>hp</i> к свету высокой интенсивности.....	31
Активация плазмалеммной H ⁺ -АТФазы при достижении порогового уровня оводненности прорастающими семенами <i>Vicia faba</i>	32
Активность про-/антиоксидантной системы в листьях световых и теневых растений <i>Plantago media</i> L.	33
Апоптотическая протеаза растений: возвращение в клетку	34
Аутофагические гены <i>ATG8</i> во мхах: идентификация и анализ активности	35
Биоинформатический анализ генов: Cu/Zn SOD, Mn SOD, Fe SOD и CAT гороха (<i>Pisum sativum</i> L.)	36
Биомеханические факторы в развитии растений	37
Биоэнергетическая оценка факторов окружающей среды в экологическом сортоиспытании.....	38
Быстрое накопление АБК в побегах и корнях растений пшеницы при засолении не связано с транспортом гормона.....	39
Взаимодействие активных форм кислорода и фитогормонов контролирует рост и развитие растений при абиотическом стрессе	40
Взаимодействие фитогормонов – индолилуксусной и абсцизовой кислот при прорастании семян злаков при нормальной и повышенной температурах	41
Взаимосвязанные роли липидов и каротиноидов в защите от фотоокислительного стресса	42

Взаимосвязь водного и газового обмена в растениях кукурузы в ходе адаптации к повышению концентрации углекислого газа в атмосфере	43
Влияние pH корневой среды на содержание органических кислот в листьях <i>Triticum aestivum</i> L. и <i>Secale cereale</i> L.	44
Влияние адаптеров морозостойчивости на активность РБФК озимой пшеницы.....	45
Влияние биомелиоранта на минеральное питание и продуктивность сельскохозяйственных растений	46
Влияние биопрепарата на основе силикатных бактерий на рост <i>Brassica napus</i> и <i>Phacelia tanacetifolia</i>	47
Влияние высоких концентраций CoCl_2 , Co(II) - и Co(III) ЭДТА на редокс-метаболизм и дыхание растений <i>Triticum aestivum</i> L.....	48
Влияние высоких температур на фотохимическую активность изолированных хлоропластов и накопление водорастворимых углеводов в листьях яровой пшеницы	49
Влияние высоких температур на функционирование «внешних» ротенон-нечувствительных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ в митохондриях из проростков яровой пшеницы	50
Влияние высокой концентрации CO_2 на солеустойчивость C_4 ксерогалофита <i>Kochia prostrata</i>	51
Влияние генотипа и влажности воздуха на тип роста стебля <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.	52
Влияние гистидина на накопление цинка и никеля у интактных растений разных популяций гипераккумулятора <i>Noccaea caerulescens</i>	53
Влияние грибов рода <i>Trichoderma</i> и психротолерантных бактерии штамма УОЗК2 на ростовые процессы и микрофлору прикорневой зоны <i>Secale cereal</i> L.....	54
Влияние засоления на динамику экспрессии генов липоксигеназного каскада <i>Solanum tuberosum</i> L.	55
Влияние избытка фотоассимилятов на формирование проводящих тканей ствола сосны обыкновенной.....	56
Влияние изменений pH среды на действие цитокининов на проростки инсерционных мутантов <i>Arabidopsis thaliana</i> по рецепторам цитокининов	57
Влияние инокуляции растений эндофитом <i>Cylindrocarpon magnusianum</i> на устойчивость к температурному стрессу.....	58
Влияние ионных жидкостей на основе оксикоричных кислот на устойчивость растений огурца (<i>Cucumis sativus</i> L.) к солевому стрессу	59
Влияние кадмия, меди и никеля на метаболитный профиль листьев <i>Betula pubescens</i>	60
Влияние карбоангидразы САНЗ на стабильность водоокисляющего комплекса фотосистемы 2 из <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	61
Влияние качества света на формирование адаптивных поверхностей базилика евгенольного (<i>Ocimum gratissimum</i> L.)	62
Влияние климатогеографических и генетических факторов на адаптационную способность <i>Pinus sylvestris</i> L.	63
Влияние лактон- и кетонсодержащих брассиностероидов на антиоксидантный статус растений при хлоридном засолении.....	64
Влияние марганца на содержание аскорбиновой кислоты в листьях растений ячменя	65
Влияние мелатонина на устойчивость огурца к действию засухи на начальных этапах онтогенеза.....	66
Влияние микрорельефа на выживаемость и рост саженцев <i>Picea abies</i> под пологом древостоя.....	67
Влияние минерального питания на показатели интенсивности продукционного процесса яровой пшеницы	68
Влияние наночастиц золота на морозостойчивость пшеницы	69
Влияние наночастиц оксида цинка и его макродисперсной формы на рост и систему антиоксидантной защиты <i>Hordeum vulgare</i> L.....	70
Влияние натурального биопрепарата Реглалг на фотосинтетическую деятельность растений груши.....	71
Влияние недостатка и избытка цинка на некоторые физиолого-биохимические показатели растений ячменя.....	72
Влияние немеханического изолирования микроспор на выход эмбрионных структур у озимой тритикале.....	73

Влияние нефтяного загрязнения на рост и эндомикоризу люцерны	74
Влияние низкой положительной температуры на антиоксидантную систему кукурузы.....	75
Влияние низкоинтенсивного переменного магнитного поля и гипертермии и их комбинирования на содержание супероксидного анион-радикала и гидроперекисей в высечках листьев гороха	76
Влияние низкотемпературной обработки на образование андроклиновых структур в культуре изолированных пыльников и формирование растений-регенерантов у озимой пшеницы сорта Иркутская	77
Влияние плазменно-радиоволновых обработок на эффективность образования клубеньков на корнях у растений клевера лугового (<i>Trifolium pratense</i> L.)	78
Влияние полиметаллического загрязнения почв на физиологические параметры <i>Poa pratensis</i>	79
Влияние предобработки мелатонином на растения <i>Hordeum vulgare</i> в условиях избыточного содержания ионов кадмия.....	80
Влияние предпосевной обработки семян БАВ на фотосинтетическую деятельность флаговых листьев пшеницы (<i>Triticum aestivum</i> L.).....	81
Влияние предпосевной обработки семян комплексными соединениями на адаптацию пшеницы к воздействию засухи	82
Влияние препаратов защитно-стимулирующего действия на содержание фотосинтетических пигментов и продуктивность зерновых культур	83
Влияние различных микроорганизмов на ответные реакции винограда на заражение милдью	84
Влияние света высокой интенсивности и УФ-В на содержание фотосинтетических пигментов и фотосинтетическую активность растений <i>Arabidopsis thaliana</i> дикого типа и мутантов, дефицитных по фитохромам А и В.....	85
Влияние сезонного снижения температуры на функциональное состояние РЦ ФС II в листьях <i>Avena sativa</i> L.	86
Влияние синтетических регуляторов роста на элементы антиоксидантной защиты растения картофеля	87
Влияние смены природных сезонов на процессы фотосинтеза в коре деревьев.....	88
Влияние содержания в почве лигносульфоната натрия на накопление минеральных элементов в листьях огурца.....	89
Влияние спектрального состава света на параметры газообмена и транспирации у проростков ячменя (<i>Hordeum vulgare</i> L.).....	90
Влияние спектрального состава света на фотосинтетическую активность и продуктивность растений салата <i>Lactuca sativa</i> L.	91
Влияние хлоридного засоления на анатомо-морфологическую характеристику клеток эпидермиса и паренхимы коры гипокотыля двух генотипов томата <i>in vitro</i>	92
Влияние холодной обработки на выход из покоя растений ясеня обыкновенного <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	93
Влияние частичной декапитации колоса главного побега растений озимой мягкой пшеницы на формирование зерновок с различными морфотипами зародыша	94
Влияние штамма <i>Pseudomonas</i> sp. GEOT18 – эндофита тубероидов <i>Dactylorhiza incarnata</i> (L.) Soó (Orchidaceae Juss.) – на ростовые процессы тест-объектов	95
Влияние экзогенного мелатонина на фотосинтетическую и антиоксидантную активность растений семейства <i>Solanacea</i>	96
Влияние экстремальных низких температур Полюса холода на липидный и жирнокислотный состав растений Якутии	97
Водорастворимые хлорофилл-связывающие белки (WSCP) высших растений: получение и фотохимические свойства	98
Выявление изменения рН цитоплазмы растений картофеля, трансформированных рН-сенсором Pt-GFP, при различных стрессовых воздействиях	99
Гены <i>CLE</i> в утолщении клубня и развитии флоэмы картофеля	100
Гены, определяющие карликовость арбуза <i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.) Matsum. & Nakai.....	101

Гибридные информационные войны в растительно-микробных сообществах	102
Гликирование белков растений в контексте онтогенетических изменений и экологических взаимодействий	103
Дегидрины в сезонном цикле хвойных растений в условиях криолитозоны	104
Действие экзогенного этилена на содержание полиаминов и УФ-В-устойчивость мутанта <i>spms1-1</i>	105
Динамика жирнокислотного состава фосфолипидов растений в условиях кратковременной гипоксии и среды CO ₂	106
Динамика роста и развития растений картофеля в условиях хлоридного засоления	107
Динамика роста: полисахаридный ансамбль растительных клеточных стенок	108
Динамика содержания фитогормонов и развитие функционального ответа при действии локального раздражителя.....	109
Дифференциальная экспрессия генов в популяциях растений из Чернобыльской зоны отчуждения	110
Зависимость действия мелатонина на уровень фотосинтетических пигментов у проростков <i>Lychnis chalconica</i> L. от спектрального состава света	111
Защитное действие оксида азота на рост и гормональный статус растений пшеницы в условиях засухи.....	112
Изменение протеома бактерий <i>Rhizobiumleguminosarum</i> под влиянием экзогенных конечных продуктов глубокогогликирования	113
Изменение размера светособирающей антенны ФС II – универсальный адаптационный механизм высших растений.....	114
Изменение содержания фитогормонов в растениях после аварии на Фукусимской и Чернобыльской АЭС.....	115
Изменение сценариев ксилогенеза у древесных растений: роль CLE-пептидов группы В и их рецепторов TDR	116
Изменение физиологических показателей <i>Spirodela polyrhiza</i> (L.) Schleid. при воздействии поверхностно-активными веществами	117
Изменения водного статуса и листовой поверхности сои <i>Glycine max</i> L. Merr. при водно-солевом стрессе.....	118
Изменения функционирования липоксигеназного каскада при типичных и латентных инфекциях, вызванных <i>Pectobacterium atrosepticum</i>	119
Изучение светозависимых процессов в растениях горчицы сарептской <i>Brassica juncea</i> (L.) Coss. в условиях комбинаторной светокультуры	120
Изучение сезонных особенностей переноса углерода в тканях лиственницы с помощью метода внесения ¹³ CO ₂ -метки в кроны взрослых деревьев в условиях многолетней мерзлоты	121
Индуктирование теплоустойчивости проростков пшеницы донором монооксида углерода, опосредованное активными формами кислорода	122
Использование пироксенитового продукта обогащения отходов добычи флогопита для фиторемедиации техногенной пустоши в Субарктике	123
Исследование аккумулирующей способности галофитных растений при загрязнении почвы Cu и Cd.....	124
Качественный состав и биологическая активность представителей рода <i>Thymus</i> L. Центральной и Северо-Восточной Якутии	125
Количественная характеристика клеток первого листа ячменя как модели для изучения онтогенетических изменений фотосинтетического аппарата	126
Колленхима – «темная лошадка» в царстве первичных клеточных стенок	127
Компоненты светового сигналинга регулируют биогенез и процессинг микроРНК у растений <i>A. thaliana</i> мутантных по генам фитохромов в условиях синего света	128
Короткий пептид AEDL модифицирует состояние хроматина в ядрах клеток регенерантов <i>Nicotiana tabacum</i> и регулирует экспрессию генов.....	129
Корреляции между клеточными параметрами роста корня и гаплоидным содержанием ДНК.....	130
Кортикулярный фотосинтез: структурные основы и биологические функции	131

Малые сигнальные пептиды в регуляции механизмов быстрого ветвления корневых систем.....	132
Меланизация лишайников: генетические детерминанты и биохимические характеристики	133
Мембранные антипортеры Na^+/H^+ в корневом клубеньке <i>Medicago truncatula</i>	134
Метаанализ ауксин-индуцированных транскриптомов выявил путь трансдукции сигнала ауксина к его PIN транспортерам	135
Метаболическая роль H_2O в репродуктивный период (от клетки до экосистемы)	136
Методологические аспекты молекулярной диагностики в семеноводстве картофеля.....	137
Механизмы защитного действия оксида азота на растения пшеницы.....	138
Механизмы потери устойчивости к обезвоживанию в растениях <i>Pisum sativum</i> L. при переходе от стадии семени к стадии проростка.....	139
Механизмы участия триплетного хлорофилла в фотоингибировании фотосистемы 2 высших растений	140
Микроморфологические и биохимические особенности перикарпиев <i>Malus domestica</i> Borkh. и его родительского вида <i>Malus orientalis</i> Uglitzk.	141
Моделирование пространственной структуры белков цитокининового метаболизма картофеля.....	142
Морфологические и функциональные изменения у растений при нарушении кальциевого гомеостаза	143
Накопление и распределение цинка у исключателей и гипераккумуляторов семейства Brassicaceae	144
Некоторые аспекты организации занятий малого практикума по физиологии растений при дистанционном обучении.....	145
Неоднородность изменений pH цитозоля клеток различных зон корня трансгенных растений <i>Nicotiana tabacum</i> L. в условиях засоления и засухи	146
О возможности применения экспресс-анализатора SPAD 502 Plus для определения содержания хлорофилла в листьях с признаками межжилкового хлороза.....	147
О роли интеграла дневного освещения в реакциях растений на круглосуточное освещение	148
Окислительный гомеостаз и антиоксидантный статус прорастающих семян гороха (<i>Pisum sativum</i> L.) и пшеницы (<i>Triticum aestivum</i> L.) в зависимости от дозы органического удобрения.....	149
Определение оптимальной по урожайности зерна риса дозы NPK с использованием макрокинетической модели по материалам микрополевого опыта.....	150
Оптические характеристики сортов пшеницы при почвенной засухе и дефиците азота	151
Особенности азотного обмена <i>Abies sibirica</i> Ledeb.....	152
Особенности влияния эндофитных бактерий <i>Bacillus subtilis</i> на содержание малонового диальдегида, как показателя окислительного стресса у растений горчицы белой под воздействием УФ-света.....	153
Особенности выбора референсных генов при оценке влияния на рапс <i>Brassica napus</i> L. действия стрессовых факторов.....	154
Особенности дистанционного обучения в Teams	155
Особенности организации учебной практики по физиологии растений в дистанционном режиме в РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева	156
Особенности синтеза, транспорта и инактивации ауксина при формировании узорчатой древесины карельской березы	157
Особенности функционирования антиоксидантной системы защиты яблони при высокотемпературном стрессе	158
Особенности экспрессии генов системы передачи сигнала цитокинина у <i>Picea abies</i>	159
От дизайна до научного анализа результатов эксперимента: выбор пути на основе Стандартов Лабораторных Исследований (Good Laboratory Practice, GLP)	160
Открытие процессов нефотохимического тушения в фотосинтезе отечественными учеными.....	161
Оценка уровня генетического разнообразия растений <i>Pinus sylvestris</i> на лесосеменной плантации (ЛСП) с использованием микросателлитных локусов	162
Оценка устойчивости растений семейства <i>Fabaceae</i> к условиям нефтяного загрязнения	163

Пигментный комплекс растений, произрастающих на побережье Белого моря в окрестностях поселков Кереть и Растьянаволоок.....	164
Потенциальная роль эндофитных бактерий как адаптогенов растений к действию ультрафиолетового света	165
Прайминг растений картофеля лактон- и кетон-содержащими брасиностероидами при последующем хлоридном засолении	166
Пренилирование белков в развитии таллома <i>Marchantia polymorpha</i>	167
Прогестероновая система гормональной регуляции у высших растений: характеристика основных компонентов и биологическая роль	168
Программа прорастания семян – от раннего эмбриогенеза до развития корня	169
Продукция этилена отделёнными листьями растений <i>Arabidopsis thaliana</i> дикого типа и этилен- нечувствительного мутанта <i>ein2-1</i> при действии синтетического ауксина – 2,4-Д.....	170
Пространственное распределение белков группы PIN1 при инициации бокового корня в апикальной меристеме родительского корня огурца (<i>Cucumis sativus</i>)	171
Протекторное действие 24-эпибрассилида при хлоридном засолении	172
Протекторное действие 24-эпибрассинолида на протеом проростков различающихся по засухоустойчивости сортов пшеницы в условиях прогрессивной засухи.....	173
Протекторное действие 24-эпибрассинолида на целостность мембран проростков пшеницы, подвергнутых обезвоживанию	174
Развитие боковых корней <i>Arabidopsis thaliana</i> L. на ювенильном этапе жизни растения	175
Развитие симбиотического клубенька бобовых растений: клеточные и молекулярные механизмы.....	176
Размножение подвоев косточковых плодовых культур ЛЦ-52 и Гизела-6 методом <i>in vitro</i>	177
Разработка CRISPR/Cas9 технологии редактирования генома для моделирования сроков колошения мягкой пшеницы (<i>Triticum aestivum</i> L.).....	178
Разработка генно-инженерных подходов для создания растений, устойчивых к вирусу оспы сливы (PPV).....	179
Разработка растительной экспрессионной системы наработки артемизинина с использованием методов синтетической биологии	180
Разрыв «Проблемы ФОТОСИНТЕЗА» на световые и темновые раздельные части ведет к экологической катастрофе и гибели Земной цивилизации	181
Растительные и животные эпоксиалкогольсинтазы	182
Реакция проростков тритикале на действие модельной (ПЭГ-6000) засухи	183
Реакция сосны обыкновенной на засуху и смену жизненного состояния по данным мониторинга водного режима в контрастные по экологическим условиям годы	184
Регуляторные коды 5' НТР высоко транслирующихся мРНК у <i>Arabidopsis thaliana</i>	185
Регуляторы соматического эмбриогенеза среди генов <i>NF-Y</i> у <i>Medicago truncatula</i>	186
Регуляция гидравлической проводимости и ее значение для адаптации растений к изменяющимся условиям обитания	187
Регуляция начальных этапов роста растений биологически активными веществами ксилотрофных грибов.....	188
Регуляция фитогормонами образования активных форм кислорода в митохондриях растений.....	189
Регуляция формирования растительных клеточных стенок	190
Регуляция фотосинтеза на уровне <i>Rubisco</i> высших растений (исторический аспект).....	191
Редокс-зависимое защелачивание апопласта и активность H^+ -АТФазы плазмалеммы клеток корней этиолированных проростков гороха	192
Рекальцитрантные семена с глубоким покоем: физиология, биохимия, особенности клеточной структуры.....	193
Репродуктивный статус растений как основа физиологической селекции (теоретические и прикладные аспекты).....	194

Роль АOX1a в модификации клеточных сигнальных путей в растениях <i>Arabidopsis thaliana</i> при повышенной инсоляции.....	195
Роль внешних факторов среды и внутренних параметров при моделировании фотосинтеза на уровне листа	196
Роль мелатонина в изменении экспрессии генов метаболизма и сигналинга цитокининов и АБК у <i>Arabidopsis thaliana</i> при фотоокислительном стрессе.....	197
Роль метаболических перестроек в механизмах адаптации растений амаранта к Cd и Zn стрессу	198
Роль природных стимуляторов в адаптации новых сортов хлопчатника к засолению почв	199
Роль сурфактина в индукции устойчивости растений картофеля против <i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say (Coleoptera: Chrysomelidae) эндофитным штаммом <i>Bacillus subtilis</i> 26Д	200
Роль ферментов АОС при альтернативном пути утилизации сахарозы у <i>Pinus sylvestris</i> L. с косослойной древесиной	201
Роль фуллеренола C ₆₀ в повышении устойчивости растений огурца к дефициту цинка и марганца	202
Ростовые процессы и формирование продуктивности новых раннеспелых и среднеранних гибридов кукурузы (<i>Zea mays</i> L.) при выращивании на зерно в агроклиматических условиях Калининградской области	203
Салициловая кислота и метилжасмонат как индукторы устойчивости растений пшеницы к низкой положительной температуре.....	204
Самонесовместимость S-РНКазного типа у петунии <i>Petunla hybrida</i>	205
Синтетические металлоорганические комплексы ингибируют фотохимическую активность фотосистемы 2 и активность карбоангидразы и глутатионредуктазы хлоропластов	206
Системы цифрового фенотипирования высших растений <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> на основе сверточных нейронных сетей	207
Современные образовательные технологии и их реализация как средство повышения качества подготовки бакалавров в курсе «Физиология и биохимия растений».....	208
Создание биолюминесцентных растений.....	209
Солнечные ячейки на основе тилакоидных мембран: эффект осмолитов	210
Сортовые особенности активности ферментов антиоксидантной системы в листьях <i>Rosa × hybrida hort</i>	211
Состояние антиоксидантной системы проростков тритикале как маркер морозоустойчивости	212
Сравнительная оценка некоторых физиологических процессов прутняка простертого при произрастании в аридных условиях Калмыкии в условиях культуры и естественных пастбищ.....	213
Сравнительная характеристика коры <i>Spiraea beauverdiana</i> Schneid (сем. Rosaceae Juss.) в условиях поствулканической активности вулкана Головнина (остров Кунашир, Южные Курильские острова).....	214
Сравнительное исследование процессов старения детерминированных и недетерминированных клубеньков бобовых растений	215
Сравнительное исследование эколого-физиологических особенностей фотосинтеза лиственницы Канады и Сибири	216
Сравнительный анализ белково-пептидных антимикробных пулов семян дикорастущих и культурных растений семейства Капустные (<i>Brassicaceae</i>) как фактор различной степени устойчивости к биотическим стрессовым факторам окружающей среды.....	217
Сравнительный анализ накопления GFP белка в листьях транспластомных и трансгенных растений табака <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Petit Havana.....	218
Стерильность пыльцы <i>Trifolium repens</i> и <i>Aquilegia vulgaris</i> из ближней зоны Чернобыльской АЭС.....	219
Стериновый компонент мембран растений галофитов	220
Стериновый статус генеративных особей <i>Dactylorhiza maculata</i> (L.) Soó (<i>Orchidaceae</i> Juss.).....	221
Структура и развитие интерфейса инфекционных нитей в бобово-ризобийном симбиозе.....	222
Структурные изменения флоэмы ствола <i>Betula ermanii</i> Cham. в условиях Южно-Сахалинского грязевого вулкана (о-в Сахалин)	223

Структурный базис адаптации и функции хлорофилла <i>f</i> в фотосистеме I.....	224
Тандемный вектор для анализа цис-регуляторных элементов в растениях	225
Тетранитрозильный комплекс железа с тиосульфатными лигандами предотвращает изменения жирнокислотного состава мембран митохондрий в условиях стресса.....	226
Трансгенные растения томата в фиторемедиации	227
Трансгенный табак с геном синтеза холиноксидазы приобретает повышенную толерантность к NaCl.....	228
Транскрипционные факторы-стимуляторы соматического эмбриогенеза у <i>Medicago truncatula</i>	229
Трансмембранный поток воды через аквапорины в условиях деструкции тубулинового цитоскелета у <i>Solanum tuberosum</i>	230
Удвоенная атмосферная концентрация CO ₂ смягчает негативное воздействие водного стресса на фотосинтез <i>Pisum sativum</i>	231
Универсальные стрессовые белки и их партнеры в регуляции прорастания <i>Arabidopsis thaliana</i>	232
Устойчивость сортов персика к стрессовым факторам юга России.....	233
Устойчивость ярового ячменя к абиотическим стрессам	234
Участие TOR/S6K1 сигнальной системы в регуляции экспрессии генов α-амилазы и прорастание зерна пшеницы	235
Участие белка мембранных нанодоменов AtFlot1 (At5g25250) в везикулярном трафике H ⁺ -АТФазы плазмалеммы и Na ⁺ -гомеостатировании клеток <i>Arabidopsis thaliana</i> в условиях солевого стресса	236
Участники соматического эмбриогенеза среди генов семейства WOX	237
Феномика растений: современное состояние проблемы и опыт фенотипирования модельных объектов	238
Фенотипические эффекты генетической трансформации тополя берлинского геном <i>AtGa20ox1</i>	239
Ферментативный характер дегидратазной карбоангидразной активности фотосистемы 2. Условия проявления, кинетика реакции.....	240
Физиолого-биохимические реакции растений <i>Nicotiana tabacum</i> на длительную обработку ионами Cu ²⁺	241
Физико-химические подходы в оценке защитных реакций растений (от клетки до экосистем)	242
Физиологические и молекулярные механизмы адаптации хвойных к засухе.....	243
Физиологические особенности ранних этапов прорастания у ели колючей	244
Физиологические реакции и аккумуляция селена растениями и почвенными грибами в ответ на селенит и нуль-валентный селен	245
Физиолого-биохимические параметры вечнозеленых видов семейства Oleaceae в условиях криостресса.....	246
Формирование агроценоза на основе мискантуса китайского (<i>Miscanthus sinensis</i>): аллелопатический аспект.....	247
Формирование урожая посевов риса и мониторинг их состояния.....	248
Фотопериодизм растений – 100 лет исследований его биологической природы	249
Фотосинтез и устойчивость к десикации у сортов риса дальневосточной селекции	250
Фотосинтетические пигменты: эволюция, функционирование и экология	251
Фуллеренол повышает устойчивость растений <i>Cucumis sativus</i> к недостатку цинка	252
Функциональная активность мха <i>Sphagnum. riparium</i> ов в ранневесенний период вегетации	253
Функциональная роль EST микросателлитных маркеров <i>Pinus sylvestris</i> L.....	254
Функционирование фотосинтетического аппарата томатов при фузариозном увядании.....	255
Характеристика фотосинтеза растений <i>Arabidopsis thaliana</i> , с нокаутом хлоропластной альфа-карбоангидразы 2	256
Хитиназа-подобные белки в корнях гороха, индуцируемые салициловой кислотой.....	257
Хроническое облучение приводит к изменению работы антиоксидантной системы популяций травянистых растений, произрастающих в зоне отчуждения ЧАЭС	258

Цветок лилии (<i>Lilium</i> L.): факторы развития и сохранения декоративных качеств	259
Цитогенетические исследования семенного потомства <i>Pinus sylvestris</i> L. в растительных сообществах Северо-запада России.....	260
Цитоскелет: логистика и полярный рост растительной клетки	261
Экологические факторы и водоудерживающая способность листьев <i>Helianthus annuus</i> L. в агроценозах степи	262
Экспрессия генов белков, ассоциированных с пластидной рнк-полимеразой бактериального типа (pap), регулируется участниками канонического пути передачи сигнала цитокинина	263
Экспрессия генов, кодирующих ферменты метаболизма и белки ответа на салициловую кислоту, в растениях пшеницы и риса при дефиците кислорода и последующей реаэрации	264
Электрические сигналы как механизм системного адаптационного ответа высших растений в нестабильных условиях окружающей среды.....	265
Этилен в прогамной фазе оплодотворения у петунии (<i>Petunia hybrida</i> L.)	266
Эффективность действия микробиологических препаратов на сельскохозяйственные виды растений в условиях Северо-Запада Российской Федерации	267
Эффективность использования азота, фосфора, света и воды на фотосинтез огурца при контрастных условиях питания и в присутствии лигносульфоната натрия в почве.....	268
Эффекты инокуляции растений картофеля <i>Streptomyces antimycoticus</i> 8A13	269
Раздел 2. Молекулярно-генетические основы разработки эффективных биотехнологий на основе культур клеток, тканей и органов высших растений, а также микроводорослей	270
CO ₂ -концентрирующие механизмы микроводорослей и цианобактерий: современное представление.....	271
Oleaginous TAGs and carotenoid synthesis by oleaginous microorganisms (bacteria, yeast, microalgae)	272
Биология развития и качественный состав культуры клеток <i>Drosera rotundifolia</i> L.	273
Биосенсорная индикация кетоза растительных тканей.....	274
Влияние 20E на рост и морфологию каллусной культуры <i>Lychnis chalconica</i> L. <i>in vitro</i>	275
Влияние активности антиоксидантных ферментов на процесс каллусообразования из почек <i>Pinus sylvestris</i>	276
Влияние двух ризосферных штаммов на микрорастения картофеля в условиях <i>in vitro</i> и <i>ex vitro</i>	277
Влияние липополисахаридов ризобактерий на морфогенетическую активность соматических каллусов пшеницы в культуре <i>in vitro</i>	278
Влияние облучения красным светом на эффективность введения в культуру <i>in vitro</i> растений с контрастной фотопериодической чувствительностью.....	279
Влияние стевииозидов на прорастание семян и морфологические особенности <i>Rhodiola rosea</i> в культуре <i>in vitro</i>	280
Влияние ферригидридов, допированных Co, Mn и Al, на индукцию каллусной культуры пшеницы.....	281
Влияние фитогормонов на каллусогенез <i>Artemisia jacutica</i> Drob.	282
Выявление протеинкиназной активности продукта гена <i>sl10005</i> (spkH) цианобактерии <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	283
Гены <i>CLE</i> в соматическом эмбриогенезе <i>Medicago truncatula</i>	284
Гетерологичная экспрессия АТФазы Р-типа микроводоросли <i>Dunaliella maritima</i> в клетках <i>Saccharomyces cerevisiae</i> и влияние различных сигнальных последовательностей на клеточную локализацию рекомбинантного белка.....	285
Динамика метаболома в процессе развития суспензионной культуры <i>Nicotiana tabacum</i>	286
Дифференциация и синтез фенольных соединений в каллусных и суспензионных культурах <i>Fagopyrum tataricum</i> (L.) Gaertn.	287
Изменение ультраструктуры зеленой водоросли <i>Trebouxia</i> , фикобионта лишайника <i>Hypogymnia physodes</i> , вследствие аэротехногенного загрязнения	288

Изменение фотосинтетической активности листьев винограда при различных концентрациях сахарозы в условиях <i>in vitro</i>	289
Изменения в накоплении фенольных соединений у культивируемых <i>in vitro</i> клеток чайного растения в присутствии L-фенилаланина и при воздействии высокой температуры	290
Изменения метаболизма зеленых микроводорослей как реакция на экологический стресс или комбинацию стрессов: использование стрессов в качестве индукторов продуктивности биомассы и внутриклеточного накопления синтезированных экономически значимых биомолекул	291
Изменения сигнальной системы ауксина при переходе к клубнеобразованию растений картофеля <i>Solanum tuberosum</i> L. <i>in vitro</i>	292
Изучение возможности применения керамического диффузора для аэрации питательных сред при глубинном культивировании растительных клеток	293
Изучение особенностей андрогенеза озимой пшеницы <i>Triticum aestivum</i> L. сорта «Иркутская» в культуре изолированных пыльников	294
Изучение роли генов MtWOX9-1, MtWOX11-like, STF и MtNF-YB10 в соматическом эмбриогенезе у люцерны	295
Изучение ростовых и биосинтетических характеристик каллусных и суспензионных культур клеток <i>Sutherlandia frutescens</i> (L.) R. Br. – лекарственного эндемика Южной Африки	296
Индукция соматического эмбриогенеза ели сибирской в культуре <i>in vitro</i>	297
Исключение кинетина из состава среды выращивания приводит к изменениям в профиле содержания тритерпеновых гликозидов в суспензионной культуре клеток женьшеня <i>Panax japonicus</i> var. <i>Repens</i>	298
Исследование ростовых и биосинтетических показателей суспензионной культуры клеток <i>Mandragora turcomanica</i> – эндемика Туркменистана и Ирана	299
Клональное микроразмножение и оценка адаптивной способности представителей рода <i>Amelanchier</i> Medik	300
Клональное микроразмножение марсиллии волосистой (<i>Marsilea hirsuta</i> L.) <i>in vitro</i>	301
Коинокуляция микрорастений картофеля в условиях <i>in vitro</i> ассоциативными рост-стимулирующими бактериями разных таксономических групп	302
Концентрации экзогенного этилена для адекватного ответа растений и культивируемых <i>in vitro</i> клеток	303
Культивирование <i>in vitro</i> глоссостигмы повойничковой (<i>Glossostigma elatinooides</i> (Benth.) Hook.f.)	304
Культура изолированных запасующих тканей – удобная модель для изучения синтеза и накопления запасных белков в семенах растений	305
Культура побегов <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni <i>in vitro</i> как перспективный источник натуральных низкокалорийных подсластителей – стевииол-гликозидов	306
Культуры клеток тиса <i>Taxus</i> spp. как продуценты дитерпеноидных таксоидов	307
Масс-спектрометрия как основа гипотезо-генерирующего подхода в изучении серин-треониновой протеинкиназы SpkH цианобактерии <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	308
Микроводоросли — будущие биофабрики полифосфатов?	309
Микроклональное размножение земляники	310
Микроклональное размножение сортов винограда Дагестана	311
Определение устойчивости трансгенных растений табака <i>in vitro</i>	312
Оптимизация технологии промышленного культивирования микроводорослей	313
Опыт использования TIS-технологий для клонального микроразмножения листовых древесных растений	314
Особенности культур бородатых корней ряда представителей рода <i>Scutellaria</i>	315
Особенности образования вторичных метаболитов в культурах клеток высших растений	316
Особенности распределения ассимилятов по органам растений сортов риса	317
Особенности регенерации листовенницы сибирской через соматический эмбриогенез в культуре <i>in vitro</i>	318

Особенности роста и накопления тритерпеновых гликозидов в суспензионных культурах клеток <i>Panax japonicus</i> (С.А. Meyer) var. <i>repens</i> и <i>Polyscias fruticosa</i> (L.) Harms	319
Особенности роста каллусных культур <i>Pinus sylvestris</i> в культуре <i>in vitro</i>	320
От цианобактерий до архепластид: функциональное многообразие и роль в эволюции РИ сигнальных белков-трансдукторов	321
Ответная реакция каллусной культуры <i>Linum grandiflorum</i> на действие элиситора биотической природы.....	322
Отработка промышленной биотехнологии получения целевых стероидных гликозидов с высокой биологической активностью на основе культур клеток <i>Dioscorea deltoidea</i> Wall.	323
Перспективы биотехнологии производства биотоплива на основе фототрофных микроорганизмов в Казахстане	324
Получение <i>in vitro</i> культур <i>Rhodiola quadrifida</i> как источника биологически активных веществ.....	325
Получение и характеристика каллусных и суспензионных культур клеток <i>Alcea kusjariensis</i> (Pjin ex Grossh.) Pjin — лекарственного эндемика Кавказского региона.....	326
Получение и характеристика каллусных культур клеток <i>Alhagi persarum</i> Boiss. et Buhse — продуцентов изофлавоноидов	327
Получение низкоагрегированной суспензионной культуры голубики щитковой с высоким уровнем накопления фенольных соединений.....	328
Получение фотосинтезирующих hairy roots водяного ореха <i>Trapa natans</i> L. методами агробактериальной трансформации и биобаллистики.....	329
Проблемы многолетнего круглогодичного культивирования <i>in vitro</i> земляники садовой.....	330
Разработка протокола создания гаплоидных форм <i>Beta vulgaris</i> L.	331
Разработка селективных условий <i>in vitro</i> для получения генотипов ячменя <i>Hordeum vulgare</i> L. с комплексной стрессоустойчивостью	332
Разработка технологии клонального микроразмножение тополя лавролистного (<i>Populus laurifolia</i> Ledeb.) в культуре <i>in vitro</i>	333
Растительно-бактериальные ассоциации в условиях осмотического стресса <i>in vitro</i>	334
Растительные системы экспрессии для получения рекомбинантных белков медицинского назначения	335
Реакция изолированных эксплантов нута на гормональный и минеральный состав среды	336
Реакция микроводорослей на недостаток минерального питания при аноксии.....	337
Регуляция продуктивности растений картофеля жасмоновой кислотой.....	338
Регуляция распределения углерода между крахмалом и нейтральными липидами у зеленых микроводорослей.....	339
Регуляция синтеза вторичных метаболитов в культуре <i>in vitro</i>	340
Роль AVR1 в регуляции работы H ⁺ -АТФазы плазмалеммы в клетках суспензионной культуры табака.....	341
Роль активных форм кислорода в регуляции взаимодействия растений картофеля с эндофитными микроорганизмами <i>B. subtilis</i> 26Д.....	342
Содержание метаболитов, обладающих фотозащитной и антиоксидантной активностью, в талломах представителей разных таксономических групп красных водорослей.....	343
Содержание фенолов и антиоксидантная активность экстрактов каллусов солодки.....	344
Суспензионная культура клеток табака как модель для изучения роста растяжением.....	345
Участие карбоангидразы САНЗ в функционировании фотосинтетического аппарата <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	346
Фенольные соединения в клеточных культурах растений: образование, регуляция, перспективы использования	347
Физиолого-биохимическая характеристика штамма <i>Chlorella</i> sp. IPPAS C-1210, перспективного продуцента липидов.....	348
Фотоморфогенез растений ежевики при клональном микроразмножении.....	349

Хроматографический анализ вторичных метаболитов <i>Chromochloris zofingiensis</i>	350
Цитофизиологические особенности суспензионных культур клеток <i>Dioscorea deltoidea</i> Wall.....	351
Экспериментальные лабораторные установки и полупромышленные фотобиореакторы закрытого типа для культивирования микроводорослей и цианобактерий.....	352
Эффект экзогенной индол-3-уксусной кислоты на окислительный статус регенерантов <i>Solanum tuberosum</i> L. сорта Луговской <i>in vitro</i> в условиях холодового стресса	353
Раздел 3. Сохранение биоразнообразия высших растений, микроводорослей и цианобактерий	354
Биотехнологические методы сохранения генофонда растений в коллекциях <i>in vitro</i>	355
Депонирование ценных генотипов эфиромасличных растений в культуре <i>in vitro</i>	356
Использование фонда коллекции микроводорослей и цианобактерий IPPAS для развития инновационных биотехнологий	357
К созданию коллекции каллусов дикорастущих растений Якутии.....	358
Криобанк Института физиологии растений Российской академии наук и восстановление растительного материала после длительного сохранения в жидком азоте	359
Культура <i>in vitro</i> как потенциальный метод восстановления древних растений из криосферы Земли	360
Подходы к сохранению генофонда рода <i>Syringa</i> L. в условиях <i>in vitro</i>	361
Развитие Всероссийской Коллекции Культур Клеток Высших Растений (ВККК ВР) как основы для фундаментальных исследований и биотехнологического производства фитопрепаратов.....	362
Именной указатель.....	363

ВВОДНЫЙ РАЗДЕЛ

Институту физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН 130 лет

Кузнецов Вл.В.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
vlkuzn@mail.ru

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук (ИФР РАН) берет свое начало от Кабинета (с лабораторией) по анатомии и физиологии растений Императорской академии наук, созданного в 1890 г. по инициативе академика Андрея Сергеевича Фаминцына (1835–1918) – основоположника отечественной физиологии растений и основателя Института физиологии растений. Кабинет по анатомии и физиологии растений в 1922 г. был преобразован в Лабораторию биохимии и физиологии растений, а в 1934 г. – в Институт физиологии растений АН СССР, которому в 1936 г. было присвоено имя К.А. Тимирязева. За 130-летнюю историю во главе Института стояли всемирно известные ученые академики А.С. Фаминцын (1890–1918), И.П. Бородин (1918), В.И. Палладин (1919–1922), С.П. Костычев (1922–1931), А.А. Рихтер (1932–1938), А.Н. Бах (1938–1946), Н.А. Максимов (1946–1952), А.Л. Курсанов (1952–1988). В течение трех последних десятилетий директорами ИФР РАН были академик А.Т. Мокроносов (1989–1997), чл.-корр. РАН Вл.В. Кузнецов (1997–2017) и чл.-корр. РАН Д.А. Лось (с 1997 г. по н.в.).

Институт внес выдающийся вклад в развитие мировой биологической науки. В стенах ИФР РАН были открыты вирусы (Д.И. Ивановский), доказана симбиотическая природа лишайников (А.С. Фаминцын), разработаны принципы хроматографического разделения веществ (М.С. Цвет), созданы основы экологической физиологии растений (Н.А. Максимов, И.И. Туманов, П.А. Генкель, Б.П. Строгонов), разработаны теория транспорта ассимилятов (А.Л. Курсанов) и теория гормонального развития растений (М.Х. Чайлахян), выполнены пионерские работы по культурам клеток высших растений и микродорослей и созданы основы фитобиотехнологий (Р.Г. Бутенко, В.Е. Семенов), сделан целый ряд других ярких научных открытий.

В настоящее время Институт проводит исследования и разработки по всем основным направлениям экспериментальной биологии растений (см. сайт <https://ippras.ru>). В работе используются как классические методы физиологии растений, так и новейшие подходы физико-химической биологии, включая методы биохимии, биофизики, молекулярной биологии, генетики, генетической и клеточной инженерии, биоинформатики. Ежегодно специалисты Института публикуют более сотни статей в ведущих зарубежных и отечественных научных журналах, монографии, учебники, получают патенты, участвуют с докладами в работе российских и международных симпозиумов, конференций и конгрессов. Проводимые исследования направлены на решение актуальных проблем фундаментальной науки, экологии, сельского хозяйства, биотехнологии и медицины.

Работы Института высоко оценены экспертным сообществом и тесно интегрированы в мировую науку. Институт участвует в реализации научных программ международного, федерального и муниципального уровней; исследования Института поддерживаются многочисленными грантами РФФИ и РФФИ. Сотрудники ИФР РАН имеют тесные научные контакты с университетами и институтами многих стран (Германии, Франции, Великобритании, США, Японии, Нидерландов и других). Институт не только поддерживает высокий научный уровень проводимых в стране исследований, но и способствует повышению престижа российской науки на международной арене.

ИФР РАН активно готовит научные кадры. Ежегодно в Институте проводят исследования студенты, аспиранты и стажеры. Ведущие ученые Института читают лекции в престижных университетах России (МГУ, ФИЗТЕХ, РГАУ-МСХА, ТГУ, РУДН, ННГУ и др.), издают учебники и учебные пособия для высшей школы. На базе Института успешно функционируют: научно-образовательный центр, филиалы кафедр физиологии растений МГУ и РГАУ-МСХА, кафедры физиологии растений и биотехнологии ТГУ, Совет по защитах кандидатских и докторских диссертаций.

Институт играет системообразующую роль в области физиологии и экспериментальной биологии растений, являясь крупным научно-организационным и координационным центром в России. С 1940 г. в Институте ежегодно проходят мемориальные Тимирязевские чтения, с 1993 г. – международные Чайлахяновские чтения, с 2002 г. – Курсановский семинар («Фундаментальные концепции биологии»), на которых обсуждаются глобальные проблемы современной биологической науки. На базе Института с 1954 г. издается журнал «Физиология растений», который превратился в широко известное международное научное издание (Russian Journal of Plant Physiology); функционируют Научный совет РАН по экспериментальной биологии растений, Президиум Центрального совета Общества физиологов растений России, которое организует съезды, симпозиумы и конференции в различных регионах России, регулярно выпускает бюллетень Общества; Институт возглавляет и организует работу Технического комитета Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии.

Раиса Георгиевна Бутенко – основатель нового раздела физиологии, цитологии и биотехнологии растений – биологии растительных клеток *in vitro*

Носов А.М.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова. Ленинские горы, 1, Москва, Россия.
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
al_nosov@mail.ru

Раиса Георгиевна Бутенко, член-корреспондент АН СССР (РАН), академик ВАСХНИЛ (РАСХН) – крупнейший ученый в области физиологии, цитологии и биотехнологии растений, основоположник работ по культурам клеток высших растений в СССР и в мире. Под ее руководством впервые в СССР были широко и систематически развернуты работы по изучению культур органов, тканей, клеток и протопластов высших растений. В результате исследований Р.Г. Бутенко и созданного ею коллектива был сформирован принципиально новый взгляд на культуру клеток высших растений – как уникальную, экспериментально созданную биологическую систему, не имеющую природных аналогов – популяцию соматических дедифференцированных растительных клеток.

Исследование этой биологической системы имеет неоспоримое фундаментальное значение, так как позволяет сопоставлять физиологические, цитологические, биохимические, генетические и молекулярно-биологические характеристики истинно дедифференцированных растительных клеток, не встречающихся в природных системах, со свойствами растительных клеток, входящих в состав различных тканей и органов интактных растений. Не менее важны прикладные аспекты работ с клетками *in vitro*, которые являются основой сельскохозяйственной и промышленной растительной биотехнологии, а также важным направлением системы сохранения растительного генофонда (биотехнологические коллекции).

Основные направления работ Р.Г. Бутенко:

1. Разработка методов получения, выращивания и всесторонней характеристики (морфологической, цитологической, генетической, биохимической) культур клеток, тканей и органов высших растений. Результатами этих работ явилось получение многих десятков каллусных и суспензионных культур клеток высших растений, исследования которых позволили сформировать основные представления об этой уникальной биологической системе.

2. Исследование процессов дифференциации клеток, морфогенеза и регенерации интактного растения в условиях *in vitro*. Приоритетным результатом этих работ было осуществление регенерации целого растения из отдельной изолированной клетки. Этими работами были заложены основы современной с/х биотехнологии – микрклонального размножения и оздоровления ценных культур и сортов с/х растений, клеточной селекции.

3. Изучение специфики морфологических, физиологических и генетических характеристик культур клеток высших растений. Приоритетным результатом этих работ явилось открытие (совместно со З.Б.Шапиной) генетической нестабильности клеток высших растений, культивируемых *in vitro*, и явления соматической вариабельности, что кардинально изменило взгляд на культуру клеток высших растений как биологическую систему

4. Исследование специфики образования биологически-активных веществ – вторичных метаболитов – в культурах клеток высших растений. Приоритетным результатом этих работ стало получение целого набора штаммов-продуцентов редких и исчезающих видов лекарственных растений (женьшень, диоскореи, родиолы, полисициаса, маральего корня и др.). Этими работами была заложена основа промышленной растительной биотехнологии – получение высококачественного возобновляемого растительного сырья для фармацевтики, косметологии, пищевой и ветеринарной промышленности. Первое в мире промышленное производство культур клеток высших растений (получение биомассы культуры клеток женьшеня настоящего, полученной Р.Г.Бутенко) было осуществлено в конце 70-х годов прошлого века на заводах Гламикробиопрома.

5. Получение и исследование характеристик изолированных протопластов, получаемых из культур клеток, а также разработка и осуществление процесса слияния изолированных протопластов, что явилось основой уникального метода соматической гибридизации. Результатом этих работ явилось официально зарегистрированное открытие «Явление двуродительского наследования генных детерминантперва цитоплазмы при парасексуальной гибридизации (слиянии) соматических клеток растений»

6. Исследование и разработка методов поддержания и хранения культур клеток, тканей и органов растений, в том числе при пониженных температурах и криосохранение при температуре жидкого азота. Результатом этих работ явилось создание Всероссийской Коллекции клеточных культур высших растений (ВКККР ВР) и одного из первых в мире Криобанков культур клеток и меристем высших растений.

По инициативе Р.Г. Бутенко во многих институтах разных городов СССР были созданы лаборатории по работам с культурами клеток и органов высших растений. Первая в мире конференция по этому направлению была проведена в Москве в 1968 году (первая аналогичная конференция за рубежом была организована двумя годами позже в Страсбурге). Российские конференции по культуре клеток высших растений и биотехнологии проводятся каждые 4–5 лет, обязательно в различных городах (юбилейная конференция была проведена в 2018 году в Минске), что, по убеждению Р.Г. Бутенко, способствует расширению работ по фундаментальным и прикладным направлениям изучения биологии растительной клетки *in vitro*.

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, Никитский спуск, 52, пгт Никита, Ялта, Россия.
al6749@mail.ru

Одно из наиболее кратких и емких определений сути научной деятельности – это искусство познания природы. Личности, сочетающие в себе талант первооткрывателей в познании природы с даром зажечь в сердцах учеников увлеченность этим искусством познания, закономерно становятся основателями научных школ. Такой неповторимой личностью была и навсегда останется в памяти учеников и последователей профессор, чл.-корр. АН СССР (РАН), академик ВАСХНИЛ Раиса Георгиевна Бутенко.

Научные достижения Р. Г. Бутенко многогранно представлены в публикациях профессоров З. Б. Шаминой и А. М. Носова. Данное сообщение – попытка отразить некоторые стороны научно-организационной и эмоциональной атмосферы, культивировавшейся в Отделе Р. Г. Бутенко.

Ровно 53 года тому назад в октябре 1968 г. перешагнул порог группы культур изолированных тканей и органов ИФР АН СССР студент, будущий биоинженер. Фантастическая коллекция каллусных тканей и суспензионных культур клеток различных растений, и личность молодой дбн завораживали. Симпатия оказалась взаимной. «Да, нам нужен биоинженер, Александр Хемович» – сказала Раиса Георгиевна.

Более 25 лет работы под руководством Р. Г. Бутенко, встречи и общение со многими выдающимися учеными СССР, России, Израиля и других стран в пятидесятилетней ретроспективе дает весомое понимание масштаба личности нашей наставницы. Прежде всего, это широта души простой русской женщины Бутенко (Трудовой) Раисы Георгиевны, которая, со свойственной ей прямоотой, порой говорила: «Я интеллигенция первого поколения». При этом особую благодарность выражала учителям, академикам П. М. Жуковскому, А. Л. Курсанову, М. Х. Чайлахяну.

Основой научной подготовки сотрудников была монография Р. Г. Бутенко: «Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений», изданная в 1964 г. и переведенная на английский язык в Израиле в 1968 г. Эта монография внесла большой вклад в подготовку ученых в области физиологии растений в СССР и многих зарубежных стран. Раиса Георгиевна давала пример поиска фундаментальных основ понимания явлений, искусству дискуссий и права на альтернативную точку зрения. Мы видели её кропотливый труд, упорство в преодолении проблем и добросовестность во всем. Первые уроки практической работы в стерильном боксе (ламинар боксы ещё не существовали) начинались с техники безопасности. Раиса Георгиевна учила нас умению отличать живые, делящиеся клетки от отмирающих. Понимание философской глубины этих уроков приходило значительно позже. Наша наставница неизменно проявляла взаимное уважение и талант видеть личности в совсем юных последователях. Каждый из нас, вероятно, помнит примеры личной заботы Раисы Георгиевны, которые особенно трогательно видятся через многие годы. В лаборатории всегда была особая творческая атмосфера, приветствовался интерес к научной фантастике, туризму. Много сил и таланта отдавала Раиса Георгиевна организации Всесоюзных и Международных конференций по биологии клетки и биотехнологии в научных центрах СССР и России с 1968 по 1993 гг. Эти конференции всегда были большим событием, поднимавшим на новый уровень научные исследования и кругозор участников. Важнейшим итогом научной и педагогической деятельности нашей наставницы было становление научных школ учеников. Особой гордостью Раисы Георгиевны и её школы является профессор Юрий Юрьевич Глеба, действительный член семи международных академий, основатель Института клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины (1990), а также основатель биотехнологических компаний Icon Genetics GmbH (1999) и Nomad Bioscience GmbH (2008).

Поддержку и гордость за укрепление авторитета российской научной школы выражала Раиса Георгиевна и другим своим ученикам. С 1974 по 1990 гг. автор этих строк разработал уникальные теоретические и прикладные методы оптимального выращивания клеток растений продуцентов ценных веществ в биореакторах и масштабирования этих процессов. В 1990–1994 гг. под руководством Р. Г. Бутенко мы осуществили пионерское по эффективности масштабирование клонального микроразмножения гладиолусов в биореакторах. С 1995 г. автор работал в Центре с-х исследований Волкани, Израиль. За первый год разработал и реализовал в Лаборатории Др. А. Перла клональное микроразмножение двух сортов винограда в биореакторах в многоциклическом режиме выращивания, заслужив благодарность наставницы. В последующие 20 лет внес существенный вклад в работу Центра по генетической трансформации цитрусовых, луковичных цветов и других исследований, укрепив авторитет российской научной школы.

Последние три года автор реализует свой опыт и знания в Отделе дбн С. В. Долгова, в выдающемся научно-образовательном и культурном центре России – Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН под руководством чл.-корр. РАН Юрия Владимировича Плугатаря.

Ключевые слова: Бутенко Р. Г.; научная школа; творческое познание; эффективное обучение.

Слова благодарности

Глеба Ю.Ю.

Nomad Bioscience, Halle/Munich, Germany.
gleba@nomadbioscience.com

Я благодарен судьбе за то, что в самом начале моей жизни, как ученого, моим руководителем кандидатской диссертации оказалась Раиса Георгиевна Бутенко. Я провел в Институте физиологии растений АН СССР им. Тимирязева в Москве более двух лет и сохранил теплые воспоминания о Раисе Георгиевне, как очень талантливом и чрезвычайно интересном человеке, полном глубоких идей и парадоксальных мыслей, выдающемся руководителе и организаторе научных школ, которые и сейчас определяют лицо физиологии растений в России, да и в других странах бывшего СССР. И для меня, и для моей будущей жены Долоресы Мартиновны Кежелите (Глеба), с которой мы познакомились во время работы в ИФР, годы, проведенные там, оказались началом интересного жизненного пути, а дружба со многими коллегами лаборатории окрасила всю последующую жизнь.

РАЗДЕЛ 1

Молекулярные и физиологические основы адаптации растений в связи с экологическими стрессами

Регуляция экспрессии генома в процессах клеточной дифференцировки и онтогенеза растений

Физиология, биохимия и экология фотосинтеза, дыхания и фиксации азота

Changes of the antioxidant system components in callus cells of *Rhodiola rosea* L. under the application of the natural biostimulator *Reglalg*

Caus M., Calugaru-Spataru T., Dascaluc A.

Institute of Genetics, Physiology and Plants Protection, Chisinau, Republic of Moldova.
mcausmcv@yahoo.com

Rhodiola rosea L. (golden root) is a perennial herbaceous plant, belonging to the Crassulaceae family. The native places of *R. rosea* distribution are regions of high altitudes in the Arctic and the mountainous areas of Central and North Europe, Asia and North America.

The roots and rhizomes of golden root are characterized by a lot of bioactive principles, due to which the plant is used for traditional and for the contemporary medicine. Bioactive compounds of the *Rhodiola rosea* are intensively used in the treatments of diverse illnesses and disorders, inclusive in cardiovascular diseases, maladies of the nervous and immune systems. To meet the huge needs for raw materials for the medicine requirements, the collection of plant materials from the natural habitats was carried out intensely and uncontrollably. This fact caused the danger of the extinction of the species in some areas of the wild natural populations, and therefore *R. rosea* is included in the Red Book. Due to the limited natural source for raw material alternative biotechnological approaches are undertaken to obtain valuable substances specific for golden root.

Plant cell culture of *R. rosea* cultivated *in vitro* represents an effective and promising method for the production of valuable biologically active compounds. Various physical and chemical factors are investigated to stimulate production of biomass and to improve quality of *R. rosea* callus cells cultivated *in vitro*.

The main objective of this study was to investigate the effectiveness of supplementing the Murashige-Skiew (MS) nutrient medium with various concentrations of the natural biostimulator (NB) *Reglalg* in relation to the formation of callus biomass and some of its antioxidant components. The total content of polyphenols compounds, including total content of flavonoids, total antioxidant activity, as well as the activity and isoenzyme spectrum of peroxidase (PO) and polyphenols oxidase (PFO) in callus cells extracts were determined.

The *R. rosea* L. callus tissue cultured on solid medium was used in the experiments. Callus used in the experiments, derived from the leaves of *in vitro* grown *Rhodiola rosea* originated from Carpathian Mountains (Ineu Massif, Romania). The callus of *R. rosea* L. was grown on solid MS nutrient medium (0.6%), containing 1.5mg / l BA, 0.5mg / l ANA (control) and supplemented with *Reglalg*, diluted with the cultivation medium in the ratio of 1/1000, 1/1200, 1/1400 and 1/1800 (experimental variants).

The results showed that the addition of *Reglalg* to the nutrient medium had a beneficial effect on the proliferation of *R. rosea* callus cells, and this effect depended on the concentration of the preparation in the culture medium. An increase of callus biomass accumulation was observed in all the experimental variants. The maximum value of the callus biomass accumulation was observed when cultivation medium was supplemented with *Reglalg* preparation in the 1/1000 dilution. In this variant, the percentage value of the growth index of the *R. rosea* L. callus biomass accumulation at 40 days after inoculation exceeded the control by 38%. Also in this variant the effects on the accumulation of total content of polyphenols compounds, including total content of flavonoids were most pronounced. Application of *Reglalg*, (1/1000 dilution) ensured the increase of the total content of polyphenols compounds by 44.9%, compared to the control. It should be noted that the values of the total content of phenolic compounds in the *R. rosea* L. callus cells correlated positively with those of their total antioxidant activity. A direct correlation ($r^2 = 0.9433$, $p \leq 0.01$) was revealed between the total antioxidant activity of the callus ethanol extracts and the total content of phenolic compounds in them.

Native PAGE analysis revealed several PO and PPO isoforms in callus cells extracts, localized mainly in three zones of the gels. In the control variant, the presence of PO and PPO isoforms in the upper part of the gels (zone III) was practically absent. While in experimental variants the activity and level of expression of PO and PPO isoforms of this zone were more prominent and depended on *Reglalg* concentration into the cultivation media. The highest level of expression of PO and PPO isoforms of the III gel zone was observed in callus cells grown on media with *Reglalg* dilution of 1/1000.

Investigation of the effects of *Reglalg* application in various dilutions on the accumulation of callus biomass, total content of phenolic compounds, including total content of flavonoids, and also on total antioxidant activity revealed that the highest values of the tested parameters are showed in the variant with adding into the MS culture medium of the *Reglalg* preparation diluted with the cultivation medium in the ratio of 1/1000.

Thus, the supplementation of MS cultivation media with *Reglalg* preparation at dilution 1/1000 represents an effective method for increasing content of antioxidant system components and their antioxidant activity that is very important for pharmacology and medicine.

CRISPR-подобные элементы в плазмидах и геноме митохондрий растений: возможные биологические функции

Константинов Ю.М. *, Петрушин И.С. **, Горбенко И.В. *

* Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН. Ул. Лермонтова, 132, Иркутск, Россия.

** Иркутский государственный университет. Ул. Карла Маркса, 1.

yukon@sifibr.irk.ru

Генетическая система митохондрий многих видов цветковых растений помимо высокомолекулярной ДНК (митохондриальной хромосомы) включает видоспецифические наборы линейных и кольцевых плазмид, биологическая роль которых до последнего времени остается не до конца изученной. Митохондриальные плазмиды обладают свойствами автономного репликона, но также в состоянии интегрироваться в митохондриальную хромосому, проявляя типичные свойства мобильных генетических элементов. Сравнительно недавно выдвинута и подкреплена экспериментальными данными гипотеза о влиянии линейных плазмид митохондрий на эволюцию последовательностей митохондриальной ДНК (Warren et al., 2016).

В связи с открытием у бактерий и архей CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated proteins) систем, выполняющих функцию адаптивного иммунитета, возникает вопрос, мог ли подобный механизм защиты от инфицирующей ДНК быть подхвачен эволюционным процессом и использован представителями эукариот, в частности, высшими растениями. В пользу правомочности такой постановки вопроса свидетельствует факт обнаружения единичного CRISPR-локуса в митохондриальной плазмиде *Vicia faba* (Mojica et al., 2000). Дальнейшего развития в направлении поиска CRISPR-кассет в митохондриальном геноме этого растительного вида данная работа, однако, не получила.

В настоящей работе мы обнаружили и детально охарактеризовали методами *in silico* многочисленные CRISPR-подобные локусы как в линейных и кольцевых плазмидах, так и в митохондриальном геноме у целого ряда растительных видов. Эволюционное происхождение в митогеномах CRISPR-подобных сайтов, таким образом, предположительно может быть связано с линейными плазмидами, которые наряду с чужеродной ДНК ядерного, хлоропластного, бактериального, вирусного и неизвестного происхождения обнаруживаются в составе митогеномов всех изученных в этом отношении видов высших растений. На основе анализа структурно-функциональных особенностей выявленных CRISPR-подобных локусов нами выдвинуто предположение о возможной биологической значимости данных элементов. Обосновывается гипотеза о мультифункциональной роли данных генетических элементов, состоящей в (i) поддержании динамического состояния митогенома путем событий интеграции линейных плазмид и (ii) защите от чужеродной ДНК (плазмид других видов, митовирусов, мобильных генетических элементов). В связи с тем, что, как известно, частота горизонтального переноса генов (ГПГ) в митохондрии значительно превышает таковую для ядерного и хлоропластного геномов, возникновение у высших растений генетического механизма противодействия избыточному ГПГ в митохондрии с эволюционной точки зрения представляется вполне оправданным. Ферментативные механизмы, обеспечивающие реализацию этих функций в растительных митохондриях, очевидно, существенно отличаются от функционирующих у бактерий и архей, и их обнаружение требует проведения специальных молекулярно-биологических исследований.

Effect of seed priming by endophytic *Bacillus subtilis* on growth and drought tolerance of *Triticum aestivum* L. cultivars of steppe Volga and forest-steppe West Siberian agroecological groups

*Lastochkina O.**, **, *Garshina D.***, *Pusenkova L.***, *Hafizova R.****, *Ivanov S.****

* Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences. Pr. Oktyabrya, 71, Ufa, Russia.

** Bashkir Research Institute of Agriculture – Subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences. R. Zorge Str., 19, Ufa, Russia.

*** Ufa Institute of Chemistry – Subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences. Pr. Oktyabrya, 69, Ufa, Russia.
oksanaibg@gmail.com

Drought is the most damaging abiotic stress factor, leading to inhibition of plant growth and limiting productivity of major agricultural crops, including wheat. Application of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* may be considered as bio-safe and eco-friendly strategy to cope with drought stress in plants. Here, we investigated the effect of seed priming by endophytic *B. subtilis* (strain 10-4) on growth, drought tolerance and endogenous salicylic acid (SA) of *Triticum aestivum* L. (wheat) cultivars with different drought stress adaptation strategies belonging to steppe Volga (cv. Saratovskaya-55 (S55), Ekada-70 (E70)) and forest-steppe West Siberian (cv. Omskaya-35 (O35), Salavat Yulaev (SY)) agroecological groups (ecotypes), representing, respectively, Volga and Western Siberia – the largest Russian regions for wheat production. It was discovered that the same strain of *B. subtilis* (10-4) in the same growth conditions exerts multidirectional effects on growth and drought tolerance of wheat cultivars belonging to steppe Volga and forest-steppe West Siberian ecotypes. Particularly, *B. subtilis* 10-4 promoted better germination of seeds, elongation of seedlings (roots and shoots), fresh and dry biomass accumulation of cv. S55 and E70 under normal and simulated drought (12% PEG-6000) conditions. In the opposite scenario, strain 10-4 had practically no effect (or in some cases even had an inhibitory effect) on the same growth parameters of wheat cv. O35 and SY were found. *B. subtilis* 10-4 increased the water holding capacity (WHC) of leaves of all tested plants under normal growth condition, however, the greatest responsiveness under drought stress for cv. S55 and E70 were observed. Also, under normal growth condition *B. subtilis* 10-4 increased (in different level) endogenous SA in all studied plants with the highest accumulation for cv. S55 and E70. The findings indicate the ability of *B. subtilis* 10-4 to influence on growth of different ecotypes' wheat plants has a correlation with *Bacillus*-induced changes in their leaf's WHC and in favor the participation of endogenous SA in the initiation of defense responses, especially for cv. E70 and S55 – representatives of steppe Volga agroecological group.

The reported study was funded by RFBR according to the research project № 19-016-00035.

Endophytic *Bacillus subtilis*-mediated salt stress tolerance in *Phaseolus vulgaris* L.

Lastochkina O.^{*,**}, Garshina D.^{*}, Pusenkova L.^{*}, Garipova S.^{*,***}, Allagulova Ch.^{**}, Fedorova K.^{**}

* Bashkir Research Institute of Agriculture – Subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences. R. Zorge Str., 19, Ufa, Russia.

** Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences. Pr. Oktyabrya, 71, Ufa, Russia.

*** Bashkir State University. Z. Validi Str., 32, Ufa, Russia.
oksanaibg@gmail.com

Salinity is a worldwide common abiotic stress factors leading to a significant decrease in plant yield/productivity and pose serious threats to agriculture and food security. Of particular interest to ameliorate damaging effects of salinity on plants is application of beneficial bacteria that can promote plant growth (PGPB – Plant Growth Promoting Bacteria), viz. *Bacillus subtilis* without causing adverse effect on host plants, environment and human health. In this work we studied the effect of endophytic *B. subtilis* (strains 10-4, 26D) on growth and biochemical traits of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) plants under non-saline (NaCl) and saline stress conditions. Our results revealed that seed priming by *B. subtilis* 10-4 and 26D significantly promoted the germination of seeds and plant growth (root and shoot lengths) under saline and non-saline conditions. The findings indicated *B. subtilis* 10-4 and 26D decreased stress-induced oxidative and osmotic stresses in plants. Particularly, bacterial inoculations reduced lipid peroxidation, non-enzymatic antioxidant ascorbic acid and osmoprotectant proline accumulation in plants under salinity. Also, it was found that 26D and especially 10-4 increased Chlorophyll (Chl) a and Chl b in leaves of bean under salt stress, while Carotenoids (Car) increased only for 10-4 and slightly decreased for 26D in comparison with non-inoculated control plants. Under non-saline conditions 10-4 and 26D practically had no effect on the amount of photosynthetic pigments Chl a and Car, while decreased Chl b content in the same plants was observed. It was discovered 10-4 and 26D significantly increased lignin accumulation in roots of plants both under non-saline and especially saline conditions, and the highest lignin content was observed for 10-4 under saline stress, indicating a major role of *B. subtilis*-induced strengthening the cell walls of the roots in the implementation by tested bacteria protective effects on bean plants under salinity. Thus, the findings indicate that endophytic *B. subtilis* 10-4 and 26D exerts protective effect on growth of bean plants under salinity by regulating these plant defense mechanisms and the major role in tolerance development may contribute the activation by *B. subtilis* lignin deposition in roots.

***In silico* анализ промоторов генов, кодирующих апопластную инвертазу и сахарозосинтазу у березы повислой**

Тарелкина Т.В., Галибина Н.А., Мощенская Ю.Л., Новицкая Л.Л.

Институт леса – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра "Карельский научный центр Российской академии наук".
Пушкинская ул., 11, Петрозаводск, Россия.
karelina.t.v@gmail.com

Работа является продолжением исследований по выявлению роли сахарозы в процессе формирования узорчатой древесины у формы березы повислой (*Betula pendula* Roth) – карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*). Ранее было установлено, что при образовании узорчатой древесины в тканях ствола существенно изменяется активность ферментов метаболизма сахарозы – сахарозосинтазы (СС) и апопластной инвертазы (АпИInv). Данные по уровню экспрессии генов, кодирующих СС (*SUS*) и АпИInv (*CWInv*), у других растений свидетельствуют о том, что регуляция активности ферментов осуществляется на уровне транскрипции. Учитывая вышесказанное, изучение регуляторных механизмов экспрессии генов, участвующих в углеводном обмене при разных сценариях ксилогенеза, представляет большой интерес с точки зрения управления продукционным процессом у древесных растений.

Поиск генов интереса проводили в геноме *Betula pendula*, опубликованном на портале CoGe. С этой целью в геномах *Arabidopsis thaliana* и *Populus trichocarpa* (базы данных TAIR и Phytozome) для генов *SUS* и *CWInv* были взяты нуклеотидные последовательности CDS и соответствующие им белковые последовательности. Их использовали в качестве поискового запроса BLAST по геному березы повислой для выявления гомологичных последовательностей. Предсказание структуры белков выполняли с использованием ресурса NCBI CDD. Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA 7. Множественное выравнивание последовательностей осуществляли с помощью алгоритма ClustalW. Филогенетическое древо было построено с использованием метода присоединения ближайшего соседа, оценку достоверности кластеризации проводили методом bootstrap с 1000 повторами. Для анализа методами биоинформатики были использованы промоторные области генов длиной 2000 пар нуклеотидов до старта транскрипции. Поиск *cis*-регуляторных элементов, расположенных в промоторах исследуемых генов, выполняли с помощью ресурсов NewPLACE и PlantPAN 3.0.

В геноме березы повислой было идентифицировано 4 гена *SUS* и 3 гена *CWInv*. По своей структуре и физическим свойствам предсказанные СС и АпИInv березы повислой соответствовали гомологичным белкам других растений. *In silico* анализ регуляторных *cis*-элементов, присутствующих в 2 Кб промоторной области исследованных генов, позволил выявить ряд мотивов, потенциально участвующих в регуляции их экспрессии. Наибольшей как по числу отдельных элементов, так и по их встречаемости была группа элементов, связанная с влиянием абиотических факторов, в основном, света и водного стресса. Также промоторы исследованных генов содержали большое количество тканеспецифичных мотивов. Анализ гормон-зависимых элементов показал, что формирование узорчатой древесины карельской березы, происходящее на фоне высокой активности апопластной инвертазы, очевидно, не связано с активацией генов *CWInv* высоким уровнем ауксина. Последнее коррелирует с нашими данными, свидетельствующими об интенсивной конъюгации ауксина в ходе ксилогенеза этого древесного растения. В исследованных последовательностях промоторов были выявлены различные элементы, указывающие на непосредственное влияние сигналинга сахаров. Представленные результаты могут быть использованы для выявления транскрипционных факторов, участвующих в регуляции альтернативных сценариев ксилогенеза.

Финансовое обеспечение исследования осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (Институт леса КарНЦ РАН) и при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-04-00622_a).

JetGene – онлайн ресурс, позволяющий анализировать регуляторные области или нуклеотидные контексты у дифференциально транскрибуемых транскриптов растений

*Садовская Н.С. *, Мустафаев О.Н. **, Тюрин А.А. *, Голденкова-Павлова И.В. **

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

** Институт генетических ресурсов Национальной академии наук Азербайджана, Баку, Азербайджан.
nataliya.sadovskaya@gmail.com, orkhan@bioset.org

На любой из стадий развития организма уровень мРНК и кодируемого ей белка зачастую не соответствуют друг другу. Это расхождение может увеличиваться за счет некоторых специфических условий, таких как тепловой шок, засуха, вариации светового режима и многих других факторов. В связи с этим изучение чувствительных механизмов трансляционного контроля, как одного из ключевых этапов регуляции экспрессии генов, является предметом скрупулезного внимания исследователей. Следует отметить, что различные регуляторные коды, содержащиеся в мРНК, могут определять судьбу любого транскрипта в процессе трансляции. Для обнаружения подобных регуляторных кодов в мРНК, а также выявление их влияния на трансляционную эффективность мы создали онлайн-ресурс JetGene (<https://jetgene.bioset.org/>), который содержит последовательности cDNA, CDS, 5'-UTR, 3'-UTR для представителей шести основных царств живых организмов, включая растения. Следует отметить, что информация о CDS и cDNA загружена с сервера Ensembl и регулярно обновляется. Созданный нами интернет-ресурс обладает широким набором утилит, которые позволяют сделать полноценный сравнительный анализ последовательностей, при минимальных временных затратах. JetGene дает возможность (i) оценить вариации длины, нуклеотидного состава, частоты использования кодонов, проанализировать GC-состав, CpG-острова, а также изучить окружение стартового кодона трансляции; (ii) выявить и определить статистически значимую представленность потенциальных регуляторных контекстов у мРНК с разной эффективностью трансляции. Необходимо подчеркнуть, что возможность проводить *in silico* анализ как полноразмерных, так и усеченных транскриптов, а также кодирующих/некодирующих областей транскриптов открывает дополнительные перспективы перед исследователями. Последовательности, выбранные пользователем в процессе работы, могут быть легко экстрагированы из JetGene в fasta-формате на каждом шаге работы. Графическая интерпретация результатов, сопровождаемая статистически обработанными количественными значениями, хорошо дополняет проведенный анализ. Кроме того, бета-версия JetGene (<https://beta.bioset.org>, находится на стадии разработки) дает возможность сравнить две выборки мРНК пользователя и, таким образом, применить omics данные для поиска и предсказания регуляторных детерминант трансляции.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ 18-14-00026.

Stochastic fractals of biosynthesis of flavonoids are forming species-specific strange attractors

Usmanov I.Y.U.* **, Shcherbakov A.V.* , Ivanov V.B.*

* Nizhnevartovsk State University. Nizhnevartovsk, Russia.

** Ufa State Petroleum Technical University. Ufa, Russia.
iskander.usmanov@mail.ru

The HPLC spectra of flavonoid chromatograms from the populations of *Juniperus sabina*, *Glycyrrhiza korshinskyi*, *Achillea millefolium* of the South Trans-Urals and cenopopulations of *Oxycoccus palustris*, *Chamaedaphne calyculata*, *Andromeda polifolia* oligotrophic bogs in Western Siberia were studied. Chromatograms of all types differed in the number of peaks, peak areas, and peak release times (compounds). Koch similarity coefficients were 0,08 and up to 0,14, which indicates a high degree of variety of chromatograms. Using a superposition method, a hierarchy of one, three, and 9 chromatograms was constructed. Next, a fractal analysis procedure was performed. It has been shown that the observed pattern in all studied species has the properties of a stochastic fractal. Thus, the variability of individual parameters is fractal in nature, which corresponds to the parameters of a strange attractor. Using the principal component method, we evaluated the position of individual arrays in the space of factors. During the analysis, this method evaluated the massifs of individual species, the total massifs for individual ecosystems, and the total sample. The complexes radically differ between species and for different ecosystems. Thus, species-specific populations of flavonoids and compounds with similar physicochemical properties are a distinct regional product.

ACKNOWLEDGMENTS: This work was supported by grants from the Russian Foundation for Basic Research (RFBR) No. 15-44-00028, RFBR 18-44-860006 r_a. and initiative scientific project No. 5.7590.2017 / BC of the Ministry of Education and Science of Russia.

WOX5 поддерживает баланс в распределении ауксина между проксимальной и дистальной меристемами корня у *Arabidopsis thaliana* L.

Савина М.С.* , Омелянчук Н.А.* , Пастернак Т.П.** , Миронова В.В.**** , Лавреха В.В.*

* Институт цитологии и генетики СО РАН пр-т , Коптюга 2, Новосибирск, Россия.

** Институт биологии II / Молекулярная физиология растений Фрайбургский университет, Фрайбург, Германия.

*** Отдел системной физиологии растений, Институт исследований водных ресурсов и водно-болотных угодий, Университет Радбауда, Нэймеген, Нидерланды.
vvl@bionet.nsc.ru

ВВЕДЕНИЕ

Апикальная меристема корня содержит нишу стволовых клеток, в которой покоящийся центр (ПЦ) способствует поддержанию соседних стволовых клеток (инициалей всех клеток корня). ПЦ разделяет митотически активные инициалы и их потомков на проксимальную и дистальную меристемы корня. Дистальная меристема состоит из стволовых клеток колумеллы (СКК), продуцирующих дочерние клетки (ДСКК), которые далее дифференцируются в клетки колумеллы (центральная часть корневого чехлика) (ДКК). Транскрипционный фактор WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX 5 (WOX5), экспрессируемый в ПЦ, контролирует самовоспроизведение ниши стволовых клеток. Максимум концентрации фитогормона ауксина расположен в ПЦ и необходим для поддержания инициалей, включая СКК, и для дифференцировки их потомков. Однако механизмы, лежащие в основе регуляции WOX5 функций стволовых клеток и их потомков, до конца не изучены. В своей работе мы демонстрируем, что WOX5 активирует первый этап биосинтеза ауксина, и это очень важно для стволовых клеток корня, поскольку изменение этой регуляции (например, в случае сверхэкспрессии WOX5) нарушает их обновление и дифференцировку (Savina et al., 2020).

МЕТОДЫ

Использовались четырехдневные проростки трансгенной линии 35S::WOX5-GR, выращенные при световом дне 12/8. Фиксация растений *A. thaliana* и окрашивание ДНК EdU (5-этил-2'-деоксиридин) и DAPI (4', 6-диамидино-2-фенилиндола) проводилось согласно протоколу Т. Пастернака (2015). Используя этот протокол и программный пакет iRoCS Toolbox для анализа изображений, мы проанализировали распределение ключевых событий клеточного цикла – репликации ДНК и митозов в кончиках корней линии 35S::WOX5-GR.

Мы создали одномерную гибридную математическую модель распределения ауксина в клетках колумеллы. В модели роста клеток, активный и пассивный транспорт ауксина между клетками и деградация веществ описываются непрерывными функциями, но переходы между состояниями клеточного цикла являются дискретными событиями, которые зависят от концентрации ауксина в клетке. Мы использовали программный пакет iRoCS для аннотации организации клеток корневого кончика в трех измерениях.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Мы показали, что в трансгенном растении со сверхэкспрессией 35S::WOX5-GR после обработки дексаметазоном (DEX) дочерние стволовые клетки колумеллы не проходят дифференцировку. В течение 48 часов после обработки DEX почти все ряды дифференцированных клеток колумеллы слушаются как клетки корневого чехлика, а мелкие клетки в разросшейся верхней части колумеллы не имеют гранул крахмала (т.е. не дифференцируются) и похожи на СКК дикого типа. Это означает, что потомки СКК, возникшие сразу после активации DEX экспрессии WOX5, не подвергаются дифференцировке, а продолжают активно делиться. В линиях со сверхэкспрессией WOX5 35S::WOX5-GR мы зарегистрировали изменения в опосредованном PIN белками активном транспорте ауксина и увеличение биосинтеза ауксина за счет активации фермента первой стадии этого процесса TAA1. С помощью математического моделирования, мы показали, что в 35S::WOX5-GR происходит перераспределение ауксина между проксимальной и дистальной меристемами корня.

Мы разработали одномерную вычислительную модель распределения ауксина в колумелле с ростом и делением клеток. Используя подход математического моделирования, мы показали, что WOX5-зависимая регуляция TAA1-опосредованного биосинтеза ауксина достаточна для воспроизведения всех других изменений, наблюдаемых в корнях растений 35S::WOX5-GR. Результаты численного моделирования воспроизводят фенотипы дикого типа и 35S::WOX5-GR.

В эксперименте показано, что обработка L-кинурином (конкурентным ингибитором активности TAA1) обеспечивает частичное восстановление фенотипа колумеллы дикого типа линии при сверхэкспрессии WOX5. Таким образом, мы можем заключить, что основная роль гена WOX5 в распределении ауксина – это модуляция TAA1-опосредованного биосинтеза ауксина. Наша модель предсказывает формирование пула митотически неактивных клеток за счет активного деления стволовых клеток колумеллы и дочерних стволовых клеток колумеллы, что было подтверждено анализом трехмерных изображений кончиков корней с отслеживанием событий клеточного цикла.

БЛАГОДАРНОСТИ.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (19-54-12013).

Адаптация сортов винограда Ирс и Преображение размноженных *in vitro* к условиям *ex vitro*

Батукаев А.А.* **, Собралиева Э.А.*

* Чеченский государственный университет, Шерипова ул.,32, Грозный, Россия.

** Чеченский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Ленина ул.1, Грозный, Россия.
batukaevmalik@mail.ru

Инновационные процессы питомниководства винограда, направленные на получение при помощи биотехнологий высококачественного посадочного материала, являются основой долговечности и рентабельности многолетних насаждений. На сегодняшний день микрклональное размножение является наиболее перспективным, быстрым и безопасным методом получения оздоровленного посадочного материала. В конце мая с интенсивно растущих побегов Ирс и Преображение срезали верхушечные побеги (2-4 глазка), стерилизовали, вычленили меристемы и сажали на питательную среду. Материал брали из коллекции экспериментального участка. Прижившиеся апикальные меристемы, через месяц после посадки, развились в кластер-побеги размерами 2...3 мм, которые были пересажены на питательную среду с изменением некоторых компонентов в питательной среде. Пересадку производили в биологические пробирки размером 40 x 120 мм. Использовали модифицированную питательную среду Мурасиге и Скуга. Как известно, критическим периодом для растений, полученных методом *in vitro*, является этап адаптации их к естественным почвенно-климатическим условиям.

Цель исследований – определение оптимального времени высадки под пленку микрорастений винограда, размноженных *in vitro*, для успешного их развития в естественных почвенно-климатических условиях. У исследуемых сортов винограда при посадке 20.03.19 длина прироста составила – 60 см (у сорта ИРС), 54 см (у сорта Преображение); вызревание – 51 см и 45 см соответственно сортам и приживаемость 63 % – ИРС и 61% – Преображение. При высадке в нестерильные условия 01.04.19 длина прироста в среднем у сорта ИРС была 70 см, у сорта Преображение на 4 см меньше; вызревание прироста составила 62 см – ИРС и 52 см – Преображение. Приживаемость у сорта ИРС на 6 % выше, у сорта Преображение на 2 % ниже, чем на первом варианте высадки растений. При высадке 10.04.19 средняя длина прироста у ИРС была 101 см, вызревание составило 79 см и приживаемость увеличилась до 95 %. Этот вариант отмечен, как самый оптимальный для вывода адаптированных на субстрате микрорастений винограда, полученных в условиях *in vitro* в условиях *in vivo*.

Таблица 1. Рост, развитие и приживаемость микрорастений винограда в зависимости от срока высадки под пленку.

Показатели	Варианты опыта		
	20.03.19	01.04.19	10.04.19
ИРС			
Длина прироста, см	60	70	101
Вызревание прироста, см	51	62	79
Приживаемость, %	63	69	95
Преображение			
Длина прироста, см	54	66	85
Вызревание прироста, см	45	52	69
Приживаемость, %	61	59	80

*Повторности – 3; n=15

Таким образом, оптимальное время для вывода микрклонов винограда сортов ИРС и Преображение *ex vitro* в условиях Чеченской Республики, является первая декада апреля (10 апреля).

**Адаптация фотосинтетического аппарата фотоморфогенетических мутантов томата
типа *hp* к свету высокой интенсивности**

Креславский В.Д.* , Пашковский П.П.** , Худякова А.Ю.* , Ашихмин А.А.*

* Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Институтская ул., 2, Пущино, Россия.

** Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
vkreslav@rambler.ru

Исследована связь процессов фотосинтеза, накопления пигментов (фотосинтетические пигменты, антоцианы, каротиноиды, фенольные соединения), а также экспрессия ключевых свето-регулируемых генов в листьях фотоморфогенетических мутантов растений *Solanum lycopersicum hp-1, hp-2, hp-1,2* при длительном действии света высокой интенсивности (СВИ, 2000 μmol квантов/ m^2s^{-1}). Мутант *hp-2* (LA3006) с дефицитом белка DET1 и мутанты *hp-1* (LA4012 и LA3538) с дефицитом белка DDB1 входят в CDD комплекс (COP10, DDB1, DET1), который вовлечен в протеосомальную деградацию факторов транскрипции, обеспечивающих положительную регуляцию фотоморфогенеза и связанных с накоплением пигментов. Эти мутанты суперпродуценты различных пигментов, однако, они крайне чувствительны к свету (Levin et al. 2006). В связи с этим исследовали адаптацию фотосинтетического аппарата *hp* мутантов к СВИ и содержание различных листовых пигментов.

СВИ вызывал снижение активности ФС2 у ДТ и всех мутантов после 72 ч облучения. Скорость фотосинтеза по мере облучения растений СВИ заметно снижалась у ДТ и всех мутантов, особенно у LA4012, однако у мутанта *hp-1,2* дефицитного по обоим белкам DDB1 и DET1 (LA0279) снижения скорости фотосинтеза не обнаружено. С другой стороны, только у мутанта LA4012 возрастало дыхание. Содержанием фенольных соединений у мутанта LA0279 как до, так и после 72 ч облучения был в 1.5 раза выше, чем у ДТ. Содержание каротиноидов через 72 ч облучения у LA0279 было выше, чем у ДТ на 20%. Исходно толщина листа была одинакова у мутантов и ДТ, но после 72 ч облучения этот параметр у LA0279 был в 1.34 раза выше, чем у ДТ, при этом наименьшая толщина листа была у мутанта LA4012. Более низкая адаптивная способность ФА мутанта LA4012 может быть обусловлена конститутивно повышенной экспрессией *PIF4, COP1*, генов негативных факторов фотоморфогенеза. Еще одной возможной причиной может быть изначально низкое содержание антоцианов в подэпидермальном слое и трихомах LA4012. По-видимому, повышенное содержание листовых пигментов и толщина листа являются важным фактором, определяющим высокий адаптивный потенциал ФА к СВИ, который был обнаружен у фотоморфогенетического мутанта *hp-1,2*. Эффективное ингибирование активности комплекса (COP10, DDB1, DET1) приводит не только к повышению содержания различных листовых пигментов, но и к устойчивости ФА растений к СВИ.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №20-04-00512А.

Активация плазмалеммной H^+ -АТФазы при достижении порогового уровня оводненности прорастающими семенами *Vicia faba*

Синькевич И.А.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук.
Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
sinkevich_ia@mail.ru

При прорастании семян важную роль играет механизм «кислого роста». Процесс «кислого роста» осуществляется с участием плазмалеммной H^+ -АТФазы, выносящей ионы H^+ из цитоплазмы в апопласт. Растяжение клеток при прорастании происходит в результате действия ионов H^+ на полимеры клеточной стенки, что приводит к разрыхлению ее структуры и повышению растяжимости. Таким образом, обеспечивается возможность растяжения клеток под давлением поступающей в клетку воды, т.е. начало прорастания. Семена *Vicia faba* относятся к ортодоксальному типу, они хранятся в сухом состоянии. Их прорастание осуществляется при достижении оптимальных условий водоснабжения. Проклевывание корешка у этих семян происходит только благодаря растяжению клеток зародышевой оси, тогда как их деления начинаются значительно позднее. Фермент плазмалеммная H^+ -АТФаза обнаружен в микросомальной фракции зародышевых осей семян бобов иммунохимическим методом наряду с 14-3-3 белками, которые способствуют активации H^+ -АТФазы. H^+ -АТФаза выявлена в осевых органах в процессе набухания, у проросших и растущих семян. Активность H^+ -АТФазы оценивали по выносу ионов H^+ в окружающий раствор и по гидролитической активности. Фермент активировался при достижении пороговой влажности 55% от сырого веса в зародышевых осях набухающих в течение 18 ч, что было показано в опытах с осмотиком ПЭГ-6000. Гидратация запускает активацию фермента, что обеспечивает быстрое и успешное прорастание семян. В период покоя зародыша H^+ -АТФаза находится в самоингибированном состоянии. Активность плазмалеммной H^+ -АТФазы усиливается при повышении уровня оводненности, благодаря взаимодействию фермента с 14-3-3 белками, а так же в присутствии специфического активатора –фузикокина. Фузикокин заметно стимулировал выделение ионов H^+ до и после достижения порогового уровня влажности. Рост зародышевой оси при прорастании семян может стимулировать ИУК и ингибировать АБК. Действие АБК (10^{-5} М) ингибировало активность фермента на 60-70%, как до, так и после его активации. АБК не действовала в более низких концентрациях (10^{-6} , 10^{-7} М). ИУК не оказывала существенного действия ни до, ни после достижения порогового уровня влажности в диапазоне концентраций 10^{-5} - 10^{-7} М.

Активность про-/антиоксидантной системы в листьях световых и теневых растений *Plantago media* L.

Силина Е.В., Табаленкова Г.Н., Головки Т.К.

Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук,
Коммунистическая ул., 28, Сыктывкар, Россия.
silina@ib.komisc.ru

В природе растения постоянно адаптируются к недостатку или к переизбытку световой энергии. Свет высокой интенсивности, особенно в сочетании с другими неблагоприятными факторами среды может служить причиной развития фотоокислительного стресса (ФОС) в результате избыточного образования активных форм кислорода (АФК). Устойчивость растительных организмов к ФОС во многом зависит от состояния систем детоксикации АФК, включающей антиоксидантные ферменты и низкомолекулярные соединения, и процессов энергодиссипации. Ранее было показано, что разные световые условия местообитаний растений *Plantago media* (подорожник средний), способствуют формированию фенотипов с устойчивым к фотоингибированию фотосинтетическим аппаратом. В местообитаниях с избыточным притоком прямой солнечной инсоляции в листьях активировались процессы нефотохимического тушения с участием зеаксантин-зависимого механизма диссипации энергии. В настоящей работе были исследованы компоненты про-/антиоксидантной системы растений *P. media*, произрастающих в условиях разного светового режима. Показано, что листья светового фенотипа, сформировавшегося в открытых местообитаниях с высоким уровнем освещенности, содержали в 1.2 раза больше пероксида водорода и продуктов липопероксидации. Этому соответствовал более высокий уровень активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, аскорбатпероксидазы) и аскорбат-глутатионового цикла. Выявили наличие суточной динамики исследуемых показателей. В большинстве случаев отмечали их возрастание в послеполуденные часы, что связано с сопряженным повышением освещенности и температуры воздуха. Полученные данные свидетельствуют о влиянии света на состояние про-/антиоксидантной системы листьев *P. media*. Усиление процессов липопероксидации и повышенное накопление прооксидантов указывают на более высокий уровень окислительного стресса в листьях световых растений. Смещение про-/антиоксидантного статуса в условиях высокой инсоляции, по-видимому, является стабильной характеристикой метаболизма световых растений, направленной на формирование устойчивости к световому фактору.

Апоптотическая протеаза растений: возвращение в клетку

Вартапетян А.Б., Трусова С.В., Теплова А.Д., Чичкова Н.В.

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Ленинские горы 1, Россия.
varta@belozersky.msu.ru

Протеолитические ферменты, обладающие высокой избирательностью и необычной (аспартатной) специфичностью гидролиза играют важную роль в осуществлении запрограммированной клеточной смерти у животных и растений. У растений таким ферментом является фитаспаза, участвующая в гибели клеток, вызванной биотическими и абиотическими стрессами. В здоровых тканях растений фитаспаза секретируется из клеток и накапливается в апопласте. Однако при стрессах, индуцирующих гибель клетки, фермент возвращается внутрь клетки, получая доступ к внутриклеточным белкам. Это – очень необычная стратегия поведения, ранее не описанная для растительных ферментов. Мы рассмотрим: как, почему и зачем фитаспаза возвращается в клетку растений при стрессе, насколько специфичен этот транспортный путь, и что произойдет с клеткой, если процесс ретроградного транспорта предотвратить.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-14-00010.

Аутофагические гены *ATG8* во мхах: идентификация и анализ активности

Мазина А.Б.^{* **}, Николаева М.А.^{*}, Минибаева Ф.В.^{* **}

* Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», ул. Лобачевского 2/31, Казань, 420111, Россия.

** Казанский (Приволжский) федеральный университет», ул. Кремлевская 18, Казань, 420008, Россия.
abmazina@gmail.com, mailto:mail@mail.ru

Аутофагия представляет собой процесс внутриклеточной деградации, необходимый для развития, дифференцировки и поддержания гомеостаза организма. В растениях роль аутофагии показана в онто- и органогенезе при формировании растительных тканей, например, при образовании аэренхимы и сосудов ксилемы, в процессах старения и программируемой гибели клеток. Макроаутофагия, наиболее изученная форма аутофагии, далее называемая аутофагией, управляется набором аутофагических (*ATG*) генов, консервативных для всех эукариот. Аутофагические белки осуществляют биогенез аутофагосом, сферических двумембранных структур, которые захватывают части цитоплазматического материала и доставляют их в литические компартменты для деградации.

Убиквитин подобный белок *ATG8* является надежным маркером аутофагии. Гены *ATG8* охарактеризованы у различных видов сосудистых растений. Напротив, в литературе практически отсутствует информация о характеристиках генов и белков *ATG8* в клетках бриофитов, в том числе мхов. Известно, что мхи являются одними из эволюционно древних наземных растений, обладающих удивительной стрессовой устойчивостью и способностью обитать на территориях с неблагоприятными климатическими условиями. В растениях аутофагия активируется при действии таких неблагоприятных факторов как голодание, затопление, засоление, засуха, инфицирование патогенами. В связи с этим, представляется актуальным изучение возможного вклада аутофагии в формирование высокой стрессовой устойчивости мхов.

В настоящей работе был проведен биоинформационный поиск генных последовательностей *ATG8* для бриофитов с использованием базы данных NCBI и Phytozome. С использованием праймеров, построенных на кодирующие домены *ATG8* мха *Physcomitrella patens* с использованием программы Vector NTI, проводилось клонирование *ATG8* для мхов *Dicranum scoparium*, *Pleurozium schreberi* и *Pylaisia polyantha*. Анализ структуры кодирующих и некодирующих доменов генов, выравнивание аминокислотных последовательностей и характеристика первичной структуры белков показали, что *ATG8* мха *D. scoparium* наиболее гомологичен *ATG8 P. patens*, а *ATG8* мхов *P. schreberi* и *P. polyantha* характеризуются меньшей гомологией с *ATG8 P. patens*. Были выявлены консервативные последовательности – убиквитиновый домен GABARAP и мотивы взаимодействия белка *ATG8* с лигандами (AIM-motifs, *ATG8*-interacting motifs), что подтверждает наличие характерных для этого белка механизмов активности по формированию аутофагосом. Показана активность генов *ATG8* во мхах в условиях абиотического стресса. Полученные данные свидетельствуют об универсальности маркерного аутофагического белка *ATG8* для сосудистых и несосудистых высших растений и открывают возможности использования *ATG8* мхов для повышения устойчивости стресс-чувствительных растений.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-04-00721.

Биоинформатический анализ генов: Cu/Zn SOD, Mn SOD, Fe SOD и CAT гороха (*Pisum sativum L.*)

Тарасов С.С. *, Веселов А.П. **, Крутова Е.К. *, Шестеркина И.А. *

* Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия. Гагарина пр., 97, Нижний Новгород, Россия.

** Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Гагарина пр., 23, Нижний Новгород, Россия.
tarasov_ss@mail.ru

Биоинформатический анализ в современной физиологии растений является важным и актуальным инструментом исследования. Его применяют и как не зависимый метод для создания *in silico* моделей и как неотъемлемая часть *in vitro* эксперимента. В настоящее время накоплена огромная информация о первичной структуре нуклеиновых кислот и белков. Определена полная нуклеотидная последовательность генома человека, огромного количества генов прокариот и вирусов, у растений расшифрован геном красной водоросли *Cyanidioschyzon merolae*, зелёной водоросли *Chlamidomonas reinhardtii*, мха *Physcomitrella patens*, однодольного растения *Oryza sativa*, двудольных растений: *Arabidopsis thaliana*, *Populus* sp., *Vitis* sp. В свободном доступе имеется ряд программ, позволяющих работать с нуклеотидными и аминокислотными последовательностями. Важными и наиболее изученными генами являются гены антиоксидантной защиты, в том числе кодирующие супероксиддисмутазу и каталазу. В геномных базах данных находится большой пул информации о данных генах, однако структурированного анализа в литературе не приводится. Особый интерес анализа генов антиоксидантной защиты представляется для культурных растений, активно задействованных в растениеводстве, в частности для гороха. В соответствии с этой целью нашей работы было провести биоинформатический анализ генов Cu/Zn SOD, Mn SOD, Fe SOD и CAT гороха.

Поиск нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили в базе данных NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Анализ изоформ иРНК и белка одного и того же гена проводили путём BLAST поиска исследуемого гена. Для выявления идентичных и вариативных участков иРНК и белка проводили попарное или множественное выравнивание всех изоформ иРНК и белков, для этого использовали сервис Crustal W в программе MEGA (<https://www.megasoftware.net/>).

Установлено, что горох не имеет изоформ Cu/Zn SOD, все представленные записи оказались идентичными по аминокислотной последовательности, однако нуклеотидная последовательность выявила отличия у 2-х иРНК, так триплет ТТА у записей под номерами: AB189165 и AB087845 был заменён на СТТ, которые кодируют одну и ту же аминокислоту – лейцин, что объясняется вырожденностью генетического кода. Аминокислотные последовательности Mn SOD имеют более выраженные отличия, так изоформа под номером AAA74442.1 имеет 2 фрагмента с делецией в 5 и 2 аминокислоты соответственно по сравнению с изоформой под номером САА42737.1. Анализ аминокислотных последовательностей Fe SOD гороха выявил, что в базе данных NCBI имеется только 2 записи о данном ферменте, при этом одна полная - САD42655.1, а вторая частичная - ААR05657.1. Их попарное выравнивание показало не существенное отличие в 2 аминокислоты, так у фермента под номером ААR05657.1 глутаминовая кислота заменена на лизин, а аспарагин, на тирозин. Аминокислотные последовательности САТ гороха представлены 2 записями: САА42736.1 и ВАН37035.1, отличие между ними не значительное, так 207 аминокислота первой изоформы – тирозин, заменена на серин, 208 – аспарагин на гистидин, 329 – метионин на изолейцин, 330 – лейцин на валин и 370 – триптофан на цистеин. Характер изоформ генов SOD и САТ говорит о меньшей изменчивости СОД, у каталазы замены локализованы преимущественно между центром и концами, что говорит о консервативности центрального и концевых участков данного фермента у гороха.

Биомеханические факторы в развитии растений

Горшкова Т.А., Петрова А.А., Чернова Т.Е., Козлова Л.В.

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук»,
Лобачевского 2/31, Казань, Россия.
gorshkova@kibb.knc.ru

Развитие растительного организма опирается на законы биомеханики, которые диктуют необходимость баланса напряжений, возникающих при формировании и функционировании различных тканей и клеток. Рассмотрение строения и развития растительного организма с точки зрения механики имеет давнюю историю, однако в последнее время развивается особенно бурно. Такое внимание обусловлено обнаружением детерминирующей роли напряжений, возникающих в растительных клетках, тканях или органах в процессах роста и морфогенеза, что особенно наглядно продемонстрировано на примере апикальных меристем (Hamant, Traas, 2010; Kierzkowski et al., 2012). Биомеханика растений в качестве основных «действующих лиц» рассматривает тургорное давление и свойства клеточных стенок. Изменения механических свойств клеточных стенок используются растениями для регуляции роста и формообразования как отдельных клеток, так и целых органов. Большинство работ посвящено либо тканям паренхимно-подобного типа с эластичной первичной клеточной стенкой, либо древесным растениям, в которых основную массу составляют жесткие вторичные клеточные стенки (Kierzkowski et al., 2012; Bidhendi, Geitmann, 2016; Thibaut, 2019). Между тем, в растительном организме важным компонентом всей биомеханической системы могут быть волокна, откладывающие третичную клеточную стенку, в ходе формирования которой активно, с помощью оригинального механизма создается натяжение микрофибрилл целлюлозы (Gorshkova et al., 2018). Такие волокна рассматривают как «мускулы» растений; их формирование – широко распространенный в растительном царстве феномен, который растения используют для решения различных задач. Развитие волокон с третичной клеточной стенкой – один из ключевых механизмов для перемещения в пространстве различных органов, иногда очень массивных, что чрезвычайно важно для растений, которые обычно характеризуются прикрепленным образом жизни и относительно неподвижны. Анализ механических свойств и анатомо-морфологических показателей различных участков стебля в ходе развития растений позволил нам оценить корреляции между соотношением различных тканей и развитием третичной клеточной стенки. Экспериментальные данные будут обобщены в докладе. Хотя механизмы, за счет которых реализуется участие биомеханических факторов в развитии растений, пока далеки от расшифровки, установление связи между биомеханическими параметрами и характером развития тканей внутри органов позволило обнаружить новые регуляторные взаимосвязи и подчеркнуть роль процессов самоорганизации формирующейся морфогенетической системы на основе баланса возникающих напряжений.

Bidhendi A.J., Geitmann A. (2016), Relating the mechanics of the primary plant cell wall to morphogenesis. *J Exp Bot.*, 67(2), 449-461.

Gorshkova T., Chernova T., Mokshina N., Ageeva M., Mikshina P. (2018). Plant ‘muscles’: fibers with a tertiary cell wall. *New Phytol.* 218, 66–72.

Hamant O, Traas J. (2010) The mechanics behind plant development // *New Phytol.* 185(2), 369-85.

Kierzkowski D., Nakayama N., Routier-Kierzkowska A-L. et al. (2012). Elastic domains regulate growth and organogenesis in the plant shoot apical meristem. *Science*, 335(6072), 1096-1099.

Thibaut B. (2019). Three-dimensional printing, muscles, and skeleton: mechanical functions of living wood. *J Exp Bot.*, 70 (14), 3453-3466.

Исследования проводятся при поддержке гранта РФФИ 19-14-00361.

Биоэнергетическая оценка факторов окружающей среды в экологическом сортоиспытании

Шелохова Н.А.

Агрофизический научно-исследовательский институт. Гражданский пр., 14, Санкт-Петербург, Россия.
batygin@mail.ru

Преобразование энергии света и питательных веществ исследуют на всех уровнях организации растений от молекулярного до биогеоценотического. Три конвертируемые энергии живой клетки – это способ использования энергии внешних ресурсов для совершения полезной работы. Полезная работа сельскохозяйственных растений – это максимально возможная продуктивность. В отличие от природных растительных сообществ биоэнергетическая производительность агрофитоценозов обусловлена не только и не столько общим накоплением биомассы, сколько производством биологически ценных веществ (углеводов, белков, жиров, витаминов). При низком выходе последних высокая биоэнергетическая производительность растений утрачивает значение.

Исследовали продуктивность растений картофеля *Solanum tuberosum* L. на территории Северо-Западного федерального округа (58°26'N-73°30'N, 27°45'E-66°10'E). Эксперименты вели по методике ускоренного экологического сортоиспытания (ЭСИ) Н.А. Лыковой пяти пунктах (Архангельской обл., Мурманской обл., Республике Карелии, Ленинградской обл. Калининградской обл.). Для каждого пункта по методике В.М. Володина были рассчитаны показатели ресурсно-экологической оценки среды: энергопотенциал почвы, энергия подвижных элементов почвы, энергия минеральных удобрений, энергия ФАР за вегетационный период. На основе этих показателей определяли энергопотенциал почвенно-климатических факторов (энергопотенциал среды) пунктов ЭСИ, оцениваемый в гДж/га. Оценивали зависимость урожайности от биоэнергетического потенциала почвы и фотосинтетически активной радиации.

При оценке энергетической ресурсообеспеченности в опытах с картофелем биоэнергетическая производительность агрофитоценозов на территории Северо-Запада РФ с доминирующим видом *S. tuberosum* зависела и от энергопотенциала ФАР, и от энергопотенциала почвы. В целом северные пункты характеризовались снижением энергопотенциала почвенно-климатических факторов из-за низкого значения ФАР за вегетационный период. Испытываемые сорта картофеля (Невский-ст., Белогорский, Елизавета, Петербургский, Чародей) имели высокие технологические качества и характеризовались хорошей устойчивостью к фитопатогенам.

Методами статистики определены значимое влияние энергии минеральных элементов почвы на урожайность товарную картофеля. С учётом основных характеристик почвенно-климатических условий при выражении их как энергетической составляющей агрофитоценоза было описано 82,8-95,4% изменчивости урожайности в зональном испытании картофеля в пяти пунктах. Факторы энергии подвижных элементов почвы и энергии ФАР (в гДж/га) определяли 8-23% и 2,3-10,3% изменчивости по признаку урожайности соответственно. Биоэнергетический потенциал этих факторов (в среднем по региону 9360 гДж/га) действовал на урожайность с низкой положительной достоверной корреляцией.

Растения с определённым генотипом могут реализовать потенциал продуктивности лишь в определённых границах среды. В неблагоприятных условиях внешней среды большая часть солнечной энергии расходуется не на биологические, и в частности фотосинтетические, процессы, а на физические — нагревание, испарение и т.д.

В агрофитоценозах, как и в других растительных сообществах, отмечается внутри- и межвидовая конкуренция. В фитоценозе конкурентные отношения складываются вследствие лимита ресурсов, таких как свет, вода и 15 неорганических элементов (N, C, K, P, Mg, S и т.д.). Основная конкуренция в природном растительном сообществе обусловлена недостатком света или азота. В случае моногенной среды (с одним лимитирующим фактором) в одной экологической нише могут сосуществовать разные виды растений или разновидности. При наличии двух лимитирующих факторов среды существует общая область потребления ресурсов, в которой могут сосуществовать несколько видов. При биоэнергетическом оценивании ресурсов агрофитоценоза лучше исключить существование сорных видов в посевах. Это и достигается применением, например, пестицидов.

В агрофитоценозах отмечается комплексное действие факторов внешней среды и их интегративность, что обуславливает специфичность региональных систем растениеводства, поскольку урожайность сельскохозяйственных растений является функцией их потенциальной продуктивности (то есть способности утилизировать ресурсы окружающей среды) и экологической устойчивости (способности противостоять абиотическим и биотическим стрессорам).

Биоэнергетическая оценка ресурсов продукционного процесса имеет значение, во-первых, для математического моделирования при оценке эффективности систем земледелия, во-вторых, для ресурсосбережения в растениеводстве, в-третьих, для сравнения энергопотенциала растений разных видов.

Быстрое накопление АБК в побегах и корнях растений пшеницы при засолении не связано с транспортом гормона

Иванов Р.С., Шарипова Г.В., Высоцкая Л.Б., Веселов Д.С.

Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, пр. Октября, 69, Уфа, Россия
ivanovirs@mail.ru

Локальные воздействия на корни или побеги сопровождаются изменением концентрации гормонов в ксилеме и флоэме, обеспечивая передачу сигналов по растению и адаптацию растений к условиям обитания. Так известно, что засуха повышает концентрацию абсцизовой кислоты (АБК) в ксилемном соке, приводя к снижению устьичной проводимости и экономии воды (Davies et al., 2005). Этот феномен объясняют повышением продукции АБК в подсыхающих корнях и ее загрузкой в ксилему. Вместе с тем, не все исследователи согласны с этой точкой зрения, и предполагается, что при стрессовых воздействиях АБК синтезируется в побеге, откуда она поступает в корни (Manzi et al., 2015). При кратковременном действии засоления нами было обнаружено быстрое (в течение 20 минут) накопление АБК в листьях растений ячменя (Fricke et al., 2004), что сопровождалось закрытием устьиц и снижением транспирации. Однако оставалось не известным, является ли такое быстрое накопление АБК при засолении результатом ее притока из корней. Получение ответа на этот вопрос стало целью данной работы.

Семена растений ячменя (*Triticum durum* Desf.) сорта Башкирская 27 проращивали на плотиках (связанные вместе полые запаянные стеклянные трубки) в течение трех дней в темноте на водопроводной воде и затем еще 4 дня – на 10% питательном растворе Хогланда-Арнона при освещенности 400 ммоль/(м² с), 14 часовом световом дне и температуре 24 ± 1°C. К питательному раствору семидневных растений добавляли хлорид натрия до концентрации 75 мМ и в течение 15-45 мин измеряли скорость транспирации. Через 15 и 45 мин после добавления соли, начинали сбор сока ксилемы и флоэмы, побегов и корней для экстракции АБК. Флоэмный сок собирали, как описано (Jiang et al., 2007): срезанные под водой побеги на 3 часа помещали в темноту в раствор 20мМ ЭДТА-Na₂, куда диффундировал флоэмный сок. Ксилемный сок собирали, как описано (Vysotskaya et al., 2010): отделяли побеги от корней под водой и соединяли их трубочкой, которая за 15 минут заполнялась ксилемным соком. Транспирацию оценивали гравиметрически – по потере веса стаканчиком с 100 мл питательного раствора и десятью проростками. Для предотвращения эвапотранспирации стаканчики с растениями закрывали фольгой. Водный потенциал листьев измеряли с помощью психрометра (PSYPRO, “Wescor”, США). АБК из побегов и корней экстрагировали 80% этанолом. Спиртовой экстракт отделяли центрифугированием и упаривали до водного остатка. Экстракцию АБК из водного остатка, а также из флоэмного и ксилемного сока проводили по модифицированной схеме, как описано (Veselov et al., 1992). Щелочной гидролиз связанных форм АБК в водном остатке после экстракции свободной АБК проводили при рН 11 в течение 120 минут, после чего проводили экстракцию, как описано выше. Содержание АБК определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа как описано (Veselov et al., 2018).

Уже через 15 минут после добавления соли в питательный раствор происходило снижение транспирации, что указывает на уменьшение устьичной проводимости в результате частичного закрытия устьиц. Эта реакция обеспечивала адаптацию растений к изменению доступности воды, которая снижалась в результате добавления соли в питательный раствор. Поскольку хорошо известна способность АБК закрывать устьица, важно было сопоставить изменение ее содержания в листьях со скоростью транспирации. Уже через 15 минут после добавления соли концентрация АБК в листьях возрастала в 2 раза по сравнению с контролем (растениями, которые оставались в не содержащем соли питательном растворе), и ее повышенный уровень сохранялся в течение последующих 30 мин. Накопление АБК в листьях способствовало закрытию устьиц и снижению транспирации. Через 15 минут после начала воздействия соли в корнях также было зарегистрировано повышенное содержание АБК (в полтора раза по сравнению с контролем). Однако в конце эксперимента (на 45ой минуте после начала воздействия соли) содержание гормона в корнях опускалось до уровня контроля. Можно было предположить, что снижение содержания АБК в корнях, зарегистрированное после его первоначального возрастания, было следствием экспорта гормона в побег. Однако в этом случае можно было ожидать увеличение концентрации АБК в ксилемном соке, а нами было обнаружено не повышение, а снижение этого показателя (на 25 % по сравнению с контролем через 15 минут солевого воздействия и в 2 раза – через 45 мин). Учитывая, что доставка гормона равна произведению концентрации на скорость транспирации, приток гормона из корней снижался под влиянием засоления в еще большей степени. По данным (Hartung, 2002), связанные формы АБК могут играть важную роль в транспорте гормона из корней в побег. Поэтому мы измерили концентрацию связанной АБК в ксилемном соке, и оказалось, что ее концентрация также снижалась. Таким образом, не подтвердилось предположение о том, что накопление АБК в листьях было следствием увеличения ее притока из корней. Стимулом для синтеза АБК в самих листьях при засолении могло быть зарегистрированное нами снижение водного потенциала листа в результате уменьшения притока воды из засоленного раствора. Мы также не обнаружили существенных изменений флоэмного транспорта АБК. Очевидно, такое кратковременное стрессовое воздействие приводило лишь к локальному изменению концентрации гормона.

Исследования были частично поддержаны грантом РФФИ №20-04-00305.

Взаимодействие активных форм кислорода и фитогормонов контролирует рост и развитие растений при абиотическом стрессе

Новикова Г.В., Миронов К.С., Зорина А.А., Фоменков А.А., Носов А.В.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
gv.novikova@mail.ru

В постоянно изменяющихся условиях внешней среды гибкая координация роста и развития растений обеспечивается благодаря быстрой и адекватной реакции на абиотические стрессоры. Представление о том, что наряду с фитогормонами – классическими регуляторами роста и развития растений – активные формы кислорода (АФК) могут быть универсальными сигнальными молекулами в растениях, способствующими акклиматизации при стрессе, широко признано. Показано, что генерация АФК – часть механизма регуляции роста и развития растений фитогормонами. Предполагается, что существует пространственная и временная регуляция производства и накопления АФК во время реализации различных программ развития растений и реакции на стресс, но специфика таких ответов остаётся слабо документированной.

Этилен – функционально универсальный регулятор физиологических процессов растений, в том числе, ответов на стресс. Продукция этилена, включая автокатализ, зависит от синтаз 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (ACS), активность которых дифференциально регулируется на транскрипционном и/или посттранскрипционном уровнях. Этилен стабилизирует также активность некоторых форм ACS посредством регуляции фосфорилирования этих белков при помощи MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE6 (MPK6) или путём воздействия на деградацию ACS по протеосомному пути посредством ETHYLENE OVERPRODUCER (ЕТО)/ЕТО-подобного белка. Рецептор этилена ETHYLENE RESPONSE1 (ETR1) образует высокомолекулярный комплекс с CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1 (CTR1), Raf-подобной MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE KINASE (MAPKKK) и ETHYLENE INSENSITIVE2 (EIN2) – критическим положительным регулятором передачи сигнала этилена. Связывание этилена с ETR1 вызывает конформационные изменения этого комплекса, что приводит к высвобождению и активации EIN2, который затем регулирует активность факторов транскрипции EIN3 и EIN-LIKE1 (EIL1), которые контролируют большинство ответов на этилен.

Накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что у растений АФК опосредуют различные этилен-индуцированные ответы. Например, у *Arabidopsis* этилен вызывает H₂O₂-зависимое движение устьиц, опосредует UV-B-индуцированное закрывание устьиц через пероксидаз-зависимую продукцию H₂O₂ у *Vicia faba*. Как экзогенные источники этилена, так и эндогенное увеличение синтеза этилена у мутантов *eto1* оказывают антагонистическое действие на индуцированное АБК движение устьиц. Этилен опосредует также эффекты озона, приводя к подавлению активности устьиц во время засухи. По-видимому, пространственно-временные изменения в производстве и накоплении АФК диктуют специфичность ответных реакций, позволяя различным путям сигнальной трансдукции действовать в соответствии с предполагаемыми триггерами и физиологическим статусом растений.

Совокупность молекулярных механизмов, при помощи которых этилен усиливает и регулирует производство АФК, ещё предстоит установить. В настоящее время показано, что этилен ингибирует функционирование CTR1, приводя к активации сигнального каскада, включающего MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE9 (MKK9) – MPK3/6. Более того, MPK6 фосфорилирует ETHYLENE RESPONSE FACTOR6 (ERF6), работа которого обеспечивает регуляцию транскрипции АФК-чувствительных генов. Индуцированные этиленом каскады MAPK могут регулировать продукцию АФК посредством активации транскрипции НАДФН оксидаз, кодируемых генами *RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG (RBOH)*.

Когда растения подвергаются воздействию внешних факторов, этилен и АФК могут вызывать либо окислительные повреждения, либо инициировать передачу воспринятого клетками сигнала, в том числе, редокс сигнала. Крайне информативным подходом для выявления редокс-регулируемых элементов сигналинга сейчас представляется анализ транскриптомов растений. Однако обнаруживаемые изменения мРНК могут быть результатом действия разных типов АФК, продолжительности и места их образования, а также зависеть от влияния АФК, образовавшихся в одном компартменте, на их накопление в других компартментах клетки. Эти ограничения могут быть преодолены при анализе белков, узнающих АФК и передающих полученную информацию, которая преобразуется в биологические ответы клеток. Сейчас принято считать, что интервенция АФК в работу многих сигнальных путей есть результат АФК-опосредуемых посттрансляционных модификаций сигнальных белков.

В докладе мы представим данные о том, как производство и передача сигналов АФК интегрирована с действием этилена в координированной регуляции роста растений и устойчивости к стрессу, рассмотрим перекрестные помехи (crosstalk) между АФК и передачей сигнала этилена, определив возможные точки реципрокного контроля, а также обсудим информацию о пунктах интеграции, которые включают MAPK.

Работа авторов проводится при частичной поддержке РФФИ (грант № 20-04-00757).

Взаимодействие фитогормонов – индолилуксусной и абсцизовой кислот при прорастании семян злаков при нормальной и повышенной температурах

Арабова Л.И., Чумикина Л.В., Топунов А.Ф.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Ленинский пр., 33, 2, Москва, Россия.

l.arabova@gmail.com

Общий рост и развитие растения регулируется сложными взаимодействиями между различными гормонами, что имеет большое значение на разных стадиях развития. Некоторые из ключевых аспектов роста растений включают развитие семян, прорастание и выживание растений в неблагоприятных условиях. Двумя ключевыми фитогормонами, регулирующими связанные физиологические процессы, являются индолил-3-уксусная кислота (ИУК) и абсцизовая кислота (АБК). Фитогормон абсцизовая кислота тормозит ростовые и метаболические процессы, способствует формированию и покою семян. Несмотря на связь с абиотическими стрессами, АБК имеет важное значение для нормального роста и развития растений. ИУК относится к группе фитогормонов стимулирующего типа – ауксином, веществам индольной природы, играет ключевую роль в регуляции роста и развития растений. Растения постоянно поддерживают баланс между уровнями ИУК и АБК на протяжении процессов развития, в том числе в неблагоприятных условиях окружающей среды.

В своей работе мы установили взаимосвязь между эндогенными уровнями АБК и ИУК на ранних стадиях прорастания (0-48 ч) семян пшеницы, ржи и тритикале (гибрид ржи и пшеницы) при нормальной и повышенной температурах. Показано, что в сухих зародышах присутствует АБК и ИУК, как в свободной, так и конъюгированной формах, но преобладали конъюгаты. В процессе набухания семян содержание ИУК резко уменьшалось к началу лаг-фазы (12 ч), практически не менялось до конца лаг-фазы (24 ч) и немного увеличивалось к началу роста проростка (48 ч). Лаг-фаза – очень важный этап прорастания зерна, когда продолжает увеличиваться скорость многих сложных метаболических процессов, таких, как образование проводящей ткани, новых митохондрий, новых ферментов, подготавливающих семена к прорастанию. Характер изменения содержания АБК был сходен с динамикой ИУК. Содержание АБК к началу роста было низким, что необходимо для нормального развития проростка. Резкое повышение температуры индуцировало быстрые изменения в гормональной системе. Так при коротком тепловом шоке (4 ч 40°C) в разные периоды набухания семян содержание как АБК, так и ИУК, было выше, чем при нормальной температуре до конца лаг-фазы. Так как на протяжении всего исследуемого периода одновременно изменялось содержание и АБК, и ИУК, то важно было оценить изменение баланса этих фитогормонов. Соотношение ИУК/АБК при нормальной температуре уменьшалось и практически не менялось до конца лаг-фазы. В точке активного роста проростка соотношение резко возрастало, что связано с увеличением содержания ИУК. При коротком тепловом шоке происходит увеличение содержания АБК и ИУК, при этом соотношение гормонов поддерживается на уровне, близком к уровню фитогормонов при нормальной температуре, что позволяет семенам преодолеть стресс. Установлена зависимость ростовых процессов от соотношения ИУК/АБК при коротком тепловом шоке. Показано, что процессы, связанные с прорастанием, более термочувствительны по сравнению с процессами в фазах физического набухания и роста проростка. Тритикале оказался термочувствительнее по сравнению с пшеницей. Таким образом, нами была показана взаимосвязь ИУК и АБК и определены конкретные временные точки взаимодействия этих гормонов на ранних стадиях развития злаков. Эти данные помогут в разработке стратегии генетического вмешательства в контроль роста при условиях абиотического стресса в будущих программах селекции сельскохозяйственных культур.

Взаимосвязанные роли липидов и каротиноидов в защите от фотоокислительного стресса

Соловченко А.Е.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. Ленинские горы, 1, Москва, Россия.
solovchenko@mail.bio.msu.ru

Все фототрофные организмы, от цианобактерий до высших растений, поддерживают баланс между световой энергией, поглощенной фотосинтетическим аппаратом, и способностью к ее полезной (фотохимической) утилизации. Невозможность поддержания этого баланса ведет к фотоокислительному стрессу, чреватому гибелью фототрофного организма. Для предотвращения «пресыщения» клетки световой энергией и борьбы с его последствиями фототрофные клетки приобрели в процессе эволюции широкий спектр фотозащитных механизмов. Их расшифровка важна как для фундаментального понимания адаптации фототрофов к неблагоприятным условиям, так и для практики растениеводства и культивирования микроводорослей-продуцентов. В этой связи фотозащитные механизмы неизменно находятся в центре внимания исследователей, и многое об их устройстве и функционировании уже известно.

Так, достаточно подробно описана связь фотозащитных механизмов с центральным метаболизмом клетки. Однако в последнее время в литературе появляется все больше фактов о новых связях между липидным метаболизмом фототрофной клетки, ее способностью противостоять фотоокислительному стрессу и абиотическим стрессорам вообще. Оказывается, что толерантность к свету высокой интенсивности, особенно в комбинации с другими неблагоприятными факторами, в значительной степени зависит от гибкости регуляции, «производительности» биосинтеза липидов и его координации с другими процессами, такими как биосинтез фотозащитных каротиноидов. Хотя отдельные аспекты и закономерности, связывающие липидный метаболизм и стресс-толерантность фототрофной клетки, обобщались, попыток синтеза целостной картины этих взаимосвязей у разных систематических групп фотосинтетиков, насколько известно авторам, не предпринималось.

Вначале даются многочисленные примеры и проводится анализ важной роли липидов как внутриклеточного депо для избытка энергии и фотоассимилятов (органического углерода), возникающего вследствие дисбаланса между световыми и темновыми реакциями фотосинтеза, а также реакциями центрального метаболизма клетки в неблагоприятных условиях. В качестве яркого примера приводится информация о роли липогенеза в акклимации симбиотических микроводорослей к сверхвысоким уровням экзогенного CO₂.

Особое внимание уделяется связи между жирнокислотным профилем мембранных липидов, биофизическими свойствами мембран и функционированием фотозащитных механизмов, основанных на тепловой диссипации (нефотохимическом тушении) поглощенной энергии света. Подчеркивается важность регуляции степени ненасыщенности жирных кислот в составе мембранных гликолипидов и гомеовискозной адаптации для «тонкой настройки» работы виолаксантинового цикла и перераспределения поглощенной световой энергии между фотосистемами.

Раскрывается взаимосвязь биосинтеза нейтральных ацилглицеринов и вторичных каротиноидов на разных моделях, от одноклеточных водорослей до высших растений. В докладе обобщаются и систематизируются накопленные к настоящему времени экспериментальные данные о значении липидного метаболизма для функционирования фотозащитных механизмов у разных групп фототрофных организмов. Подчеркивается универсальность взаимосвязей стресс-толерантности и биосинтеза липидов у всех групп фототрофов — от цианопрокариот до высших сухопутных растений. При этом выделяются особенности структурно-функциональной организации и субклеточной локализации этих механизмов у организмов с разными стратегиями выживания в неблагоприятных условиях. Сделан вывод о многогранной роли липидного метаболизма в организации «эшелонированной обороны» фототрофной клетки от воздействия чрезмерно интенсивного света и других неблагоприятных факторов среды.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования России (проект RFMEFI60419X0213).

Взаимосвязь водного и газового обмена в растениях кукурузы в ходе адаптации к повышению концентрации углекислого газа в атмосфере

Сулов М.А., Андреева И.Н.

Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН. Лобачевского ул., 2/31, Казань, Россия.
makscom87@mail.ru

Несмотря на продолжительную историю, исследования механизмов адаптации растений к повышению концентрации атмосферного углекислого газа не теряют своей актуальности. С одной стороны, актуальность подкрепляется прогнозируемым повышением концентрации CO_2 в атмосфере Земли в ходе глобального изменения климата. С другой стороны, существует потенциальная возможность увеличения продуктивности растений и их устойчивости к абиотическим стрессовым факторам при выращивании в условиях повышенного CO_2 , что было показано в различных исследованиях. Однако, положительные эффекты влияния CO_2 на растения часто имеют кратковременный характер, наблюдаются не на всех видах растений и зависят от действия многих параметров окружающей среды. Транспорт воды в растениях является одним из важных физиологических процессов, определяющих рост и продуктивность растений. В то же время известно, что повышение концентрации атмосферного CO_2 вызывает заметные изменения в работе гидравлической системы растения и одним из ключевых вопросов является вопрос о координации физиологических и молекулярных процессов в надземной и подземной частях растений в ходе адаптации гидравлической системы растений к повышению CO_2 . В связи с вышесказанным, в данной работе проведено исследование и сопоставление динамики газообмена в листовой зоне и динамики радиального водного переноса в корнях интактных растений кукурузы непосредственно при действии на растения повышенной концентрации атмосферного CO_2 800 ppm при контролируемых параметрах окружающей среды. Для этого был использован оригинальный методический и технический подход на базе техники ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля, сопряжённой с климатическими камерами для растений и газовой системой. Регистрацию параметров газообмена и водообмена проводили сразу после повышения концентрации CO_2 , через сутки, 7 суток и через 15 суток. Было показано, что снижение скорости транспирации после повышения концентрации CO_2 в листовой зоне растений кукурузы происходит заметно быстрее по сравнению со скоростью снижения интенсивности водного переноса в зоне всасывания корней. При этом скорость транспирации снижается в большей степени и не пропорционально снижению межклеточного водного переноса. Более детально была исследована роль аквапоринов в модуляции межклеточного водного переноса в корнях растений под действием повышенного уровня CO_2 . В частности, была исследована динамика активности и относительного уровня экспрессии аквапоринов цитоплазматической мембраны и тонопласта в клетках корней кукурузы из зоны всасывания при действии повышенного уровня CO_2 .

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00820.

Влияние pH корневой среды на содержание органических кислот в листьях *Triticum aestivum* L. и *Secale cereale* L.

Боталова К.И., Еремченко О.З.

Пермский государственный национальный исследовательский университет. Букирева, 15, Пермь, Россия.
botalova.ksyu@list.ru

В физиологической науке относительно мало исследований, посвященных взаимоотношениям между стрессовыми реакциями и процессами долговременной адаптации растений. Эта недостаточная изученность особенно очевидна в отношении проявлений кислотного и щелочного стрессов, с одной стороны, и адаптации к кислым и щелочным почвам, с другой стороны.

Цель нашей работы – изучить влияние кислой и щелочной корневой среды на содержание органических кислот в листьях пшеницы яровой и ржи озимой в условиях стресса и относительно долговременной адаптации.

На растения, выращенные на вермикулите, воздействовали растворами с pH 3 и pH 10; ответную реакцию растений изучали через 0,5, 3 и 24 ч после изменения реакции корневой среды. Относительно долговременную адаптацию изучали у растений, культивированных на почве, у которой кислую среду (pH=5,2) нейтрализовали известью (pH=7,3); ощелачивали содой (pH=8,4). Количество органических кислот изучали на 8-е сутки произрастания злаков. В опытах измерены высота и масса растений в 25-кратной повторности.

Водный экстракт органических кислот (яблочная, янтарная, щавелевая, лимонная) исследовали методом обращено-фазной высоко эффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовой детекцией (ОФ ВЭЖХ УФ) на приборе: «Dionex, Ultimate 3000» в 3-кратной биологической повторности. Значимость различий между вариантами оценили дисперсионным непараметрическим методом (критерий Крускал-Уоллиса); значимыми считали различия между сравниваемыми средними величинами с доверительной вероятностью 95% и выше ($P < 0,05$).

В результате изменения реакции корневой среды в растениях предположительно должны активизироваться механизмы биохимического pH-стата, в которых определенную роль играют превращения органических кислот, сопровождающиеся выделением или поглощением протонов. По нашим наблюдениям, у пшеницы в условиях кислотного стресса уменьшалось содержание исследуемых органических кислот. При щелочном стрессе у растений ржи во все сроки наблюдений отмечали снижение суммарного содержания органических кислот. Прослеженная нами тенденция к уменьшению суммарного содержания органических кислот в листьях злаков при стрессе может быть следствием нарушения окислительного дыхания. Яблочная, лимонная и янтарная кислоты являются участниками цикла Кребса, и изменение их содержания, по-видимому, обусловлено переходом на альтернативное дыхание.

Результаты эксперимента с разной реакции почвенной среды показали определенные отличия в количестве органических кислот у растений. На кислой почве в листьях обоих злаков отмечали тенденцию к уменьшению содержания органических кислот – участниц цикла Кребса. Это понижение содержания янтарной, лимонной, яблочной кислот в листьях растений на кислой почве может быть направлено на снижение количества H^+ . Одновременно в листьях ржи, выращенной на кислой почве, отмечено 3-кратное увеличение количества щавелевой кислоты по сравнению с растениями на нейтральной почве. Токсичность алюминия считают одним из основных факторов угнетения растений на кислых почвах, которая устраняется путем образования металлорганических комплексов с кислотами; в роли лигандов могут выступать оксалат, цитрат, малат.

В экспериментах на щелочной почве пшеница содержала больше яблочной и лимонной кислот, рожь – щавелевой, лимонной и янтарной кислот, по сравнению растениями на нейтральной почве. Эти данные по аккумуляции кислот в растениях на щелочной почве соответствуют результатам изучения стресса, вызванного растворами щелочных солей.

В условиях кислотного стресса рост и развитие злаков были подавлены в большей степени, чем при щелочном стрессе. Но при выращивании на кислой почве растения отличались повышенной высотой и массой, по сравнению с растениями на щелочной почве. Эта особенность ответных реакций растений в условиях относительно продолжительной адаптации обусловлена, по-видимому, комплексным воздействием почвы, у которой с разной величиной pH связаны физические свойства, микробиологическая активность, доступность питательных веществ и т.д. Проявились некоторые отличия у растений при изменении реакции корневой среды. От кратковременного изменения pH (стресс) в меньшей степени страдала пшеница, но при относительно долговременной адаптации повышенную устойчивость к кислой и щелочной почве проявила рожь.

Таким образом, результаты исследований по содержанию органических кислот в листьях злаков показали, что метаболизм органических кислот имеет важнейшее значение в условиях стресса и относительно продолжительной адаптации, вызванных изменением pH корневой среды. При кислотном и щелочном стрессе изменения в содержании органических кислот в растениях, по-видимому, связаны с переходом на альтернативный путь дыхания. В вариантах с выращиванием на кислой почве снижение содержания органических кислот в листьях злаков также может быть обусловлено энергетически затратным переключением реакций продуцирования протонов на реакции потребления H^+ . В варианте со щелочной почвой накопление органических кислот в листьях злаков, по-видимому, является адаптивной реакцией на поступление растворов с дефицитом протонов.

Влияние адаптеров морозоустойчивости на активность РБФК озимой пшеницы

Горьков А.А. **, Павловская Н.Е.* , Горькова И.В.* , Матулкин Д.К.**

* ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина»,
Генерала Родина, 69, Орел, Россия.

** ФГБНУ «Федеральный научный центр зернобобовых и крупяных культур», Молодежная, 10,
п. Стрелецкий, Орловская область, Россия.
aleksey555.zbk@gmail.com

Холод обычно предшествует замораживанию в природе и вызывает многие физиологические и биохимические изменения в клетках устойчивых к замораживанию видов растений, которые позволяют им выживать в неблагоприятных условиях. Низкая температура влияет на поглощение воды и питательных веществ, текучесть мембраны и конформацию белка и нуклеиновой кислоты, а также оказывает сильное влияние на клеточный метаболизм либо непосредственно за счет снижения скорости биохимических реакций, либо косвенно путем крупномасштабного перепрограммирования экспрессии генов. Низкотемпературные стрессы оказывают отрицательное воздействие на метаболизм растений, вызывая нарушение клеточного гомеостаза и основных физиологических процессов, приводящее к ускоренному образованию свободных радикалов на основе кислорода. Эти радикалы представляют собой токсичные молекулы, способные нарушать функцию клеток, и могут даже нанести достаточный ущерб, приводящий к гибели клеток. Хлоропласты очень чувствительны к повреждению реакционноспособными видами кислорода (ROS), которые образуются в результате реакции хлоропласта O_2 и электронов, которые выходят из фотосинтетической системы переноса электронов. Клетки обладают антиоксидантами и антиоксидантными ферментами, способными прерывать каскады неконтролируемого окисления в клеточных органеллах. Окислительный стресс возникает из-за дисбаланса между образованием ROS и их нейтрализацией антиоксидантами. Различные процессы нарушают этот баланс, увеличивая образование свободных радикалов по отношению к имеющимся антиоксидантам. В оптимальных условиях для роста ROS производятся на низком уровне, но во время стресса их скорость производства значительно возрастает. Таким образом, накопление ферментов и метаболитов, которые совместно очищают ROS, является важной частью процесса низкотемпературной акклиматизации. Антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота и глутатион, и ROS-продуцирующие ферменты, такие как супероксиддисмутаза (SOD), пероксид аскорбиновой кислоты (APX), каталаза (CAT), глутатионпероксид (GPX) и пероксиредоксин (PrxR), участвуют в стрессовом удалении ROS.

Устойчивость растения к морозостойкости связана с повышением фотосинтетической активности при холодной акклиматизации, т.к. процессы фотосинтеза обычно оказываются первыми, на которые влияют изменения температуры. В растениях, подвергнутых воздействию низких температур было показано, что Рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза (РБФК, Рубиско, КФ 4.1.1.39) является ферментом первой основной стадии фиксации углерода и превращением растениями в глюкозу. Поскольку продуктивность фотосинтеза определяется прежде всего активностью РБФК, то в первую очередь было изучено влияние адаптеров морозоустойчивости на данный признак. Активность фермента КФ 4.1.1.39 определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм с использованием НАДФ·Н в качестве кофактора реакции. Активность фермента за 5 минут в мкмоль находили по формуле $E = D \cdot V / 6,22$. Изучение активности Рубиско у устойчивых и восприимчивых к холоду сортов озимой пшеницы показало, что у сортов с зимостойкостью 4-5 баллов активность фермента выше в 1,2 раза, чем у сортов с зимостойкостью 2-4 балла. Под влиянием адаптеров морозоустойчивости - биопрепаратов на основе лектинов сои и биофлавоноидов гречихи происходит увеличение активности КФ 4.1.1.39. Так, обработка семян биопрепаратом с действующим веществом лектины сои (патент на изобретение RU 2372763 С1, 20.11.2009) способствует росту активности Рубиско с 5 по 7 сутки на 0,08 мкмоль/день, с 7 по 11 сутки на 0,05 мкмоль/день, в то время как в контрольных образцах без обработки наблюдается усиление активности Рубиско на 0,07 и 0,02 мкмоль/день за те же периоды роста. При обработке семян биопрепаратом с действующим веществом биофлавоноиды гречихи (патент на изобретение RU 2463759 С1, 20.10.2012) активность Рубиско увеличивается к контролю на 0,3 мкмоль на пятые сутки, что в 1,8 раз контроля и остается высокой на всем изучаемом периоде, к 11 суткам в обработанных образцах пшеницы активность фермента выше в 2 раза к контрольным образцам, в то время как в образцах, обработанных биопрепаратом на основе лектинов сои активность фермента на 11 сутки в 1,5 раза выше. Динамика по суткам роста такова: с 5 по 7 сутки усиление активности на 0,15 мкмоль/день, с 7 по 11 сутки на 0,02 мкмоль/день. При кратковременном понижении температуры до 4°C в течение суток, при которой фотосинтез прекращается, и возобновлении нормальных условий (повышении температуры) в течение суток в контрольных образцах проростков озимой пшеницы, активность рубиско увеличилась на 0,0012 мкмоль, а обработанных адаптерами морозоустойчивости происходит скачек активности рубиско в 8 раз при использовании биопрепарата на основе лектинов сои и 4 раза биопрепарата на основе биофлавоноидов гречихи в сравнении с контролем.

Таким образом, применение адаптеров на сортах озимой пшеницы с зимостойкостью 2-4 балла способствует низкотемпературной акклиматизации за счет повышения активности РБФК, а следовательно, увеличению концентрации глюкозы в узлах кушения, физиологическое и биохимическое состояние которых во многом определяет перезимовку всего растения.

Влияние биомелиоранта на минеральное питание и продуктивность сельскохозяйственных растений

Злотников А.К. *, Злотников К.М. *, Лукин С.М. **, Слесарева Т.Н. ***, Кураков А.В. ****

* Научно-производственная фирма «Альбит». Проф. Виткевича ул., 2, г. Пушкино, Московская обл., Россия.

** ВНИИ органических удобрений и торфа. Прянишникова ул., 2, п. Вяткино, Владимирская обл., Россия.

*** ВНИИ люпина. Берёзовая ул., 2, пос. Мичуринский, г. Брянск, Россия.

**** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. Ленинские горы, 1, Москва, Россия.

artur@albit.ru

В настоящее время в почвы сельскохозяйственных угодий России вносится примерно на порядок меньше удобрений (в расчёте на д. в.), чем в странах ЕС, США, Китае. Учитывая резкий рост продуктивности сельскохозяйственных культур в последние десятилетия, это может создать проблему дефицита элементов питания. Известно, что микробиота почв способна внести весомый вклад в адаптацию растений к дефициту питательных элементов. Ряд органических удобрений может селективно направлять развитие микробных сообществ почвы в сторону формирования новых ассоциаций с полезными функциями (увеличение численности азотфиксаторов, а также микроорганизмов, переводящих иммобилизованный фосфор и калий в доступные для растений формы). К таким удобрениям-мелиорантам относится новый продукт Альбит-БР. Он представляет собой жидкий компост на основе проростков зерновых культур, при наработке которого создаются условия для максимального размножения полезной эндوفитной микрофлоры. Количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) в продукте составляет не менее 10^5 КОЕ/г.

Целью настоящей работы явилась первичная оценка влияния данного биомелиоранта на минеральное питание и продуктивность сельскохозяйственных растений в полевых условиях.

Полевые деляночные опыты проводили в 2019 г. на люпине белом сорта Мичуринский (серая лесная почва, опытное поле ВНИИ люпина - филиала ФГБНУ ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса», Брянская обл.), горчице белой сорта Рапсодия (серая лесная почва, производственные посеы ООО «Тесницкое», Тульская обл.), ячмене яровом сорта Сударь (дерново-сильнопodzолистая почва, поле ВНИИОУ - филиала ФГБНУ «Верхневолжский ФАНЦ», Владимирская обл.). Во всех опытах Альбит-БР (дозировки от 0,1 до 1,0 л/га) вносили в виде рабочего раствора однократно весной непосредственно перед посевом, с заделкой в почву культиватором либо сеялкой.

В опыте на люпине урожайность зерна в контроле составила 12,7 ц/га. При использовании для посева семян, предварительно обработанных фунгицидным протравителем, Альбит-БР (0,5 л/га) обеспечил прибавку урожая 7,6%. На фоне непротравленных семян прибавка к контролю составила 191,3%. В результате применения биомелиоранта также заметно улучшилось снабжение растений азотом: сухая масса клубеньков в расчёте на растение увеличилась на 20,6-35,7% в зависимости от даты учёта; содержание сырого белка в зерне повысилось с 31,8% до 34,0%. Подавлялся высокий инфекционный фон патогенов (антракноза и фузариоза).

В опыте на горчице Альбит-БР вносили в дозировке 1,0 л/га. На контроле была получена урожайность 10,5 ц/га, на опытном поле – 12,75 ц/га (прибавка 21,4%). В начале вегетации, в почве опытного варианта содержание доступного нитратного азота ($N-NO_3$) возросло на 94,7% к контролю, аммонийного – на 44,4%. По результатам анализа после уборки урожая, отмечено увеличение содержания доступного нитратного азота на 58,8%, превышения $N-NH_4$ не выявлено. Несмотря на вынос азота с повышенным урожаем, содержание общего азота повысилось на 6,7% к контролю, что свидетельствует о стимуляции азотфиксации в опытном варианте. В пахотном горизонте опытного поля также было отмечено увеличение содержания доступных растениям форм элементов питания над контрольным: К – на 12,2%, Cu – на 6,4%, Mn – на 11,4%, Mo – на 14,3%. Биомелиорант не оказывал положительного влияния на содержание доступного фосфора. Как и в предыдущем опыте, отмечено снижение обилия патогенов рода *Fusarium* (на 67% в сравнении с контролем).

В опыте на ячмене, на фоне низкой обеспеченности растений элементами питания, урожай зерна в контроле составил 22,8 ц/га. Дозировки Альбита-БР 0,1 л/га, 0,5 л/га, 1,0 л/га обеспечили прибавки урожая на 15-20%, статистически достоверно отличные от контроля, но не различающиеся между собой. В почве всех опытных вариантов в начале вегетации (в фазу кущения ячменя) наблюдали увеличение содержания доступного минерального азота в почве. Превышение $N-NH_4$ составило 103-161% к контролю, $N-NO_3$ – 540-1500%. Под влиянием биомелиоранта в пуле минерального азота примерно в 3 раза выросла доля более доступных растениям нитратов в сравнении с аммонием. Сумма $N-NH_4$ и $N-NO_3$ возростала до значений 9,5–16,1 мг/кг против 3,6 мг/кг в контроле (превышение на 164-347%). В отличие от опыта на горчице, прироста содержания азота в конце вегетации и калия – на протяжении всей вегетации отмечено не было. Однако, в почве всех опытных вариантов на стадии всходов и кущения отмечено повышение содержания доступного фосфора на 6,7-61,3%, после уборки урожая – на 44% (кроме варианта 1 л/га).

Таким образом, полученные к настоящему времени данные опытов на таксономически разных растениях (бобовые, крестоцветные, мятликовые) свидетельствуют о положительном влиянии биомелиоранта Альбит-БР на продуктивность и азотное питание растений в полевых условиях, снижение поражённости патогенами. С другой стороны, открытым остаётся вопрос о характере влияния продукта на содержание доступного растениям фосфора и калия. Поэтому исследования в данном направлении необходимо продолжить.

Влияние биопрепарата на основе силикатных бактерий на рост *Brassica napus* и *Phacelia tanacetifolia*

Борисова Г.Г., Малева М.Г., Воронаева О.В., Атамбуре А., Давыдова Д.К.

Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина. Мира, 19, Екатеринбург, Россия.
borisova59@mail.ru

На сегодняшний день многие почвы сельскохозяйственного назначения истощены вследствие их интенсивного использования. Проблема недостатка доступных для растений элементов питания чаще всего решается внесением химических удобрений. Однако их применение часто приводит к загрязнению окружающей среды, повышая риск попадания токсичных соединений в живые организмы. В связи с этим особый интерес представляет использование экологически безопасных биопрепаратов на основе ризосферных бактерий, стимулирующих рост растений (*PGPR* – *plant growth-promoting rhizobacteria*) и способных ускорять процессы высвобождения биогенных элементов из субстратов, переводя их в доступные для растений формы.

Цель работы – исследование влияния биопрепарата, созданного на основе силикатных бактерий, на рост *Brassica napus* L. (рапс) и *Phacelia tanacetifolia* Benth. (фацелия пижмолистная) в горшечной культуре. Выбранные в качестве модельных виды растений относятся к сидератам – быстрорастущим культурам, устойчивым к болезням и вредителям и часто используемым в сельском хозяйстве в качестве «зеленых удобрений» для улучшения свойств почв.

Для создания биопрепарата использовали штамм силикатных ризосферных бактерий (СРБ) рода *Bacillus* sp., выделенный ранее из глинистого грунта. Было обнаружено, что эти микроорганизмы обладают ростстимулирующими свойствами: способностью солиubilизировать калий и фосфаты из их нерастворимых соединений, а также синтезировать и выделять в питательную среду до 30 мг/л индолил-3-уксусной кислоты при культивировании с добавлением *L*-триптофана. Доказана их способность к фиксации атмосферного азота и разложению азотсодержащих органических веществ до аммонийной формы. В качестве носителя СРБ использовали торфяной грунт (смесь верхового и низинного торфа, нейтрализованную известью до pH 6,0). Бактериальную культуру предварительно выращивали глубинным методом на жидкой питательной среде Зака, модифицированной добавлением минеральной формы азота для нормального образования спор, при комнатной температуре (23°C±2°C) и постоянной аэрации. Культивирование бактерий проводили до титра 7×10^9 клеток/мл, который определяли методом Виноградского–Брида. Торфяной грунт дважды автоклавировали в течение 2 ч при температуре 132°C. Стареющую культуру с преобладанием спор над вегетативными клетками смешивали с торфяным субстратом в соотношении 1:2 (по объему) и высушивали при температуре 40°C. В горшочки объемом 300 мл вносили предварительно стерилизованную мелкодисперсную глину, песок и добавляли биопрепарат в общем соотношении 60:10:30 по объему. В контрольные емкости вместо биопрепарата вносили стерильный торфяной грунт. Дополнительно в некоторые варианты (контроль и опыт) добавляли азот в форме аммиачной селитры из расчета 60 кг/га (по элементу). Растения выращивали при естественном освещении и комнатной температуре в течение 2 месяцев. Эксперимент повторяли дважды в 7-кратной биологической повторности. Были измерены такие ростовые параметры, как скорость прорастания семян, изменение высоты побегов и площади листьев, длина корней, количество листьев, сырой и сухой вес надземной и подземной биомассы.

Эксперименты показали, что без добавления азота внесение биопрепарата на основе СРБ достоверно не влияло на рост рапса и фацелии. В то же время, в вариантах с азотом, биопрепарат положительно влиял на некоторые морфометрические характеристики исследуемых растений. С одной стороны, СРБ не оказывали влияния на всхожесть семян, однако при этом скорость появления первых всходов увеличивалась в 2 раза. Причем у рапса около 50% проростков появлялось уже на 3 сутки эксперимента, у фацелии – через 7 суток. Добавление биопрепарата достоверно не влияло на высоту побегов, но стимулировало рост корней (в среднем на 25%) и листовой пластинки (площадь листа у фацелии и рапса увеличивалась на 15 и 33%, соответственно). Бактерии совместно с азотом оказывали положительное влияние на увеличение биомассы как надземных, так и подземных органов. Причем в среднем сырой вес одного растения рапса увеличивался на 23%, в то время как у фацелии – лишь на 13%. После завершения эксперимента в почвенных образцах было определено число колониеобразующих единиц (КОЕ) СРБ. При добавлении биопрепарата оно на три порядка превышало значение КОЕ в контроле и составляло в среднем $2,0 \times 10^5$ без азота и $3,5 \times 10^5$ – с азотом, что свидетельствует о сохранении жизнеспособности внесенных с торфом микроорганизмов.

Таким образом, модельные эксперименты с использованием горшечных культур свидетельствуют о том, что биопрепарат на основе силикатных ризосферных бактерий стимулировал рост *B. napus* и *P. tanacetifolia*. Дальнейшие исследования должны быть направлены на выявление наиболее оптимальных для деятельности СРБ условий, изучение физиологических и биохимических аспектов взаимоотношений между СРБ и растениями, а также оценку влияния биопрепарата на основе СРБ на рост культурных растений не только в модельных, но и полевых условиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и ДНТ в рамках научного проекта №19-516-45006 и Министерства науки и высшего образования РФ, соглашение № 02.А03.21.0006.

Влияние высоких концентраций CoCl_2 , Co(II) - и Co(III) ЭДТА на редокс-метаболизм и дыхание растений *Triticum aestivum* L.

Федяев В.В., Хаматдинова Г.И., Сигова К.М., Гарипова М.И., Фархутдинов Р.Г.

Башкирский государственный университет, ул. Валиди, 32, Уфа, Россия.
vadim.fedyayev@gmail.com

Кобальт (Co) – тяжелый металл, в низких концентрациях необходимый для нормального роста растений и токсичный при его избыточном содержании. Степень токсичности Co зависит от вида растений и почвенных условий. ЭДТА-комплексы металлов всё чаще применяются в практике внесения микроэлементов для повышения их доступности растениям, а также в целях фиторемедиации территорий, загрязненных тяжелыми металлами. В комплексе с ЭДТА Co может находиться в двух степенях окисления – II и III. При этом термодинамически Co(III) ЭДТА в несколько раз стабильнее и подвижнее. По ряду литературных источников Co(III) ЭДТА более токсичен для живых систем по сравнению с Co(II) ЭДТА. Цель нашей работы состояла в сравнении влияния CoCl_2 и ЭДТА-комплексов кобальта в степени окисления II и III в концентрации 100 мкМ на растения пшеницы сорта Саратовская 29. Соединения кобальта однократно вносили в среду Хогланда-Арнона (с исключением источника железа) с начала культивирования растений. Все измерения описываемых параметров проводили на растениях, начиная с 14 суток, отсчитывая от момента посева семян. В контрольном варианте питательная среда содержала 0,1 мкМ CoCl_2 . Под влиянием высокой концентрации CoCl_2 сухая масса побегов снижалась наиболее значительно (на 25,8%) по сравнению с контролем. Воздействие Co(II) - и Co(III) ЭДТА приводило к снижению данного параметра в меньшей степени (на 10,4 и 8,9%, соответственно). Наиболее значительные различия в действии минеральной и ЭДТА-форм кобальта наблюдали при измерении сухой массы корней. Так, CoCl_2 снижал этот показатель на 44,3%, а Co(II) - и Co(III) ЭДТА – на 20,6 и 16,9%, соответственно. Таким образом, высокая концентрация CoCl_2 оказывала наиболее значительное токсическое влияние на растения пшеницы изученного сорта. В то же время, ЭДТА-комплексы в аналогичной концентрации были менее токсичны. Показано, что основываясь на измерении накопления сухой массы растений сложно определить особенности воздействия на растения кобальта в составе хелатов с разной степенью окисления. Использование высокой концентрации CoCl_2 повышало скорость образования супероксид-аниона (СОА) в корнях растений на 166% по сравнению с контролем. Воздействие ЭДТА-соединений отличались между собой по влиянию на этот параметр: Co(II) ЭДТА приводил к повышению образования СОА на 84,5%, а Co(III) ЭДТА – снижал на 11,6%. Супероксиддисмутазная активность в корнях под влиянием соединений кобальта возрастала на 7,7, 16,2 и 16,8% в ряду CoCl_2 , Co(II) - и Co(III) ЭДТА, относительно контроля. Содержание пероксида водорода (H_2O_2) в тканях корня значимо не изменялось в присутствии CoCl_2 и возрастало под влиянием Co(II) - и Co(III) ЭДТА на 34,7 и 16,3%, соответственно. Поддержание относительно низкого уровня содержания H_2O_2 в присутствии CoCl_2 может быть отчасти связано с повышением каталазной активности (на 15%) в корнях растений, относительно контроля. В присутствии Co(II) - и Co(III) ЭДТА каталазная активность возрастала на 8,6 и 8,2%, соответственно. В то же время активность гваяколпероксидазы под влиянием кобальта в высокой концентрации снижалась на 9,7, 19,3 и 17,8% в ряду CoCl_2 , Co(II) - и Co(III) ЭДТА, относительно контроля. Измерение скорости дыхания целых растений показало усиление потребления кислорода под влиянием CoCl_2 на 23,3%. При этом не обнаружено значимых отличий данного параметра у растений пшеницы в присутствии ЭДТА-комплексов кобальта. Ингибиторный анализ способности цитохромоксидазного (ЦП) и альтернативного цианидрезистентного (АП) путей проводили с использованием азида натрия, салицилгидроксамовой кислоты и 2,4-динитрофенола. Способность ЦП под влиянием CoCl_2 возрастала на 22%, а АП – на 400%, относительно контроля. В случае использования Co(II) ЭДТА способность ЦП возрастала на 5,6%, а Co(III) ЭДТА – снижалась на 12%. Способность АП в присутствии ЭДТА-комплексов кобальта возрастала на 67 и 33%, соответственно. Количественное соотношение дыхания и гросс-фотосинтеза (R/Pg) является характеристикой углеродного баланса растений. Величина показателя R/Pg в ряду: контроль, CoCl_2 , Co(II) - и Co(III) ЭДТА, составляла в среднем 41, 58, 46 и 47%, соответственно, что отражает увеличение дыхательных затрат растений в условиях созданного стресса и степень токсического влияния разных химических форм кобальта. Таким образом, комплексное определение параметров роста, редокс- и дыхательного обмена позволяет оценить степень токсического влияния минеральной и хелатированных форм кобальта на растения пшеницы сорта Саратовская 29. Также показаны некоторые различия влияния на изученные растения ЭДТА-комплексов в степени окисления II и III. Планируется продолжение изучения механизмов устойчивости, энергетического обмена и накопления кобальта у растений с разной степенью устойчивости к тяжелым металлам.

Влияние высоких температур на фотохимическую активность изолированных хлоропластов и накопление водорастворимых углеводов в листьях яровой пшеницы

Федотова О.А.^{*}, Полякова Е.А.^{*,**}, Грабельных О.И.^{*,**}

^{*} Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН. Лермонтова ул., 132, Иркутск, Россия.

^{**} Иркутский государственный университет. Сухэ-Батора ул., 5, Иркутск, Россия.

ol.bogovik@mail.ru

Изменение температуры окружающей среды влияет на скорость и эффективность фотосинтеза от момента «улавливания» хлоропластами энергии солнца до образования восстановительных эквивалентов и синтеза сахаров в клетках растений. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что для каждого вида и сорта растения повышение температуры до определенного уровня и определенный период ее воздействия является критичным и может приводить к различным повреждениям и ингибированию фотосинтеза, изменяя его энергетический выход, что является крайне негативным событием для развития и продуктивности растений. В электрон-транспортной цепи хлоропластов функционируют два пути транспорта электронов: основной нециклический или базальный, который ведет к образованию НАДФН и АТФ, и циклический путь, который приводит к синтезу только АТФ. В условиях температурного стресса происходят изменения или сбои в работе фотосистем, может нарушаться равновесие между производством АТФ и/или НАДФН и их потреблением, что может приводить к фотоингибированию.

Целью работы явилось изучение влияния теплового воздействия на теплоустойчивость яровой пшеницы, скорость базального транспорта электронов в изолированных хлоропластах и накопление в листьях водорастворимых углеводов.

В работе были использованы растения яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта «Новосибирская 29» в возрасте 8 суток (стадия выхода второго листа), выращенных гидропонным способом в контейнерах 20×30 см на растворе ½ Кнопа при 23°C/20°C (16 ч день/8 ч ночь) и освещенности 200 мкмоль/(м² с) ФАР. Тепловое воздействие (закаливание) осуществлялось при 39°C в условиях непрерывного освещения при освещенности 200 мкмоль/(м² с) ФАР или в темноте в течение суток. Тепловой стресс проводили при 50°C в течение 3 часов в условиях освещения, помещая одновременно в камеру с заданными условиями контрольные и предварительно обработанные при 39 °C растения. Выращивание и тепловые обработки осуществляли в камерах «Binder» опытной станции Фитотрон СИФИБР СО РАН. Теплоустойчивость оценивали кондуктометрическим способом; изолированные хлоропласты получали дифференциальным центрифугированием; скорость базального транспорта электронов в изолированных хлоропластах оценивали полярографическим методом; содержание сахаров в листьях определяли антроновым методом.

Нами было показано, что тепловое воздействие 39°C в условиях непрерывного освещения в течении суток приводит к увеличению теплоустойчивости яровой пшеницы, незначительному снижению активности базального транспорта электронов в изолированных хлоропластах и увеличению содержания водорастворимых углеводов в листьях. Действительно, скорость фотосинтеза снизилась на 18%, однако это снижение наблюдали в условиях значительного (увеличение в 5 раз) накопления водорастворимых углеводов в листьях. Предварительное воздействие температурой 39°C существенно повышало устойчивость фотосинтеза к последующему действию теплового стресса при 50°C в течение 3 часов. Действие на контрольные растения теплового стресса приводило к практически полной остановке скорости базального транспорта электронов в хлоропластах, в то время как действие теплового стресса на предварительно обработанные растения сопровождалось ее снижением всего на 20%. Так как наблюдали незначительное снижение скорости базального транспорта электронов в хлоропластах после 39°C на фоне повышенного уровня сахаров, а растения закаливали с зерновкой, то необходимо было выяснить происходит ли мобилизация сахаров из зерновки и какой процент сахаров накапливается в результате фотосинтеза. Для этого перед закаливанием в условиях света и темноты у одних растений зерновка отделялась, а у других нет. Было показано, что в листьях растений, закаленных в условиях непрерывного освещения без зерновки, происходило увеличение сахаров в 4,5 раза, что подтверждает данные об эффективности фотосинтеза в условиях закаливания при 39°C при непрерывном освещении. Однако при закаливании на свету с зерновкой содержание сахаров в листьях было больше, чем при закаливании без зерновки. Также получены интересные данные о влиянии закаливания растений без и с зерновкой в условиях темноты на содержание водорастворимых углеводов в листьях – наблюдается мобилизация сахаров из зерновки в листья (увеличение в 2,5 раза), что указывает на важную роль водорастворимых углеводов в процессах адаптации растений к высоким температурам. Вероятно, мобилизация водорастворимых углеводов из зерновки в листья при закаливании на свету и в темноте является одним из механизмов, способствующих повышению устойчивости яровой пшеницы к высоким температурам. Мы предполагаем, что незначительное снижение скорости базального транспорта электронов в хлоропластах является адаптивной реакцией, вероятно, связанной с эффектом фотоингибирования на фоне высокого уровня накопления восстановительных эквивалентов и/или активации циклического транспорта электронов в хлоропластах после теплового воздействия 39°C в условиях непрерывного освещения.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 17-74-10096.

Влияние высоких температур на функционирование «внешних» ротенон-нечувствительных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ в митохондриях из проростков яровой пшеницы

Полякова Е.А.* **, Федотова О.А.* **, Грабельных О.И.* **

* Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН. Лермонтова ул., 132, Иркутск, Россия.

** Иркутский государственный университет. Сухэ-Батора ул., 5, Иркутск, Россия.

polyackova.elizaveta727@yandex.ru

Пшеница одна из сельскохозяйственных культур, которая в ходе онтогенеза подвергается действию температурного стресса. Особенно чувствительна пшеница к действию высоких температур на начальных этапах ее развития – сразу после посева, а также в период всходов и образования листьев. Несмотря на это, растения способны адаптироваться к тепловому стрессу и выработали ряд механизмов, повышающих их устойчивость к высоким температурам. Дыхание занимает центральную роль в метаболизме растительной клетки, и его устойчивость к действию стресса крайне важна для поддержания жизнедеятельности и определяет способность растений к адаптации. В последние годы пристальное внимание уделяется изучению функционирования митохондрий и альтернативных ферментов дыхания (альтернативная цианид-резистентная оксидаза и ротенон-нечувствительные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы – НАД(Ф)Н-ДГ II типа) при высоких температурах и их вовлеченности в теплоустойчивость растений. НАД(Ф)Н-ДГ II типа, по сравнению с альтернативной оксидазой, являются мало изученными, и вопрос о их функциональной значимости при высоких температурах является весьма интересным и актуальным, особенно на начальных этапах развития растений.

Целью данной работы является подбор тепловых обработок, которые приводят к развитию термотолерантности у проростков яровой пшеницы и выявление вовлеченности в этот процесс «внешних» ротенон-нечувствительных НАДН- и НАДФН-дегидрогеназ.

Объект исследования – яровая пшеница сорта «Новосибирская 29» в возрасте 4-х (стадия нахождения листа в колеоптиле) и 8-ми суток (стадия выхода второго листа), выращенных гидропонным способом на растворе ½ Кнопа при 23°C/20°C (16 ч день/8 ч ночь) и освещенности 200 мкмоль/(м²с) ФАР. Тепловому стрессу подвергали контрольные растения при 50°C в течение 1-7 часов в условиях освещения. Выращивание и тепловые обработки осуществляли в камерах «Binder» опытной станции Фитотрон СИФИБР СО РАН.

Результаты, проведенные на 4-х и 8-ми суточных проростках, показали различные уровни устойчивости данных растений к тепловому стрессу и способности к адаптации. Так 4-х суточные проростки более устойчивее к действию высокой стрессовой температуре и быстрее адаптируются (3-6 часов) к воздействию не повреждающей температуре 37 и 39°C по сравнению с 8-ми суточными (6-24 часа). На основании данных по синтезу БТШ для закаливания использовали 37°C в течение 6 часов для 4-х суточных и 24 часа для 8-ми суточных проростков в условиях непрерывного освещения.

Ранее нами было показано, что тепловое воздействие 39°C в течение 24 часов в условиях непрерывного освещения приводило к повышению теплоустойчивости растений, увеличению вклада альтернативного пути дыхания и содержания белков альтернативной оксидазы и НАД(Ф)Н-дегидрогеназ II типа в митохондриях из листьев яровой пшеницы. Из научной литературы известно, что «внутренние» НАД(Ф)Н-ДГ II типа не индуцируются тепловым стрессом в листьях, а «внешняя» ротенон-нечувствительная НАДН-дегидрогеназа является функционально стабильной в митохондриях из этиолированных проростков при повышенной температуре *in vitro*. В то же время в недавних исследованиях отмечена активация генов альтернативных ферментов дыхания после восстановления растений после теплового стресса.

Для изучения активности НАД(Ф)Н-ДГ II типа необходимо использовать очищенные митохондрии, а получить функциональные митохондрии из фотосинтезирующих тканей довольно сложно. В связи с этим многие исследования в научной литературе связаны с изучением экспрессии генов НАД(Ф)Н-ДГ II типа в интактных тканях. Нами были подобраны и модифицированы условия выделения и очистки митохондрий из побегов и листьев проростков яровой пшеницы. С помощью полярографического анализа активности митохондрий, выделенных из побегов 4-х суточных и листьев 8-ми суточных проростков, были выявлены различия и сходства в скорости окисления субстратов дыхания и активности «внешних» ротенон-нечувствительных НАДН- и НАДФН-дегидрогеназ. Показано, что скорость окисления экзогенного НАДН выше, чем скорость окисления малата и НАДФН в проростках. Активность «внешней» НАДФН-дегидрогеназы ниже активности «внешней» НАДН-дегидрогеназы в митохондриях как из побегов, так и из листьев проростков яровой пшеницы. При действии закаливающей температуры на проростки не наблюдали изменений в скорости окисления митохондриями экзогенного НАДН и НАДФН. В ответ на тепловой стресс происходило увеличение активности «внешней» НАДФН-дегидрогеназы II типа в митохондриях из побегов, в то время как в митохондриях из листьев происходило снижение активности как «внешней» НАДН-, так и НАДФН-дегидрогеназы. Таким образом, активность «внешних» НАДН- и НАДФН-дегидрогеназ II типа в митохондриях при высоких температурах зависит от фазы развития яровой пшеницы и, вероятно, тканеспецифична, а функциональная значимость и вклад в развитие теплоустойчивости яровой пшеницы у этих дегидрогеназ, вероятно, также отличаются.

Работа выполняется при финансовой поддержке гранта Президента РФ № МК-1720.2020.4.

Влияние высокой концентрации CO₂ на солеустойчивость C₄ ксерогалофита *Kochia prostrata*

Шуйская Е.В., Рахманкулова З.Ф., Прокофьева М.Ю., Малиновский А.В., Воронин П.Ю.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук,
Ботаническая ул., 35, 127276, Москва, Россия.
evshuya@mail.ru

Вопросы, связанные с изучением влияния глобальных климатических изменений на растительность, занимают лидирующее положение в биологической науке. Значительное повышение концентрации атмосферной CO₂ и связанные с этим аридизация климата и засоление почвы являются факторами, влияющими на рост, развитие и функционирование растений, что может потенциально изменить состав растительных сообществ, распространение экосистем и привести к катастрофическому снижению биоразнообразия (Pérez-Romero et al., 2018; de Faria et al., 2018; Zheng et al., 2018). Долгое время считалось, что C₄ растения, благодаря наличию углерод-концентрирующего механизма менее зависимы от концентрации CO₂ в окружающей среде, чем C₃ виды, и, таким образом, будут меньше реагировать на увеличение атмосферной концентрации CO₂ (Sage, Kubien, 2007; Reich et al., 2018). Однако за последние годы появилось много противоречивой информации по этому вопросу. Так некоторыми авторами показано, что высокая концентрация CO₂ эффективно стимулирует фотосинтетический метаболизм у C₄ галофитов сем. Chenopodiaceae (Jothiramshekar et al., 2018) и способствует улучшению эффективности использования воды (WUE) (de Faria et al., 2018). В тоже время есть информация о том, что высокие концентрации CO₂ могут не приводить к значительным изменениям видимого фотосинтеза и транспирации C₄ видов (de Faria et al., 2018), и даже могут вызывать снижение эффективности карбоксилирования и скорости насыщения фотосинтеза у C₄ растений (Watling, 2000). Изучение совместного влияния высокой концентрации CO₂ и засоления показало, что повышенные концентрации CO₂ вызывают усиление экспрессии чувствительных к соли генов (Jothiramshekar et al., 2019), приводят к высоким значениям скорости нетто-фотосинтеза и улучшению водного баланса растений (Pérez-Romero et al., 2018), а также к увеличению WUE (Pérez-Romero et al., 2019).

В связи с многофакторностью глобальных климатических изменений все больший интерес представляют виды, характеризующиеся солеустойчивостью – ксерогалофиты. Эти растения обладают комплексом защитно-приспособительных стратегий, позволяющих им противостоять и активно расти в условиях осмотического стресса и ионной токсичности, окислительного стресса, дезорганизации мембран и более эффективно использовать энергетический потенциал (Nikalje, 2017). Поэтому ксерогалофиты служат важным ресурсом для изучения механизмов засухо- и солеустойчивости, а также идентификации и разработки новых систем в растениеводстве и в фитомелиорации (Hamed, 2013; Panta et al., 2014). Целью данной работы явилось исследование влияния высокой концентрации CO₂ и умеренного засоления на солеустойчивость C₄ ксерогалофита *K. prostrata* (сем. Chenopodiaceae).

Исследовали влияние атмосферной (400 ppm) и высокой концентрации CO₂ (800 ppm), а также умеренного засоления (200 mM NaCl) на эффективность ФCI и П (Fv/Fm), интенсивность роста, видимого фотосинтеза, транспирации, темнового дыхания, эффективность использования воды, а также содержание пролина, ионов Na⁺ в побегах C₄ ксерогалофита *Kochia prostrata*. Выявили, что при атмосферной концентрации CO₂ растения были неустойчивы к умеренному засолению. Наблюдалось увеличение накопления ионов Na⁺ в надземной части растений, которое сопровождалось уменьшением сухой биомассы (в 2 раза) и длины побегов (в 1.3 раза). Также имело место снижение интенсивности транспирации (в 1.5 раза), что приводило к возрастанию эффективности использования воды (в 1.4 раза). Снижение времени выхода на плато кинетической кривой ФCI (в 1.6 раза), косвенно свидетельствовало об уменьшении интенсивности циклического транспорта электронов, характерного C₄ видам. При комплексном воздействии высоких значениях CO₂ и умеренного засоления наблюдалось увеличение сухой биомассы побега (в 2 раза, от варианта засоление при 400 ppm CO₂), накопление ионов Na⁺ в тканях растений, а также увеличение времени выхода на плато кинетической кривой ФCI (в 1.4 раза, от варианта засоление при 400 ppm CO₂) и, вероятно, активация интенсивности циклического транспорта электронов. В результате всех этих изменений рост растений сохранялся на уровне контрольных растений. Из полученных экспериментальных данных и в результате проведенного PCA анализа следует, что повышенная концентрация CO₂ оказывает положительное влияние на солеустойчивость C₄ ксерогалофита *K. prostrata*.

Влияние генотипа и влажности воздуха на тип роста стебля *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Крылова Е.А., Бурляева М.О., Хлесткина Е.К.

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова. ул. Большая Морская, 42, 44, Санкт-Петербург, Россия.
e.krylova@vir.nw.ru

Вигна (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) является одной из наиболее важных продовольственных культур в мировом сельском хозяйстве. Многие хозяйственно ценные признаки вигны, в частности тип роста стебля, зависят от условий произрастания. Известны два типа роста, которые определяются как детерминантный и индетерминантный. Для многих диких родичей бобовых культур характерен индетерминантный тип роста стебля, при котором растения вьющиеся, со множеством узлов и ветвей. У растений с детерминантным типом роста происходит ограничение роста стебля, переход в репродуктивную стадию характеризуется формированием терминального соцветия. Известно, что ген *TFL1* отвечает за поддержание индетерминированности апикальной меристемы побега в течение всего жизненного цикла растения. Целью настоящего исследования было (1) выявить и охарактеризовать ген *TFL1* и его копии в геноме *V. unguiculata* и (2) изучить изменчивость морфологических признаков образцов *V. unguiculata*, отличающихся типом роста стебля, в контролируемых условиях. Материалом для исследования послужили 109 растений 4 образцов из коллекции вигны ВИР. Растения выращивали при продолжительности светового дня 12 ч, температуре 25°C, при влажности воздуха 60% и 92%. Каждое растение оценивали по 14 морфологическим признакам. В результате проведённой работы в геноме *V. unguiculata*, а также в геномах других близкородственных видов трибы *Phaseoleae* DC., впервые были выявлены две схожие по структуре копии гена *TFL1*, а также высоко гомологичные *TFL1*-подобные ингибиторы цветения *ATC* и *BFT*. На основании полученных данных, можно предположить, что все идентифицированные белки могут обладать функцией блокаторов перехода растений *V. unguiculata* к цветению. Результаты по изучению фенотипического разнообразия морфологических признаков образцов в контролируемых условиях показали значительную вариабельность. Многофакторный дисперсионный анализ выявил признаки, на изменчивость которых достоверно оказывали влияние генотип и условия роста (влажность). Некоторые морфологические признаки зависели только от влажности, в то время как изменчивость других признаков определял генотип. Показатели длины растения зависели как от генотипа, так и от влажности. Таким образом, было выявлено, что различные генотипы не одинаково реагировали на внешние условия. Дальнейшее исследование молекулярно-генетических механизмов, обеспечивающих независимость типа роста стебля от повышенной влажности, позволит разработать диагностические маркеры для направленной селекции *V. unguiculata* с целью расширения ареала ее возделывания.

Влияние гистидина на накопление цинка и никеля у интактных растений разных популяций гипераккумулятора *Noccaea caerulescens*

*Серегин И.В.**, *Кожевникова А.Д.**, *Жуковская Н.В.**, *Карташов А.В.**, *Схат Х.***

* Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.

** Свободный Университет, Амстердам, Нидерланды.
ecolab-ipp@yandex.ru

В последнее время большое внимание ученых привлекают растения, способные к избирательному накоплению отдельных элементов. В настоящее время описано около 720 видов растений, названных (гипер)аккумуляторами, у которых металлы накапливаются преимущественно в надземных органах, причем содержание никеля (Ni) и цинка (Zn) в побегах может достигать 1000 и 3000 мкг/г сухой массы, соответственно, что значительно выше, чем у исключателей, накапливающих металлы главным образом в корнях. Ключевая роль в детоксикации, транспорте металлов и поддержании гомеостаза принадлежит низкомолекулярным лигандам, одним из которых является гистидин. Гипераккумулятор *Noccaea caerulescens* F.K. Mey. обладает высоким эндогенным уровнем гистидина в корнях. В работе изучено влияние экзогенного гистидина на поступление цинка (Zn) и никеля (Ni) в побеги интактных растений гипераккумулятора *N. caerulescens*. Было проведено четыре серии экспериментов на растениях, выращенных в гидропонике в течение 7 недель на 0.5N растворе Хогланда. (1) Интактные растения *N. caerulescens* (популяция St-Félix-de-Pallières (SF)) предобработывали в течение 4 часов (с 12:00 до 16:00) 1 мМ раствором L-гистидина или деминерализованной водой, а затем ночью инкубировали (20 ч) на 0.5N растворе Хогланда в присутствии 5, 25 или 250 мкМ Ni или Zn. (2) Чтобы проверить влияние времени обработки, интактные растения *N. caerulescens* той же популяции предварительно обрабатывали ночью 1 мМ раствором L-гистидина или деминерализованной водой (20 часов), а затем подвергали воздействию 250 мкМ Ni или Zn в течение 8 часов в течение дня (с 10:00 до 18:00). (3) Интактные растения *N. caerulescens* (популяции SF и La Calamine (LC) с каламиновых почв и популяция Monte Prinzera (MP) с ультраосновных почв) инкубировали в течение 8 часов (с 10:00 до 18:00) на 0.5N растворе Хогланда в присутствии 250 мкМ Ni или Zn, а затем ночью (20 ч) обрабатывали 1 мМ раствором L-гистидина или деминерализованной водой. (4) Чтобы оценить влияние фонового содержания Ni в начале обработки, третий эксперимент был повторен на растениях (популяция MP), предварительно инкубированных в течение 1 недели на 0.5N растворе Хогланда в присутствии 25 мкМ Ni. Содержание Ni и Zn в корнях и побегах определяли методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии. Рассчитывали фактор транслокации, выраженный как отношение содержания металлов в побегах к их содержанию в корнях, общее количество поглощенного металла и содержание металлов в побегах, выраженное в процентах от общего содержания металлов в растении (% транслокации). Предобработка L-гистидином в течение 4 часов во второй половине дня с последующей инкубацией в присутствии Ni или Zn привела к значительному снижению содержания Ni и Zn в корнях и увеличению содержания Ni, но не Zn в побегах. Для обоих металлов наблюдалось достоверное увеличение значений как фактора транслокации, так и % транслокации, причем эффект был более сильным в случае Ni. При действии Ni, но не Zn наблюдалось незначительное, но достоверное увеличение общего количества поглощенного металла. Предобработка L-гистидином ночью с последующим воздействием металлов в течение дня имела в основном сходное влияние на транслокацию Ni, но привела к снижению общего содержания Ni в растениях. Транслокация Zn при этом не изменялась, но уменьшалось содержание Zn в корнях. Растения различных популяций (SF, MP, LC) существенно различались по способности поглощать и транспортировать Ni и Zn, но в целом сходным образом отвечали на постобработку L-гистидином, в результате которой возрастало значение фактора транслокации и % транслокации для обоих металлов у растений популяций SF и MP, тогда как у LC достоверный эффект был обнаружен только для Ni. Предварительная инкубация растений MP в течение 1 недели в присутствии Ni (25 мкМ) с последующей инкубацией в присутствии 250 мкМ Ni в целом не изменяла влияние постобработки L-гистидином, но, как и ожидалось, снижала влияние гистидина на содержание Ni в корнях и значение фактора транслокации, но не на % транслокации. Таким образом, высокое эндогенное содержание L-гистидина у *N. caerulescens*, вероятно, способствует гипераккумуляции как Ni, так и Zn. Более сильное влияние экзогенного L-гистидина на транслокацию Ni по сравнению с Zn, по-видимому, является, по крайней мере отчасти, результатом высокого содержания Zn в побегах растений перед началом обработки, что в значительной степени маскирует очевидное влияние экзогенного L-гистидина на концентрацию Zn в побегах и, в меньшей степени, на % транслокации Zn.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 21-14-00028 (эксперименты 1-3 с растениями из популяций MP и SF), при частичной поддержке гранта РФФИ № 19-04-00369 (эксперимент 3 с растениями из популяции LC) и Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания (тема №121040800153-1) (эксперимент 4).

Влияние грибов рода *Trichoderma* и психротолерантных бактерий штамма УОЗК2 на ростовые процессы и микрофлору прикорневой зоны *Secale cereal L.*

Голованова Т.И., Иванова А.Н.

Сибирский федеральный университет, институт фундаментальной биологии и биотехнологии,
пр. Свободный 79, Красноярск, Россия.
tigolovanova@mail.ru

Грибы рода *Trichoderma* играют важную роль в формировании микробиоценозов почвы и характеризуются высокой приживаемостью и конкурентноспособностью в экологической нише. Они имеют различные механизмы, позволяющие им выступать в роли регуляторов численности патогенных для растений микроорганизмов, и оказывать стимулирующее на рост и сопротивляемость растения воздействию. Одним из таких механизмов выступает микопаразитизм, который сопровождается прямым контактом *Trichoderma*. с другим грибом. Ключевую роль в этом процессе играют литические ферменты, в особенности хитиназы, и глюканы, которые осуществляют гидролитическую деградацию клеточных стенок грибов, состоящих в основном из хитина и глюкановых полисахаридов. Высокую сопротивляемость *Trichoderma* к действию антимикробных соединений связывают с АВС (АТФ-binding cassette transporters) транспортными системами, быстрой деградацией фенольных соединений и подавлением синтеза фитоалексина растением. *Trichoderma* способна эффективно конкурировать за ресурсы с другими микроорганизмами. Она может получать глюкозу, расщепляя широкий спектр полисахаридов. Транспортная система глюкозы у *Trichoderma* более эффективна, чем у остальных грибов. За эту эффективность отвечает ген транспортера Gtt1 глюкозы, который экспрессируется только при очень низких концентрациях глюкозы, когда предполагается сильная конкуренция за ограниченный ресурс. Грибы рода *Trichoderma* способны продуцировать летучие и нелетучие токсичные метаболиты, препятствующие росту и развитию патогенных микроорганизмов, способны стимулировать сопротивляемость растения к действию патогенных микроорганизмов, продуцируют различные МАР (microbe-associated molecular patterns), которые выступают в роли стимуляторов иммунного ответа растения, распространяющегося на целый класс микроорганизмов.

В последнее десятилетие в мире наблюдается растущий интерес к использованию психротолерантных микроорганизмов в биотехнологии. Исследования показали, что карстовые пещеры Средней Сибири являются уникальным природным источником психрофильных и психротолерантных микроорганизмов. Среди них встречаются перспективные микроорганизмы для использования в сельскохозяйственной биотехнологии в качестве безопасных для теплокровных животных и способные к функционированию в низкотемпературных условиях в начале вегетационного периода биофунгицидов. Микроорганизмы, входящие в состав существующих биопрепаратов, не всегда оказываются жизнеспособными в природных условиях, особенно в начале вегетационного периода. В этот период температура находится ниже оптимума мезофильных штаммов, поэтому активация их происходит поздно, когда местная фитопатогенная микобиота уже в значительной степени поражает молодые проростки. Следует ожидать, что психротолерантные штаммы в начале вегетационного периода будут получать дополнительное конкурентное преимущество над фитопатогенами, благодаря своему пониженному температурному оптимуму. Кроме того, благодаря своим температурным пределам роста, они безопасны для человека и теплокровных животных, поскольку не могут развиваться при температуре человеческого тела.

В качестве объектов исследования использовали растения *Secale cereale L.* фирмы «Семена для Сибири». Семена опытных растений обрабатывали спорами гриба *Trichoderma asperellum* MG-97 и бактериальной суспензией УОЗК2. Данный штамм психротолерантных бактерий был выделен к.б.н., доцентом КрасГАУ Ланкиной Е.П. из карстовой известняковой пещеры Женева. Растения выращивали при естественном освещении (фотопериод 16–17 часов), средний уровень облученности $300 \text{ мкмоль фотонов} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$; относительная влажность воздуха $75 \pm 3\%$; температура воздуха $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Для полива использовали отстоянную водопроводную воду, поддерживая относительную влажность почвы на уровне 60%.

Психротолерантные бактерии штамма УОЗК2 и грибы рода *Trichoderma* приводили к существенным изменениям в структуре ризосферного микробного комплекса растений *Secale cereale*. На начальных этапах развития растения *Secale cereale* действие *Trichoderma* существенно проявлялось на содержание гетеротрофов и аммонификаторов, а штамма УОЗК2 – на содержание олиготрофов и аммонификаторов, на стадии кушения *Secale cereale* грибы рода *Trichoderma* значительно увеличивали количество азотфиксаторов, а бактерии штамма УОЗК2 – количество гетеротрофных и аммонифицирующих микроорганизмов. Отмечено стимулирующее влияние *Trichoderma* и психротолерантных бактерий штамма УОЗК2 на ростовые процессы растений, под их влиянием происходило интенсивное накопление биомассы *Secale cereale*. Наибольшее увеличение зеленых пигментов и их суммы наблюдалось под влиянием психротолерантных бактерий. Однако не было получено достоверного положительного влияния исследуемых микроорганизмов на скорость электронного потока и квантовый выход *Secale cereale*.

Влияние засоления на динамику экспрессии генов липоксигеназного каскада *Solanum tuberosum* L.

Горина С.С., Смирнова Е.О., Топоркова Я.Ю., Гречкин А.Н.

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН,
Лобачевского, 2/31, Казань, Россия.
gsvetlana87@gmail.com

Способность растений выживать в неблагоприятных условиях среды обеспечивается наличием широкого спектра метаболитов, одними из которых являются окисленные производные жирных кислот – оксипирины, участвующие в процессах роста и развития, в ответных реакциях на механическое повреждение, воздействие патогенов и факторов окружающей среды. Биосинтез оксипиринов, происходящий при участии липоксигеназ с последующим ферментативным преобразованием синтезированных гидроперекисей жирных кислот, получил название липоксигеназного пути. Цитохромы P450 семейства CYP74 (алленоксидсинтазы (АОС), дивинилэфирсинтазы (ДЭС), гидропероксидлиазы (ГПЛ) и эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС)), занимают центральную позицию разделяя каскад на несколько ветвей, приводящих к биосинтезу жасмонатов, дивиниловых эфиров, летучих альдегидов, гидроперокси-, гидрокси-, оксо- и эпокси-производных жирных кислот и др. В ходе наших исследований была проанализирована динамика экспрессии генов ферментов липоксигеназного каскада (липоксигеназ (ЛОГ), ферментов CYP74, алленоксидциклаз (АОЦ)), а также некоторых регуляторных генов (JAZ) *Solanum tuberosum* L. в условиях солевого стресса.

В геноме картофеля присутствует 6 генов ферментов CYP74: три гена АОС, по одному гену ДЭС и ГПЛ, а также один ген недавно нами охарактеризованного дуалистичного фермента ГПЛ/ЭАС. Растения картофеля выращивались в стерильных условиях на питательной среде MS (Murashige – Skoog). Засоление моделировалось внесением в среду хлорида натрия в конечных концентрациях 25мМ, 50мМ и 100мМ. Экспрессия целевых генов анализировалась на 1, 4 и 14 день, отдельно в надземной части и подземной части органов относительно контрольных растений. Было установлено, что профиль экспрессии целевых генов в этих частях различался. В корнях при действии хлорида натрия в концентрации 25мМ, 50мМ и 100мМ общий профиль экспрессии целевых генов был сходен. В первые сутки наблюдалась увеличение уровня экспрессии гена ЛОГ, которое снижалось к 14 дню до контрольных значений. Экспрессия генов ГПЛ и АОС3 постепенно увеличивалась от 1 к 14 дню, в то время как уровень экспрессии генов ДЭС и JAZ был снижен во всех образцах по сравнению с контролем. Экспрессия генов ГПЛ/ЭАС и АОЦ была сопоставима с контрольными значениями. В отличие от корней, в листьях экспрессия большинства генов ферментов липоксигеназного каскада была сопоставима с контрольными значениями, либо снижена. Индукция экспрессии АОС3 в корнях при солевом стрессе может объясняться тем, что этот фермент хорошо утилизирует как 9-, так и 13-гидроперекиси жирных кислот, которые являются реакционноспособными молекулами, образующимися в нормальных условиях и при повреждении мембран под действием стрессового фактора. Наряду с этим индукция экспрессии гена ГПЛ может объясняться тем, что ГПЛ ветвь липоксигеназного каскада участвует в образовании таких соединений как травматин и травматиновая кислота, получивших названия «раневых гормонов», способствующих делению клеток и запускающих экспрессию защитных генов.

Работы по культивированию S. tuberosum проводились при финансовой поддержке государственного задания Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук». Работы по изучению динамики экспрессии генов выполнены при финансовой поддержке гранта МК-903.2020.4. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП-САЦ ФИЦ КазНЦ РАН.

Влияние избытка фотоассимилятов на формирование проводящих тканей ствола сосны обыкновенной

Серкова А.А., Тарелкина Т.В., Галибина Н.А., Иванова Д.С., Семенова Л.И.

Институт леса – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра "Карельский научный центр Российской академии наук".

Пушкинская ул., 11, Петрозаводск, Россия.

SerkovaAleksandra1996@yandex.ru

Образование проводящих тканей ствола древесных растений – ксилемы и флоэмы – происходит в результате деятельности камбия. Важную роль в регуляции камбиальной активности играет обеспеченность клеток камбиальной зоны фотоассимилятами, поступающими по флоэме. Считается, что основным акцептором фотоассимилятов у древесных растений является корневая система, тогда как камбиальная зона ствола имеет более низкий приоритет при распределении углеводов между органами. Кольцевание, т.е. полная блокада нисходящего транспорта ассимилятов к корневой системе, снимает лимитирование ресурсов по отношению к клеткам камбиальной зоны и дифференцирующихся проводящих тканей.

Понимание донорно-акцепторных отношений органов и тканей в древесном растении исключительно важно для прогнозирования изменений продуктивности и оценки потенциальных рисков гибели древесных насаждений в условиях экологического стресса и глобальных биосферных явлений. В связи с этим мы провели эксперимент с кольцеванием стволов сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) с целью изучения особенностей ксило- и флоэмогенеза в условиях поступления избытка фотоассимилятов к клеткам камбиальной зоны.

Были отобраны 8 деревьев сосны обыкновенной, произраставших в одинаковых почвенно-климатических условиях на опытных участках Института леса КарНЦ РАН (2 км от г. Петрозаводск). Во вторую декаду июня 2017 г. было выполнено кольцевание на стволах 5 деревьев сосны. На высоте 1,3 м острым ножом удаляли кольцо тканей коры шириной 5 см вплоть до зоны формирующейся ксилемы. 3 дерева сосны были помечены как контрольные, на их стволах были выполнены неглубокие проколы тканей коры с целью маркировки начала эксперимента. В результате кольцевания на участке ствола, расположенном выше кольца, накапливаются неструктурные углеводы (сахара, крахмал), при этом в зоне, расположенной непосредственно над кольцом, накопление фотоассимилятов происходит более интенсивно, чем выше по стволу.

Образцы тканей ствола отбирали после окончания вегетационного периода (октябрь). Отбор тканей проводили на 2 уровнях: на 1 и 35 см выше верхней границы кольца (зоны ВК1 и ВК35 соответственно). На контрольных деревьях образцы отбирали на высоте, соответствовавшей уровням ВК1 и ВК35 у окольцованных деревьев. Фиксацию образцов и изготовление поперечных срезов тканей проводили по общепринятым методикам. Измерения количественных показателей на микрофотографиях проводили с использованием ImageJ. Для определения доли различных типов клеток в составе ткани использовали метод сетки. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica.

В образцах тканей сосны мы провели измерение ширины приростов ксилемы и флоэмы, сформировавшихся после кольцевания. В ксилеме этот показатель измеряли от границы барьерной зоны до камбия, во флоэме – от камбия до границы поздней флоэмы. У сосны статистически достоверное различие приростов ксилемы наблюдалось только у двух окольцованных деревьев, при этом в зоне ВК1 ширина приростов была меньше по сравнению с зоной ВК35. У всех окольцованных деревьев было зафиксировано большее число смоляных ходов на единицу площади ксилемы по сравнению с контрольными деревьями, у которых этот показатель составил 1 шт./мм². При этом в зоне ВК1 число смоляных ходов было в 1,5-2 раза выше по сравнению с зоной ВК35 (4-8 шт./мм² и 3-5 шт./мм² соответственно).

В зоне ВК1 у большинства окольцованных деревьев сосны слой поздней флоэмы был шире по сравнению с зоной ВК35, тогда как у контрольных деревьев ширина данного слоя тканей не различалась на разной высоте. В зоне ВК1 поздняя флоэма окольцованных деревьев сосны состояла практически в равной степени из ситовидных и паренхимных клеток. В зоне ВК35 у тех же самых деревьев доля ситовидных клеток была выше по сравнению с зоной ВК1. У контрольных деревьев сосны строение поздней флоэмы было типичным для вида.

Мы также не наблюдали существенного увеличения ширины поздней флоэмы в эксперименте по сравнению с контролем. Увеличение доли паренхимы в поздней флоэме у окольцованных деревьев сосны было незначительным.

В ходе эксперимента с кольцеванием стволов сосны были получены данные, продемонстрировавшие изменение программы дифференциации камбиальных производных в условиях повышенной обеспеченности фотоассимилятами. Кольцевание вызвало дифференциацию большего числа смоляных ходов в ксилеме, и метаболизация избытка фотоассимилятов, по-видимому, происходила в ходе реакций биосинтеза компонентов смолы. Известно, что биосинтез компонентов смолы хвойных требует наличия большого количества ресурсов углеводной природы. Полученные результаты важны с точки зрения прогнозирования изменений продуктивности древесных растений в условиях меняющегося климата.

Исследование выполнялось в рамках Государственного задания Института леса КарНЦ РАН и гранта РФФИ (проект № 19-04-00622_а).

Влияние изменений pH среды на действие цитокининов на проростки инсерционных мутантов *Arabidopsis thaliana* по рецепторам цитокининов

Савельева Е.М., Гетман И.А., Ломин С.Н., Романов Г.А.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
savelievaek@ya.ru

Цитокинины – это один из важнейших классов фитогормонов, регулирующий множество процессов на протяжении всего онтогенеза растения. Цитокинины вызывают физиологический ответ через регуляцию экспрессии целевых генов. В передаче соответствующего сигнала до ядра ключевую роль играют цитокининовые рецепторы, инициализирующие процесс сигналинга при связывании с молекулами цитокининов. Рецепторы цитокининов – сенсорные гибридные гистидинкиназы – крупные трансмембранные белки со сложной структурой. Один из важных вопросов в отношении цитокининовых рецепторов – в каком компартменте клетки происходит инициация сигналинга цитокининов и зависит ли эта локализация от типа ткани и изоформы рецептора – до сих пор остаётся открытым.

Накоплено значительное количество данных о том, что рецепторы способны активно связывать молекулы цитокининов в условиях нейтрального или слабощелочного значений pH, однако уровень связывания резко падает вместе со снижением pH до 5. Это косвенно указывает на то, что взаимодействие лигандов с цитокининовыми рецепторами происходит в клеточных компартментах с соответствующим слабощелочным или нейтральным pH среды – в ядре, эндоплазматическом ретикулуме и/или цитозоле. Прямые опыты, выполненные на разных видах однодольных и двудольных растениях, показали, что цитокининовые рецепторы находятся преимущественно в составе эндоплазматического ретикулума. Однако есть и другие данные, указывающие на локализацию цитокининовых рецепторов на внешней стороне плазматической мембраны. В таком случае сенсорный модель рецептора должен взаимодействовать с цитокинином в условиях умеренно-кислого значения pH.

Необходимо также отметить, что цитокининовые рецепторы обычно представлены в растении семейством из нескольких изоформ. Например, в модельном растении *Arabidopsis thaliana* имеются три цитокининовых рецептора: АНК2, АНК3 и АНК4. Эти белки очень близки по структуре и выполняемым функциям. Тем не менее, некоторые различия, имеющиеся в их строении, приводят к тому, что они обладают разной лигандной специфичностью и неравнозначны в ряде физиологических процессов. Кроме того, цитокининовые рецепторы по-разному распределены по органам растений.

В наших опытах мы использовали двойные инсерционные мутанты арабидопсиса, у которых функционировал лишь один из трех рецепторов цитокининов, чтобы проверить, как они будут взаимодействовать с цитокинином *in vivo* в условиях разных значений pH среды. Также мы использовали растения дикого типа со всеми тремя работающими рецепторами. 4-5-дневные проростки арабидопсиса инкубировали в течение 16 ч в фосфатном буфере со значениями pH от 5 до примерно 9 (концентрация по фосфату 50 мМ). В половине вариантов растения находились в буферных растворах без добавления гормона (отрицательный контроль), а к другой половине добавляли цитокинин бензиладенин (БА) в концентрации 10^{-6} М. Все используемые растения трансформированы геном *GUS* под контролем цитокинин-зависимого промотора P_{ARR5} . Уровень связывания БА с рецепторами определяли по уровню *GUS*-активности, отражающему интенсивность экспрессии встроенной в геном конструкции $P_{ARR5}:GUS$. Повторность экспериментов: аналитическая – 2, биологическая – 3 раза.

Интересно, что как в случае растений с индивидуальными рецепторами, так и в случае растений дикого типа, максимальные значения *GUS*-активности у отрицательных контролей (т.е. при проявлении действия эндогенных цитокининов) были получены при pH 7. Тогда как действие экзогенного гормона для растений с разными работающими рецепторами проявлялось по-разному. Для растений арабидопсиса дикого типа и растений с одним рецептором АНК4, максимум действия БА наблюдался при pH 5 и плавно опускался при движении к pH 9. А для растений с рецепторами АНК2 и АНК3, эффект БА при pH 5 проявлялся довольно слабо, но резко возрастал до максимума при pH 6 и далее при повышении pH также постепенно снижался.

Таким образом, судя по различию эффектов pH, не исключена вероятность расположения разных изоформ рецепторов в разных клеточных компартментах. Особенно учитывая то, что разные изоформы, как было отмечено выше, неравномерно распределены по органам растения, а также имеют «предпочтение» к разным цитокининам. В этой связи для прогностических целей важно иметь представление не только о том, где находится в клетке основная масса активных рецепторов, но и о местоположении пула биологически активных цитокининовых лигандов (цитокининов-оснований), способных связаться с сенсорным модулем данного рецептора.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-04-00797.

Влияние инокуляции растений эндофитом *Cylindrocarpon magnusianum* на устойчивость к температурному стрессу

Исламова Н.А., Бухарина И.Л.

Удмуртский государственный университет, 426034, ул. Университетская-1, г. Ижевск, Россия.
buharin@udmlink.ru

Актуальность исследований связана с изучением роли консортивных связей растений с микромицетами в формировании устойчивости к стрессам. Определенные успехи достигнуты в изучении роли эндомикоризы и ее самой распространенной формы – арбускулярной микоризы, которая характерна для большинства современных филогенетических групп растений, представлена во всех биомах земного шара. Она формируется грибами, принадлежащими подотделу *Glomeromycotina* отдела *Mucoromycota*. Но использование арбускулярно-микоризных грибов в растениеводстве ограничено, что является следствием их облигатной симбиотрофии. В связи с этим особый интерес вызывает изучение роли других групп корневых микромицетов эндофитов и их отдельных представителей в формировании механизмов устойчивости у высших растений. Исторически, были выделены две группы эндофитов (*Clavicipitaceus* (C) и *Nonclavicipitaceus* (NC)) на основе филогении и признаков жизненного цикла. В целом эта разнородная группа грибов может оказывать сильное воздействие на растительные сообщества посредством обеспечения устойчивости растений к абиотическому и биотическому стрессу.

Одним из перспективных микромицетов является эндофит *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw. Его метаболиты могут быть использованы в борьбе с нематодами, он способен расти в условиях высокого содержания нефтепродуктов в почве. В серии авторских экспериментов установлено, что культура этого гриба способна выдерживать действие высокого осмотического давления, сохраняя рост культурального мицелия. А опыты с инокулированными данным грибом растениями показали возможность его использования в качестве агента повышения солеустойчивости и металлрезистентности растений.

Целью исследований являлось изучение влияния инокуляции культурой гриба *Cylindrocarpon magnusianum* на формирование адаптивных реакций растений к действию температурного стресса (на примере мятлика лугового (*Poa pratensis* L.)).

Для изучения влияния инокуляции на устойчивость растений к температурному стрессу, помимо использования контрольной, были предварительно подготовлены популяции гриба, культивируемые в условиях температур +33–37°C, т.е. адаптированные к высоким температурам. После инокуляции растения мятлика выращивались в условиях климатической камеры «BinderKBWF720» (Германия) при оптимальных (+25°C днем и +22°C ночью) и высоких (+37°C и +33°C соответственно) температурах. Состояние растений оценивалось по содержанию фотосинтетических пигментов (спектрофотометрический метод в ацетоновых экстрактах), биомассе (весовой метод), содержанию нитратов (ионометрический метод) и аскорбиновой кислоты (метод титрования экстракта). Определена степень развития грибной инфекции в корневой системе растений. Результаты обработаны в «Statistica 6.0» методами описательной статистики.

В условиях оптимального температурного режима через 2 недели после начала эксперимента, инокулированные растения отличались более высокими показателями содержания аскорбиновой кислоты в листьях по сравнению с контрольными не инокулированными растениями. У них отмечено достоверное снижение содержания хлорофилла *b* в листьях, существенное перераспределение пластического материала: увеличение надземной биомассы и снижение биомассы корневой системы ($p < 0,05$).

При культивировании в условиях температурного стресса у инокулированных растений по сравнению с контрольными достоверно снижалось содержание аскорбиновой кислоты в листьях, при этом у растений, инокулированных адаптированными популяциями гриба, содержание хлорофиллов было существенно выше, а каротиноидов – ниже по сравнению с контрольными растениями. Инокуляция адаптированными популяциями оказалась наиболее эффективной в условиях температурного стресса.

При сравнении реакции растений в условиях оптимальных и высоких температур выявлено, что температурный стресс у контрольных растений привел к росту содержания аскорбиновой кислоты, хлорофилла *a* и каротиноидов, при снижении содержания хлорофилла *b*. Аналогичные реакции наблюдались и у инокулированных растений. Роль инокуляции микромицетом *C. magnusianum* существенно проявилась через полтора месяца культивирования растений в условиях высоких температур: контрольные растения погибли, у инокулированных растений также наблюдалось отмирание надземной части, но при этом корневая система растений сохранила свою жизнеспособность.

Таким образом, можно заключить, что в условиях высоких температур у инокулированных растений происходят достоверные изменения содержания аскорбиновой кислоты, фотосинтетических пигментов в листьях, отмечены изменения в распределении пластического материала между надземной частью и корневой системой растений. Эти изменения имеют адаптивный характер.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ "Аспирант" № 19-316-90003.

Влияние ионных жидкостей на основе оксикоричных кислот на устойчивость растений огурца (*Cucumis sativus* L.) к солевому стрессу

Калацкая Ж.Н. , Недведь Е.Л.* , Гилевская К.С.** , Красковский А.Н.** ,
Куликовская В.И.** , Овчинников И.А.* , Ламан Н.А.**

*Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси.
Академическая ул., 27, Минск, Республика Беларусь.

** Институт химии новых материалов НАН Беларуси. Ф. Скорины ул., 36, Минск, Республика Беларусь.
kalatskayaj@mail.ru

В настоящее время проявляется значительный интерес к разработке ионных жидкостей (ИЖ) «целевого назначения» (task-specific), в которых анион или катион определяют специфические свойства соединения. В биологических и биотехнологических областях ИЖ нашли широкое применение из-за способности растворять белки, углеводы, ферменты, ДНК и другие биологически активные соединения, которые в обычных растворителях растворяются плохо или быстро теряют свои свойства. Оксикоричные (гидроксикоричные) кислоты являются предшественниками большинства фенольных соединений, которые регулируют защитные ответы растений. Однако они трудно растворимы в воде. Получение оксикоричных кислот в виде ИЖ является весьма перспективным способом оптимизации их биологической активности и повышения их биодоступности. Целью данной работы было изучение физиолого-биохимических особенностей растений огурца, обработанных ИЖ феруловой (ФК) и кофейной (КК) кислот, в условиях действия солевого стресса. ИЖ оксикоричных кислот синтезировали путем нейтрализации гидрокарбоната холина соответствующей кислотой. Структуру полученных соединений подтверждали методом ЯМР. Полученные ионные жидкости (холина ферулат и холина кофеат) полностью растворимы в воде. Объектом исследования служили растения огурца (*Cucumis sativus* L.), сорт «Малышок». Семена растений огурца предварительно замачивали в водных растворах ИЖ на основе оксикоричных кислот на 2 часа, после чего оставляли до полного высыхания. Контролем служили семена, замоченные в дистиллированной воде. Растения огурца выращивали рулонным способом до 7-дневного возраста в условиях искусственного освещения с интенсивностью 4 тыс. люкс, фотопериод: 14 ч – свет, 10 ч – темнота. Солевой стресс создавали, помещая рулоны с семенами огурца на 100 mM раствор хлорида натрия на весь период выращивания. В оптимальных условиях растения выращивали на дистиллированной воде. На начальном этапе работы оценивали влияние ИЖ ФК и КК в диапазоне концентраций 0,001 – 10 μ M на всхожесть и биометрические показатели растений огурца, формирующихся в оптимальных условиях. В результате чего были выбраны наиболее эффективные концентрации ФК – 0,1 μ M и КК – 0,01 μ M, которые использовали в дальнейших исследованиях. Выращивание растений на 100 mM растворе NaCl оказывало негативное действие на рост растений. Биометрические показатели, такие как длина и масса проростков, снижались практически в 2 раза по сравнению с растениями в оптимальных условиях. При обработке ИЖ КК длина побега возрастала на 29%, масса побега на 21%, масса корней на 31% относительно стрессового контроля. Действие солевого стресса приводило к значительному возрастанию пролина и интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), которое оценивали по накоплению окрашенных продуктов с тиобарбитуровой кислотой – ТБК-продуктов. Так, количество ТБК-продуктов в семядолях контрольных растений увеличивалось в 1,5 раза относительно растений, находящихся в оптимальных условиях. При обработке ИЖ этот показатель снижался относительно стрессового контроля на 28% в варианте ИЖ ФК и на 33% в варианте ИЖ КК. Необходимо отметить, что обработка ИЖ ФК и КК приводила к снижению уровня ТБК-продуктов у растений в оптимальных условиях выращивания в среднем на 32% относительно контроля. Содержание пролина при действии солевого стресса возрастало относительно растений из оптимальных условий выращивания в 4 раза – варианты контроль и ИЖ КК, и в 6 раз – вариант ИЖ ФК. При этом обработка ИЖ приводила к снижению уровня данной аминокислоты относительно стрессового контроля на 24% при обработке ИЖ ФК и на 35% при обработке ИЖ КК. Таким образом, обработка семян огурца ИЖ на основе ФК 0,1 μ M и КК 0,01 μ M способствует повышению устойчивости растений огурца к действию солевого стресса, что выражается в снижении интенсивности процессов ПОЛ и уровня пролина как показателей стрессового состояния растений.

Влияние кадмия, меди и никеля на метаболитный профиль листьев *Betula pubescens*

Пожванов Г.А., Дроздова И.В., Беляева А.И., Калимова И.Б., Шаварда А.Л., Алексеева-Попова Н.В.

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, 197376, ул. проф. Попова, 2, Санкт-Петербург, Россия.
pozhvanov@binran.ru

В северо-таежной части России *Betula pubescens* Ehrh. является одним из доминантов растительных сообществ. Её ценность определяется пластичностью, неприхотливостью, способностью расти и возобновляться в различных лесорастительных условиях, в т.ч. при разных уровнях антропогенного загрязнения. Представляет интерес изучение влияния повышенных доз тяжелых металлов Cd, Cu и Ni экспериментальных условиях на развитие растений *Betula pubescens*. Метаболитная сеть, или низкомолекулярный метаболитный контент, наряду с информационными и структурными макромолекулами, составляет важнейшую и неотъемлемую часть любого биологического объекта, рассматриваемого в контексте феномена жизнедеятельности, поэтому её динамика является достойным объектом таких исследований. Для формализации состояния метаболитной сети мы используем т.н. метод серийного метаболитного профайлинга, позволяющий построить статистические модели динамики изменения метаболома в эксперименте. Особенностью профайлингового массива данных является квантированная оценка роли каждого из обнаруженных метаболитов в функционировании модели изучаемого явления. В то же время полученные результаты возможно обсуждать на привычном для классической физиологии уровне описания участия отдельных метаболитов в конкретных физиологических процессах.

Опыты с сеянцами в возрасте 2 месяца от появления всходов проводили в песчаной культуре с внесением солей Cu, Ni и Cd в двух концентрациях 1 и 5 мМ. Образцы отбирали три раза в ходе развития растений: на 3-и, 7-е и 10 сутки после внесения металлов. Метаболиты экстрагировали в три этапа с метанолом, изопропанолом и водой, их ТМС-производные после дериватизации анализировали методом газовой хроматографии–масс-спектрометрии на приборе LECO Pegasus 4D. Полученные данные после множественного выравнивания, деконволюции и идентификации метаболитов анализировали методом PLS-DA. Концентрацию Cd, Cu и Ni в листьях определяли на атомно-абсорбционном спектрометре AAS-1N после сухого озоления растительного материала при 400° и растворения золы в смеси кислот 3.71M HCl и 1.5 M HNO₃.

Установлено, что наиболее резкое увеличение концентрации Cd и Ni в листьях наблюдалось на 10-е сутки после внесения металлов. При внесении в среду 5 мМ количество Cd возрастало более чем в 7 раз, а Ni – в 3 раза по сравнению с 3-мя сутками и достигало для Cd 85 мг/кг и для Ni – 43.6 мг/кг сухой биомассы. В концентрации 1 мМ поступление этих металлов в ткани растения происходило более равномерно и в меньших количествах. Содержание Cu в листьях опытных и контрольных растений в ходе эксперимента статистически значимо не изменялось.

В метаболитном профиле листьев *Betula pubescens* обнаружили более 300 соединений, из них идентифицировали 100 метаболитов, включая все основные классы первичных метаболитов. Показано, что расхождения метаболитных профилей в ответ на обработку Cd, Cu и Ni развиваются в ходе эксперимента постепенно, зависят от продолжительности экспозиции и максимально выражены к 10 сут. Внесение в среду избытка Cd приводило к резкому снижению содержания в листьях большинства метаболитов: в среднем на 90%, среди которых для различий с метаболитным профилем контрольных растений были наиболее важны уровни фосфата, этаноламина, аланина, глицина, пролина, триптофана, треонина, цистеина, глицерола, молочной кислоты, янтарной кислоты, аскорбата, мальтотриозы. Напротив, уровень α -токоферола – фенольного антиоксиданта, участвующего в устойчивости растений к тяжелым металлам, многократно (5–10 раз) возрастал на фоне Cd в концентрации 1–5 мМ. Эта реакция была специфичной и не наблюдалась под действием Ni и Cu: на фоне повышения их концентраций содержание α -токоферола снижалось умеренно (на 10–70%). Известно, что в механизмах детоксикации изученных металлов существуют значительные различия и их связывают с разными группами химических соединений. В отличие от Cd, влияние повышенных концентраций Ni 5 мМ в среде выражалось в умеренном снижении (в среднем на 50%) в листьях уровней фосфата, глицерола, пролина, глицина, цистеина, в то время как содержание аланина, серина, триптофана, аскорбата, эпигаллокатехина при этом увеличивалось на 10–60% по сравнению с контролем. Интересно, что Ni 1 мМ вызывал 9-кратное увеличение содержания в листьях стресс-протекторной аминокислоты пролина, что демонстрирует адаптивный характер ответа метаболической сети. Обработка Cu 5 мМ также приводила к снижению уровня метаболитов, изменявшихся под воздействием Cd и Ni, однако в меньших пределах (в среднем на 40%). Однако анализ PLS-DA показал, что расхождение метаболитных профилей между контрольными и обработанными медью растениями было при повышенной дисперсии минимально по сравнению с Cd и Ni. В целом, отклик метаболитного профиля на стресс в значительной степени зависел от типа металла и был более выражен при увеличении его концентрации.

Можно заключить, что при внесении в среду одинаковой дозы тяжелых металлов в листьях *Betula pubescens* в наибольших количествах накапливался Cd. Поступление Cd оказало существенный эффект на метаболитный профиль листьев: уровни ряда метаболически важных органических соединений резко снижались, что отражает высокую степень токсического действия Cd. Под влиянием Ni уровни ряда метаболитов также уменьшались, но менее значительно. Минимальное влияние на содержания метаболитов в листьях оказала Cu. Отмеченное резкое повышение содержания α -токоферола под влиянием 1 и 5 мМ Cd и пролина под действием Ni в концентрации 1 мМ можно отнести к механизмам формирования устойчивости к токсическому действию тяжелых металлов. Устойчивость *Betula pubescens* к тяжелым металлам делает его перспективным для использования в целях фиторемедиации загрязненных ими территорий.

Работа была выполнена при поддержке РЦ «Развитие клеточных и молекулярных технологий» СПбГУ.

Влияние карбоангидразы САНЗ на стабильность водоокисляющего комплекса фотосистемы 2 из *Chlamydomonas reinhardtii*

Шукушина А.К., Терентьев В.В.

ИФПБ РАН, Пущино, Россия.
sshukshinka@gmail.com

Карбоангидразы (КА) – это широко распространенные в природе ферменты, катализирующие обратимую реакцию гидратации CO_2 . Они вовлечены во многие метаболические процессы практически во всех живых организмах. Предполагается их возможное участие и в работе фотосистемы 2 (ФС2). Известно, что α -КА САНЗ из *Chlamydomonas reinhardtii* является на сегодняшний день единственной идентифицированной КА, которая ассоциирована с пигмент-белковым комплексом ФС2. В данной работе исследуется влияние САНЗ на функцию водоокисляющего комплекса (ВОК) ФС2 под воздействием различных стрессовых факторов, таких как повышенная концентрация NaCl, термоинактивация, фотоинактивация и др. В качестве объектов исследования мы использовали мембранные частицы, обогащенные ФС2, изолированные как из дикого типа (ДТ) зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, так и из мутанта *cia3*, с отсутствующей САНЗ в люмене тилакоидов. Показано, что в препаратах ФС2 из *cia3* NaCl оказывают более негативное воздействие на функцию ВОК при концентрациях 50–100 мМ (рН 6,5), по сравнению с ДТ, а дополнительное инкубирование с NaCl проявляется в более сильном подавлении функции ВОК в ФС2 из *cia3* по сравнению с ДТ (при 100 мМ NaCl снижение O_2 -выделяющей активности на ~50% в течение 30 мин). Инкубирование при повышенных температурах в темноте оказывает более выраженное подавление O_2 -выделяющей активности препаратов ФС2 из *cia3*. Так, инкубирование при 40 °С препаратов ФС2 из ДТ и из *cia3* приводит к снижению их активности на 50% через 25 и 7 мин, соответственно. А при 50 °С через 1 мин препараты ФС2 из *cia3* теряли примерно 70% O_2 -выделяющей активности, в то время как препараты ФС2 из ДТ только 30%. В результате фотоинактивации красным светом ($1200 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2}\text{с}^{-1}$) препараты из ДТ и из *cia3* показывали разную скорость потери O_2 -выделяющей активности: у ДТ время полуспада кривой составляло около 60 мин, в то время как для *cia3* это значение составляло около 37 мин. Подобные эффекты свидетельствуют о нарушении нативной структуры ВОК в отсутствие САНЗ в препаратах из *cia3*. Это согласуется с результатами JIP-теста, где кинетика быстрой флуоресценции Хл (ОJIP) препаратов ФС2 из *cia3* характеризуется более выпрямленной J-P фазой и, соответственно, на 36% меньшей площадью над кривой, по сравнению с препаратами из ДТ, что объясняется подавлением переноса электронов между Q_A и Q_B на акцепторной стороне ФС2, в результате конформационных изменений белков реакционного центра, вызванных нарушением нативной структуры ВОК на донорной стороне. Подобные изменения в форме ОJIP-кривой наблюдались для препаратов из ДТ при сдвиге рН до 7,0, что должно вызвать конформационные изменения в белках ФС2. Но при этом, более выраженные изменения также наблюдались в препаратах ФС2 из *cia3* (уменьшение площади над кривой на 10 и 50% для ДТ и *cia3*, соответственно). Таким образом, мы предполагаем присутствие некоторых нарушений в структуре ВОК, вызванных отсутствием белка САНЗ вблизи ВОК ФС2, что делает ее более чувствительной к воздействию различных стрессовых факторов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90056.

Влияние качества света на формирование адаптивных поверхностей базилика эвгенольного (*Ocimum gratissimum* L.)

Тараканов И.Г., Яковлева О.С., Пыльцин Д.А.

Российский государственный аграрный университет-МСХА имени К.А. Тимирязева,
Ул.Тимирязевская, 49, Москва, Россия.
O_S_Yakovleva@mail.ru

Достаточно хорошо известно, что продуктивность и фотоморфогенез растений определяет соотношение лучей разного спектра. Особенно важную роль играют лучи красной и синей области. До конца не выяснено, какое участие они принимают в формировании адаптивных поверхностей листьев.

Базилик эвгенольный (*Ocimum gratissimum* L.) очень пластичная культура, имеющая большое количество сортов с разной окраской листьев и разным набором эфирных масел в них. Он широко используется для выращивания в открытом и защищённом грунте. Светокультура базилика представляет интерес для овощеводства. С внедрением новых технологий и использованием светоиспускающих диодов стало возможным тонкое регулирование продукционного процесса у разных культур. В последнее время всё шире стали использоваться системы интенсивного культивирования растений, создаются фабрики растений, где в качестве источников света применяются светоиспускающие диоды (СД). Именно светодиоды позволяют широко изучать влияние разных частей спектра на морфофизиологические процессы в растениях.

Для изучения влияния качества света на формирование адаптивных поверхностей листьев растений базилика проводились вегетационный опыт в почвенной культуре с выращиванием растений базилика сорта Эмили на специализированной установке «Люмитест», позволяющей задавать интенсивность различных участков спектра ФАР. В световом блоке использованы узкополосные светодиоды (СД) 460 нм (синий), 640 нм (коротковолновой красный), 660 нм (красный), 730 нм (дальний красный). Поканальное регулирование плотности потока фотонов позволяет задавать различные варианты соотношения отдельных спектральных диапазонов в общем уровне облученности. Фотопериод составлял 18 часов, а ППФ – 150мкмоль/м²с.

Схема опыта была следующей:

1. Контроль. С (460 нм) + К (640 нм) + К (660 нм) + ДК (730 нм)
2. С (460 нм) + К (640 нм) + ДК (730 нм) - исключен К (660 нм)
3. С (460 нм) + К (640 нм) + К (660 нм) - исключен ДК (730 нм)
4. К (640 нм) + К (660 нм) + ДК (730 нм) - исключен С (460 нм)
5. С (460 нм)
6. К (660 нм)

В результате проведённого эксперимента было установлено, что качество света влияет на формирование адаптивных поверхностей у растений базилика. С практической точки зрения ценность этого растения состоит в его способности накапливать эфирные масла. Накопление и выделение эфирного масла растениями базилика связывают с развитием железистого аппарата, представленного двумя типами трихом: головчатыми волосками и пельтатными железками. Наибольшее количество железистых образований на единицу площади листовой пластинки было отмечено на листьях растений в условиях контроля и в варианте с КС. Важно отметить, что плотность расположения желез в вариантах с СС и – КС была вдвое ниже. Отсюда вытекает вывод о необходимости КС для формирования желез и активации биосинтеза эфирных масел.

Влияние климатогеографических и генетических факторов на адаптационную способность *Pinus sylvestris* L.

Галдина Т.Е.

Воронежский государственный лесотехнический университет имени Г.Ф. Морозова»,
Тимирязева 8, Воронеж, Россия.
invitro11@bk.ru

Адаптация к новым условиям среды – одно из основных свойств древесных растений, обеспечивающее саму возможность их существования, возможность выживать и размножаться. Адаптационная способность проявляется на разных структурных уровнях: от биохимии клеток до строения и функционирования как отдельного растения, так сообществ и экологических систем в целом. Адаптационные изменения в организме проявляются и закрепляются на протяжении эволюционного развития видов.

В своей работе мы особое внимание уделили *Pinus sylvestris* L., которая имеет очень широкую амплитуду распространения. Ареал ее распространения охватывает Сибирь и Европу, сосновые леса доходят до Лапландии, встречаются на юге Китая и Монголии, в Испании и Великобритании, очень широко распространена в Евразии. *Pinus sylvestris* L. образует популяции на песчаных, супесчаных, а также торфяных почвах, редко, но встречается на глинистых. Такая широкая экологическая амплитуда вида обусловлена возможностью приспосабливаться к различным условиям произрастания и занимать соответствующие природные ниши за счет высоких норм экологических реакций вида. Нормы экологической реакции вида – тот диапазон приспособительных возможностей вида, который достигается в процессе эволюции и закрепляется в генотипе.

Целью наших исследований – изучить и определить факторы, которые определяют высокую норму экологической реакции *Pinus sylvestris* L.

Первым этапом в своей работе мы провели исследования анатомо-морфологической структуры вегетативных органов. В результате исследований была определена общая закономерность адаптационной способности сосны обыкновенной, проявляющейся на уровне изменения микроструктуры хвои и однолетнего побега в зависимости от условий произрастания вида, а также при переброске семян из одних районов в другие. Отражена общая картина влияния генетических, климатолого-географических факторов на приспособляемость сосны обыкновенной, обеспечивающая устойчивость, продуктивность вида в том или ином районе, что способствует образованию популяции.

Вегетативные органы сосны обыкновенной первыми реагируют на изменение внешней среды. При перемещении в засушливые условия покровные ткани (перидерма) утолщаются, а толщина проводящих тканей, наоборот, уменьшается. Особенностью структуры вегетативных органов сосны в аридной зоне является мелкоклеточное строение тканей.

Данные исследования позволили отследить закономерность: при передвижении с северо-запада на юго-восток происходит значительное уменьшение диаметра клеток. То есть, в сухих экстремальных условиях Волгоградской области ткани растений имеют более мелкоклеточное строение на всех уровнях по сравнению с тканями сосны, произрастающей в зоне широколиственных лесов Брянской области. Толщина покровных тканей выполняет главную роль при адаптации вида к новым условиям произрастания. Размеры покровных тканей однолетнего побега увеличиваются при интродукции сосны обыкновенной в более экстремальные условия среды (зона сухой степи). Существенную роль в адаптации вида к новым условиям произрастания выполняют и размеры ассимиляционных тканей, которые изменяются в зависимости от условий среды произрастания: в более благоприятных условиях показатели максимальные, при интродукции в сухую степь – уменьшаются.

Сравнительно-анатомические исследования, проведенные в географических культурах и естественных борах сосны обыкновенной с целью изучения структуры хвои, однолетнего побега и выявления анатомической изменчивости, помогли получить данные об особенностях формирования вегетативных органов *Pinus sylvestris* L., об изменчивости и стойкости структурных признаков, путях приспособительной эволюции. Отмечено, что на параметры гистологической структуры, цитологических показателей хвои и однолетнего побега сильнейшее влияние оказывают экологические факторы, а именно условия среды и гидротермический коэффициент (ГТК) условий произрастания. Исследования микроструктуры хвои и однолетнего побега сосны обыкновенной в географических культурах происхождений из зоны широколиственных лесов, южной лесостепи и сухой степи, позволили отметить, что при попадании в одинаковые условия произрастания, параметры гистологической структуры и цитологические показатели выравниваются до местных экотипов. Таким образом, происходит структурная адаптация ассимиляционного аппарата к новым условиям произрастания, что определяет в целом продуктивность и устойчивость древостоев, продолжительность и интенсивность роста всех органов растения.

Влияние лактон- и кетонсодержащих brassinosterоидов на антиоксидантный статус растений при хлоридном засолении

Коломейчук Л.В., Вебер Е.И., Ефимова М.В.

Национальный исследовательский Томский государственный университет. Проспект Ленина, 36, Томск, Россия.
kolomeychuklv@mail.ru

В настоящее время в результате антропогенной нагрузки засолено более одной трети пахотных земель планеты. Засоление оказывает всестороннее негативное действие на растения, что приводит к снижению продуктивности сельскохозяйственных культур. В связи с этим актуальной проблемой растениеводства является повышение устойчивости растений к произрастанию на засоленных почвах. Одним из потенциальных регуляторов защиты растений от хлоридного засоления являются фитогормоны. Особый интерес из них вызывают brassinosterоиды.

Исследования проводили на растениях *Brassica napus L.* сорта Вестар канадской селекции. Семена проращивали в перлите на дистиллированной воде в течение 7 суток, после чего проростки переносили на жидкую питательную среду Хогланда–Снайдера (ХС) для дальнейшего культивирования под люминесцентными лампами L36W/77 Fluora («Osram», Германия) при плотности потока квантов ФАР 100 мкмоль/м²с в фитотроне с 16-ч фотопериодом и температурой 23 ± 0.5°С в фотопериод и 20 ± 0.5°С в течение ночного периода. После 2-х недельного роста на гидропонной установке в среде ХС растения переносили на ту же самую среду с добавлением 24-эпибрассинолида (ЭБЛ) или его предшественника в химическом синтезе 24-эпикастастерона (ЭКС) в концентрациях 10 нМ на 4 часа. Далее растения переносили на среду ХС без добавления brassinosterоидов на 20 часов. В дальнейшем их помещали на питательную среду ХС в отсутствие или в присутствии 150 мМ NaCl. Контрольные растения росли на стандартной среде ХС в течение всего эксперимента. Используемые в данной работе концентрации NaCl и brassinosterоидов были подобраны в предварительных опытах. Фиксацию растительного материала производили через 6 дней, после добавления в среду NaCl.

Одним из последствий действия засоления на растения является окислительный стресс, связанный, прежде всего, с нарушениями процессов фотосинтеза и дыхания. Для оценки интенсивности окислительного стресса в листьях рапса в условиях засоления была изучена степень проявления перекисного окисления липидов (ПОЛ), измеряемая по содержанию малонового диальдегида (МДА) в реакции с тиобарбитуровой кислотой.

Хлоридное засоление повышало уровень перекисного окисления липидов в надземной части растений. Уровень накопления МДА в листьях был выше на 24%, в стеблях на 17%, относительно контроля. Кратковременная гормональная обработка достоверно не влияла на интенсивность ПОЛ ни в оптимальных, ни в стрессовых условиях выращивания.

Для поддержания водного гомеостаза между основными внутриклеточными компартментами цитоплазмы и вакуолю в условиях засоления важная роль принадлежит совместимым осмолитам, одним из которых является пролин. Содержание пролина в ответ на действие NaCl увеличивалось в листьях в 6 раз, в стеблях и корнях в 11 раз. Уровень пролина в предобработанных гормонами и подверженных солевому стрессу растениях был аналогичен с его содержанием в присутствии одного хлористого натрия.

Как известно, для снижения негативного влияния окислительного стресса в растениях активируются антиоксидантные защитные системы, действие которых направлено на гашение активных форм кислорода (АФК). Одними из ферментов антиоксидантной системы, нейтрализующих АФК, являются супероксиддисмутаза (СОД) и пероксидаза (ПО). На воздействие соли растения отвечали увеличением активности СОД в 2.3 раза и ПО на 38%, относительно контрольных значений.

В оптимальных условиях при обработке растений ЭБЛ и ЭКС активность СОД возросла почти в 4.6 и 6.7 раз соответственно, относительно контрольного варианта. Активность ПО также повышалась в ответ на действие ЭБЛ на 27% и ЭКС на 57%, в сравнении с контролем.

Выявлена специфика действия стероидных гормонов в отношении активации ферментативной антиоксидантной системы у растений на фоне стресса. Так, кратковременная обработка ЭБЛ при последующем засолении приводила к почти шестикратному увеличению активности СОД, в то время как при добавлении в среду ЭКС это увеличение составляло 2.6 раза, что сопоставимо с действием одного стрессора. Активность пероксидазы при действии ЭКС с последующим засолением увеличивалась на 57%, в ответ на обработку ЭБЛ – только на 27%, что незначительно ниже повышения активности при присутствии только NaCl.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что кратковременная обработка корней лактон- и кетонсодержащими brassinosterоидами с последующим солевым стрессом индуцирует активацию ферментативной антиоксидантной системы в растениях рапса. При этом, специфика повышения активности ферментов зависит от структуры действующего brassinosterоида.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90093.

Влияние марганца на содержание аскорбиновой кислоты в листьях растений ячменя

Симонова О.А.

ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого».
Simolga07@gmail.com

Химический состав почвы, в том числе содержание элементов, оказывает влияние на развитие растений. При воздействии тяжелых металлов на растения могут изменяться как их морфометрические параметры, так и физиологические процессы. При этом важное значение имеет как недостаток, так и избыток элементов. Кислые дерново-подзолистые почвы характеризуются высоким содержанием подвижных, доступных для растений соединений марганца, избыток которого может вызывать у них окислительный стресс. Вследствие усиления образования активных форм кислорода в растениях может изменяться содержание антиоксидантов, одним из которых является аскорбиновая кислота.

Объектами исследования служили растения ячменя сортов: Белгородский 100; 346–09; 29–11; Фермер; Форвард; Бионик из рабочей коллекции лаборатории селекции и первичного семеноводства ячменя ФГБНУ ФАНЦ Северо-Востока. Ячмень выращивали в течение 14-и суток методом «Водная культура». В течение первых 7ми дней растения выращивали в дистиллированной воде, далее – на питательном растворе Кнопа ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 - 1$; $\text{K}_3\text{PO}_4 - 0,25$; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,25$; $\text{KCl} - 0,125$ г. на 1 л. воды) с добавлением марганца, который вносили в виде соли $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ в концентрации 30, 60 и 90 мг/л действующего вещества (д. в.). Контрольным фоном служил раствор Кнопа без добавления соли марганца(II).

Выбор концентраций ионов марганца(II) был обусловлен тем, что предельно допустимые концентрации (ПДК) подвижных соединений марганца (извлекаемых ацетатно-аммонийным буфером с $\text{pH}=4,8$) для дерново-подзолистых почв с $\text{pH}=4,0$ в соответствии с ГН 2.1.7.2041-06 составляет 60 мг/кг. Вносимые дозы марганца соответствовали 0,5; 1,0 и 1,5 ПДК. Содержание аскорбиновой кислоты в листьях растений ячменя определяли методом ее экстрагирования метафосфорной кислотой и взаимодействием гомогената с фосфатом натрия. Оптическую плотность раствора определяли на спектрофотометре при длине волны 265 нм.

Согласно полученным данным содержание аскорбиновой кислоты в листьях растений исследуемых сортов ячменя в контрольном варианте варьировало от 58,7 до 154,5 мг/г. При этом максимальное количество витамина С было выявлено у сорта 346–09 (154,5 мг/г). У двух сортов Белгородский 100 и Форвард количество аскорбиновой кислоты в листьях снизилось по сравнению с контролем при всех исследованных концентрациях ионов марганца(II). У сортов 346–09; 29–11; Фермер – при концентрациях исследуемого элемента в среде выращивания 60 и 90 мг/л. Кроме того, у сорта Фермер при дозе Mn в растворе 30 мг/л было зафиксировано увеличение содержания аскорбиновой кислоты по сравнению с контролем (138,1 мг/г и 214,8 мг/г витамина С в листьях ячменя в контроле и опыте соответственно). Из всех исследованных сортов ячменя только у сорта Бионик наблюдалось повышение количества витамина С во всех исследованных вариантах опыта по сравнению с контролем. В связи с тем, что аскорбиновая кислота является низкомолекулярным антиоксидантом, то снижение ее количества свидетельствует о нарушении физиологических процессов в растениях в результате воздействия стрессового фактора. В то же время повышение содержания витамина С говорит об устойчивости растений.

Таким образом, исследованные концентрации марганца в среде выращивания оказали разное влияние на содержание аскорбиновой кислоты в листьях растений ячменя. С одной стороны, ее количество уменьшилось у большинства исследованных сортов: Белгородский 100; 346–09; 29–11; Фермер; Форвард в вариантах опыта по сравнению с контролем. Следовательно, избыток марганца оказал негативное влияние на физиологические процессы в растениях ячменя. С другой стороны, содержание витамина С в листьях ячменя сорта Бионик повысилось при воздействии ионов марганца(II). Данное увеличение говорит о том, что сорт Бионик оказался устойчивым к воздействию повышенных концентраций марганца.

Влияние мелатонина на устойчивость огурца к действию засухи на начальных этапах онтогенеза

Головацкая И.Ф., Бойко Е.В., Плюснин И.Н., Нечаева М.В., Кадырбаев М.К., Лантнев Н.И.

Национальный исследовательский Томский государственный университет, пр. Ленина, 36, Томск, Россия.
golovatskaya.irina@mail.ru

Одним из значимых экологических факторов, определяющих жизнедеятельность растений, является вода. Именно доступность воды обеспечивает рост, минеральное питание и др. Дефицит воды как повреждающий фактор вызывает в растении неспецифический ответ – стресс. В силу накопления активных форм кислорода и азота изменяется окислительный статус растений. В растительном организме мобилизуются и формируются защитные системы, ориентированные сначала на стабилизацию его состояния, а в последующем и на возвращение его к нормальной жизнедеятельности. Известно, что устойчивость растений к абиотическим стрессорам повышают антиоксиданты, среди которых важную роль отводят мелатонину. Последний функционирует как двойной антиоксидант, удаляя самостоятельно радикалы или активируя ферментативные и неферментативные антиоксиданты. Отсутствуют данные об онтогенетической зависимости его протекторного действия на растение при засухе. Целью нашего исследования было изучение роли мелатонина в регуляции устойчивости огурца к действию засухи на начальных этапах онтогенеза. Изучено длительное влияние 1 мкМ мелатонина на физиологические характеристики 2- и 7-дневных проростков *Cucumis sativus* L. раннеспелого сорта Изящный, выращенных на питательной среде Мурасиге-Скуга (контроль). Имитацию засухи осуществляли за счёт снижения содержания воды при одном и том же уровне минеральных веществ (опыт). Растения культивировали при интенсивности освещения 150–170 мкмоль фотонов/м²с и температуре 22–24° С. В результате исследования показали, что действие засухи (50% содержание воды) не изменяло энергию прорастания семян на 2 сутки относительно нормы водообеспечения, тогда как мелатонина повышало интенсивность роста зародыша как при засухе, так и нормальном содержании воды. В процессе роста и развития проростка в условиях длительной засухи появлялись отклонения от его нормального фенотипа. В условиях дефицита воды у 7-дневных проростков удлинялся главный корень, но снижалось его ветвление. Этот фенотип корня обеспечивал бы растению в природе уход корня из зоны дефицита воды – уход от засухи. Перераспределение веществ и изменение физиологических процессов (увеличение окислительных процессов) приводило к двукратному уменьшению сырой массы. Мелатонин стабилизировал рост в длину корня и повышал его ветвление, при этом увеличивая сырую массу. Дефицит воды проявился на уровне фотосинтетического аппарата: уменьшилась площадь семядолей с сохранением уровня пигментов. Мелатонин увеличивал поверхность семядолей в условиях хорошей водообеспеченности, но снижал в условиях засухи. Уровень стресса оценивали по интенсивности перекисного окисления липидов. В условиях засухи окислительные процессы существенно увеличивались в корне и в меньшей степени в семядолях. Разная реакция проростков и их органов на действие засухи на 2 и 7 сутки свидетельствуют о неодинаковой их потребности в воде и, следовательно, величине стресса, которую следует преодолеть мелатонину.

Влияние микрорельефа на выживаемость и рост саженцев *Picea abies* под пологом древостоя

Новичонок Е.В., Харитонов В.А., Кикеева А.В., Никерова К.М., Софронова И.Н.

Институт леса КарНЦ РАН, ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Россия.
enovichonok@inbox.ru

Европейские бореальные леса представляют собой мозаику сообществ на различных стадиях восстановления после рубки и других катастрофических нарушений. Описанные ранее механизмы и модели развития и устойчивости лесных сообществ в настоящее время нуждаются в дополнительных исследованиях и возможно корректировке в связи с изменчивостью климата и участившимися природными катастрофами, с одной стороны, и внедрением новых технологий рубок и восстановления лесов, с другой. При этом все большее внимания уделяется сохранению биологического разнообразия, обеспечению устойчивости сообществ и поддержанию всего спектра экосистемных функций и услуг. С этой точки зрения особенно важно быстро восстанавливать полноценное лесное сообщество определенной оптимальной структуры, что невозможно без знания закономерностей и механизмов естественного возобновления основных лесообразующих пород.

Основные лесообразующие породы зоны бореальных лесов северной Европы – ель европейская (*Picea abies* (L.) H.Karst.) и сосна обыкновенная. Эти виды также являются доминирующими видами в коммерческом лесном хозяйстве. Однако, успешное естественное возобновление *P. abies* ограничено сложными условиями прорастания и высокой уязвимостью семян на ранних этапах онтогенеза.

Было показано, что формирование окон и разные формы микрорельефа оказывают непосредственное влияние на процессы восстановления: прорастание, приживаемость и рост *P. abies* в еловых лесах бореальной зоны через изменение напочвенного покрова, локального микроклимата и биотических отношений. Естественное возобновление *P. abies* приурочено к различным формам микрорельефа – микроповышениям, созданным действием случайных факторов, упавшей древесины и участкам с удаленной подстилкой и открытым слоем минеральной почвы.

С целью исследования эколого-ценотических и физиолого-биохимических механизмов возобновления *P. abies* под пологом древостоя мы провели полевой эксперимент, в ходе которого были искусственно созданы различные формы микрорельефа (микроповышения, удаление подстилки). Экспериментальные участки были заложены на опушке и под пологом леса. Нами было изучено влияние микрорельефа и условий роста (градиент полог-опушка) на (1) приживаемость, рост и биомассу саженцев *P. abies*; (2) распределение биогенных элементов (азот, углерод, фосфор) в системе почва-растение; (3) развитие микоризы у саженцев.

Исследование было проведено в подзоне средней тайги на северо-западе России (61°51' с. ш., 33°54' в. д.). Опытный участок был заложен в смешанном елово-лиственном насаждении, в условиях нормального увлажнения. Древостой представлен двумя поколениями ели (*P. abies*) (120 и 80 лет), сосной обыкновенной (*Pinus sylvestris*) (120 лет), осинкой (*Populus tremula*) и березой (*Betula pendula*) (80 лет).

Создание микроповышений сопровождалось снижением плотности почвы и улучшением аэрации и оказывало положительное влияние на развитие корневой системы и формирование микоризы у саженцев. Это приводит к увеличению поглощения воды и биогенных элементов, что отражается в увеличении их содержания в саженцах. Также у саженцев, растущих на микроповышениях, отмечалось увеличение отношения надземной биомассы к подземной за счет увеличения доли биомассы хвои, что позволяет им поглощать больше света. В конечном итоге эти изменения привели к увеличению приживаемости, роста и биомассы саженцев.

Удаление подстилки отрицательно сказывалось на росте корней (снижалась их биомасса) и формировании микоризы из-за высокой плотности минеральной почвы (горизонт В1). На фоне низкого содержания биогенных элементов в почве (по сравнению с необработанной почвой, но сходного с вариантом микроповышения), связанного с удалением плодородного гумусового слоя, это привело к низкому содержанию азота и фосфора в саженцах. Как результат этих изменений, мы отмечали снижение биомассы саженцев, по сравнению с саженцами, растущими на необработанной почве. Через два года после посадки удаление подстилки еще не сказалось на росте саженцев, но исходя из описанных выше изменений, мы ожидаем снижения прироста в следующие вегетационные периоды. Положительное влияние удаления подстилки на саженцы было связано только с незначительным увеличением выживаемости саженцев под пологом леса (при снижении их выживаемости на опушке), что было связано со снижением толщины слоя опада и, возможно, улучшением водного режима.

Влияние опушки было главным образом связано со снижением плотности древостоя, уменьшением количества опада и увеличением освещенности. Это привело к тому, что во всех вариантах на опушке выживаемость саженцев, их рост и биомасса были выше, по сравнению с саженцами, растущими под пологом.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00485 и средств федерального бюджета на выполнение государственного задания ИЛ КарНЦ РАН.

**Влияние минерального питания на показатели интенсивности
продукционного процесса яровой пшеницы**

Осипова Л.В., Курносова Т.Л., Быковская И.А.

ФГБНУ «Всероссийский НИИ агрохимии имени Д.Н. Прянишникова». 127550,
ул. Прянишникова, д.31А, Москва, Россия.
bykovskaya_irina@bk.ru

В вегетационных опытах на дерново-подзолистой среднесуглинистой почве с различным содержанием подвижного фосфора, определяли интенсивность физиолого-биохимических процессов и морфометрические характеристики яровой пшеницы в период цветения.

Показано, что обеспеченность минеральным питанием определяла уровень свободнорадикального окисления (СРО) в оптимальных условиях внешней среды. Установлено, что увеличение естественного плодородия почвы по содержанию подвижного фосфора от 46 мг/кг (почва 1) до 80 мг/кг (почва 2) и 196 мг/кг (почва 3), приводило к возрастанию уровня СРО, оцениваемого по величине продуктов перекисного окисления липидов мембран, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК пр), содержание которых увеличивалось на почвах 2 и 3 соответственно в 1.8 и 2.4, по сравнению с почвой 1. Возрастало и общее содержание фотосинтетических пигментов, в результате активации синтеза хлорофилла В и каротиноидов.

Наблюдаемые закономерности физиолого-биохимического статуса коррелировали с линейными размерами и массой колоса главного побега в период цветения яровой пшеницы.

Влияние наночастиц золота на морозоустойчивость пшеницы

*Венжик Ю.В. *, Дерябин А.Н. *, Попов В.Н. *, Мошков И.Е. *, Дыкман Л.А. ***

* Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, Москва, Россия

** Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Энтузиастов просп., 13, Саратов, Россия
jul.venzhik@gmail.com

Благодаря мощному развитию нанотехнологий внимание исследователей все больше фокусируется на изучении наночастиц и их взаимодействий с живыми системами. Наночастицы золота (ЗНЧ) представляют собой структуры размером до 100 нм, обладающие уникальными физико-химическими свойствами. Они способны проникать в растения, перемещаться из корня в побег и обратно, а также накапливаться в тканях и клетках. При этом ЗНЧ способны вызывать в растительном организме многочисленные изменения, касающиеся темпов роста, фотосинтетической активности, дыхания, работы антиоксидантной системы, структуры клеток и органелл, а также изменять уровень экспрессии некоторых генов. Важно, что значительная часть из изменений, которые происходят в растениях под влиянием ЗНЧ, имеет адаптивное значение. Однако в известной нам литературе отсутствуют исследования, в которых ЗНЧ рекомендуют как адаптогены, усиливающие устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды. В связи с этим, целью нашей работы явилось изучение влияния ЗНЧ на морозоустойчивость пшеницы и ряд показателей, важных для ее формирования – интенсивность роста, активность фотосинтетического аппарата, накопление растворимых сахаров в листьях.

В качестве объекта исследования использовали проростки озимой пшеницы сорта Московская 39, выращенные в условиях контролируемой среды. Коллоидные растворы ЗНЧ средним диаметром 15 нм были получены цитратным методом. Семена пшеницы замачивали в растворах ЗНЧ в концентрациях 0, 5, 10, 20 и 50 мкг/мл на 24 ч, после чего выращивали 10 сут при температуре 22°C на дистиллированной воде. Далее часть проростков закаливали при 2°C в течение 7 сут на свету. Морозоустойчивость закаленных и незакаленных проростков оценивали методом прямого промораживания. Об устойчивости судили по количеству неповрежденных проростков в процентах от общего числа промороженных растений. Рост оценивали по длине первого листа и по накоплению биомассы. Изучение CO₂-газообмена проводили на установке открытого типа с инфракрасным газоанализатором URAS 2T (Германия). Фотосинтетические пигменты экстрагировали 80% ацетоном и определяли спектрофотометрически по Wellburn (1994). Содержание глюкозы определяли глюкозооксидазным методом, а содержание фруктозы – спектрофотометрически по цветной реакции кетозы с резорцином, с последующим пересчетом содержания сахарозы (Nacamura, 1967).

Проведенное исследование показало, что обработка семян ЗНЧ увеличивает морозоустойчивость как незакаленных, так и закаленных проростков пшеницы. В первом случае все выбранные концентрации нанозолота оказались эффективными, но максимальный прирост устойчивости наблюдался при использовании концентраций 20 и 50 мкг/мл. У закаленных растений максимальный эффект достигался после обработки ЗНЧ в концентрации 20 мкг/мл, а при более высокой концентрации (50 мкг/мл) морозоустойчивость падала при снижении температуры промораживания. Можно предполагать, что для закаленных растений концентрация 50 мкг/мл оказалась избыточной для адаптации к холоду.

Увеличение холодоустойчивости под влиянием золотых наночастиц в концентрации 20 мкг/мл, оказывающей максимальный защитный эффект на растения, сопровождалось рядом адаптивных изменений, зависящих от температурных условий опыта. Так, в оптимальных температурных условиях у незакаленных проростков ЗНЧ усиливали интенсивность ростовых и фотосинтетических процессов, а также приводили к накоплению сухой биомассы листьев и увеличению содержания в них хлорофиллов. В условиях закаливающих температур ЗНЧ стимулировали процесс холодовой адаптации, а именно: ингибировали рост растений, но поддерживали активность фотосинтетического аппарата, обеспечивая накопление растворимых сахаров.

Таким образом, обработка семян ЗНЧ приводит к увеличению морозоустойчивости проростков пшеницы, при этом эффект зависит как от их концентрации, так и от сопутствующих условий, в частности, закаливались ли проростки при низкой температуре или были выращены в контрольных условиях.

Влияние наночастиц оксида цинка и его макродисперсной формы на рост и систему антиоксидантной защиты *Hordeum vulgare* L.

Азарин К.В., Касьянова А.М., Дуллий Н.Г., Усатов А.В.

Южный федеральный университет. Стачки пр., 294/1, Ростов-на-Дону, Россия.
azkir@rambler.ru

Наночастицы оксидов металлов все шире используются в промышленности, сельском хозяйстве, медицине и других сферах, что неизбежно приводит к их переносу и накоплению в окружающей среде. При этом именно растения, благодаря способности к поглощению и аккумуляции, играют решающую роль в таком переносе. Несмотря на то, что количество работ, посвященных исследованию воздействия наночастиц на растения, растет, влияние основных групп наноэлементов на основе тяжелых металлов все еще недостаточно изучено. Одними из наиболее используемых в наноиндустрии являются наноразмерные формы оксида цинка (нано-ZnO). В настоящее время количество исследований фитотоксичности наночастиц ZnO ограничено. Целью данного исследования было определение спектра и уровня физиолого-биохимических показателей и транскрипционной активности генов окислительного стресса при действии нанодисперсной и макродисперсной форм ZnO на растения ячменя (*Hordeum vulgare*) – одной из основных сельскохозяйственных культур, широко возделываемых во всем мире, и наиболее часто используемой в качестве модельного объекта для оценки токсичности химических веществ.

Объектом исследования служили проростки ячменя сорта Медикум 157 ОС. Вначале семена проращивали на влажной фильтровальной бумаге в течение 36 ч при температуре 24°C. Затем проросшие семена переносили в пластиковые контейнеры, содержащие суспензии с ZnO или нано-ZnO (< 50 нм) в концентрациях 300 и 2000 мг/кг. Контрольные растения выращивали на дистиллированной воде. Во время эксперимента все растения находились в одинаковых условиях: фотопериод 16/8 ч, освещенность 4±0,5 кЛюкс, температура 24 °C. Через 7 суток были измерены морфометрические показатели, активность биохимических процессов, а также проведен анализ уровня экспрессии генов окислительного стресса.

По результатам исследования показано дозозависимое снижение длины и массы корней и побегов, а также значительное накопление Zn в органах растений. Данные процессы особенно выражены при воздействии наноразмерной формы ZnO. Исследование антиоксидантной защитной системы выявило в основном повышение уровня восстановленного глутатиона и активности СОД, каталазы, глутатионредуктазы и глутатионтрансферазы. Степень такого повышения зависела как от концентрации, так и формы ZnO и была сильнее выражена в корнях, чем в побегах. Исследование транскрипционной активности продемонстрировало, что в корнях растений под воздействием оксидов металла, наряду с Mn-СОД, активно экспрессируется Fe-СОД, ассоциированная в основном с защитой хлоропластов. Анализ уровня экспрессии генов *Cat1* и *Cat2* показал, что основной вклад в повышение каталазной активности в обработанных проростках ячменя вносит изофермент САТ-1. В целом, в ответ на воздействие исследуемых форм ZnO в проростках ячменя происходит активизация антирадикальной защитной системы, которая эффективно предотвращает развитие окислительного стресса на ранних этапах онтогенеза растений. Подтверждением этому служит соизмеримый уровень МДА в тканях как контрольных, так и обработанных проростков. Тем не менее, при постоянном воздействии высоких концентраций ZnO, особенно в наноформе, такая активизация приводит к истощению энергетических ресурсов растения, что негативно влияет на его рост и развитие.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в области научной деятельности № 0852-2020-0029.

Влияние натурального биопрепарата Реглалг на фотосинтетическую деятельность растений груши

Титова Н.В., Бужоряну Н.С., Скурту Г.И.

Институт генетики, физиологии и защиты растений, Министерство образования, культуры и исследований Республики Молдова. Ул. Пэдурий, 20, Кишинев, Молдова.
nvtmd@mail.ru

Поиском путей повышения продуктивности и урожая являются развернувшиеся в последние годы исследования влияния натуральных биологически активных соединений на рост и развитие плодовых растений. К таким веществам относится препарат Реглалг, выделенный из биомассы водоросли рода *Spirogira sp.*, и зарекомендовавший себя как стимулятор роста и развития ряда однолетних культур. Научные данные в этом плане с плодовыми растениями и, в частности, с грушей практически отсутствуют. Начаты нами исследования влияния этого биорегулятора на важнейшие факторы в продуктивности растений: ростовые характеристики и фотосинтетическую деятельность деревьев груши показали их высокую отзывчивость на экзогенную обработку Реглалгом.

Исследования проводили в 2017 – 2019 г.г. в плодоносящем саду с 5-6 летними деревьями поздних сортов груши Выставочная и Ноябрьская и с трехлетними растениями сортов Ноябрьская и Сокровище в лизиметрах ИГФЗР. После цветения опытные растения были обработаны 0,05% водным раствором биопрепарата Реглалг, контроль – растения, опрыснутые водой. Проведены определения биометрии листьев и побегов, формирование фотосинтетического потенциала, определение интенсивности фотосинтеза и транспирации в токе атмосферного воздуха с помощью прибора LCI, дыхательного газообмена листьев на приборе Варбурга, изучение фонда фотосинтетических пигментов спектрофотометрическим методом, чистой продуктивности фотосинтеза листового аппарата.

Ответная реакция молодых и плодоносящих растений груши связана со стимуляцией фотосинтетической деятельности, что способствует повышению урожайности исследуемых растений. Показано, что значения фотосинтеза, дыхания и транспирации у опытных растений груши, как правило, превышали эти величины в контроле в 1,3 – 1,5 раза. Сравнение сортов демонстрирует генетическую особенность и индивидуальную реакцию каждого сорта на действие БАВ. В большинстве определений в течение вегетации фотосинтез сорта груши Выставочная превышает фотосинтез сорта Ноябрьская. Под влиянием Реглалга интенсивность фотосинтеза листьев у сорта Выставочная превышает показатели у сорта Ноябрьская в 1,5 раза.

Регуляторная роль биопрепарата сохранялась до конца вегетации. Показательной является величина отношения фотосинтеза к дыханию. У сорта Ноябрьская различия между вариантами невелики. У сорта Выставочная при использовании препарата Реглалг отношение фотосинтеза к дыханию в течение всей вегетации превышает контроль на 13%. Обнаружена положительная корреляция интенсивности фотосинтеза с процессами плодоношения. Урожайность сорта Ноябрьская в контроле и в опыте с Реглалгом равнялась соответственно 16,9 и 21,0 т/га.

Повышению ассимиляции углекислоты под влиянием БАВ способствовало увеличение массы и площади листьев у растений груши всех сортов. У молодых растений, обработанных Реглалгом, средняя величина массы и площади листа с начала и в течение всей вегетации на 11-13% выше контроля. У плодоносящих растений сорта Выставочная стимулирующее влияние Реглалга на эти значения проявляется сильнее, чем у сорта Ноябрьская. Отношение сухой массы листьев к сырой при использовании Реглалга на 8% выше контроля, что, как известно, свидетельствует об оптимальном соотношении фитогормонов во всем растении и характеризует физиологическое состояние растений. Удельная поверхностная плотность листьев, отражающая структурные особенности листа, у всех опытных растений в среднем за сезон, как правило, превышала контроль на 10 - 12%.

Было выявлено, что при обработке Реглалгом повышается количество составляющих пигментного фонда листьев (хлорофилла а, хлорофилла б, соответственно суммы хлорофиллов, суммы каротиноидов) в среднем у сорта Ноябрьская на 6-7% и у сорта Выставочная – в среднем на 15 % в сравнении с контролем. В течение вегетации эти значения изменяются, но влияние БАВ сохраняется. Это подтверждают расчетные данные по хлорофилльному индексу ($\text{г хлорофиллов а+б} \cdot \text{растение}^{-1}$) и хлорофилльному фотосинтетическому потенциалу, отражающему валовое содержание хлорофилла в растении за определенный период вегетации. В среднем за сезон этот процент такой же, как и содержание пигментов в листе.

Наряду со стимулированием роста и улучшением других характеристик фотосинтетического аппарата применение Реглалга способствует оптимизации фотосинтетической продуктивности растений груши. К примеру, у молодых растений груши сорта Ноябрьская средняя величина чистой продуктивности фотосинтеза листьев за сезон составляет в контроле 0,75 и в опыте с Реглалгом – 0,97 мг сухой массы листа $\text{дм}^{-2} \cdot \text{час}^{-1}$.

На основе комплексного исследования формирования и функционирования фотосинтетического аппарата растений поздних сортов груши разного возраста и в разных условиях произрастания. показано стимулирующее влияние препарата Реглалг на параметры листовой поверхности, интенсивность фотосинтеза, дыхания, пигментный фонд, чистую продуктивность фотосинтеза и урожайность растений. Полученные результаты представляют интерес в поиске способов оптимизации продукционного процесса деревьев груши.

Влияние недостатка и избытка цинка на некоторые физиолого-биохимические показатели растений ячменя

Батова Ю.В., Казнина Н.М., Титов А.Ф.

Институт биологии – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения
Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Пушкинская ул., 11, Петрозаводск, Россия.

batova@krc.karelia.ru

В условиях контролируемой среды изучали влияние недостатка и избытка цинка на ряд показателей роста (высота, сухая биомасса побега) и фотосинтетического аппарата (ФСА) (содержание хлорофиллов и каротиноидов, интенсивность фотосинтеза) у растений ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Нур. Помимо этого, в листьях определяли содержание малонового диальдегида (МДА) и активность двух основных антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы (СОД) и гваякол-зависимой пероксидазы (ПО). Растения выращивали в камере искусственного климата при температуре воздуха 22 °С, относительной влажности 60-70%, освещенности 10 клк, 14-часовом фотопериоде на питательном растворе Хогланда-Арнона. В зависимости от варианта в раствор вносили сульфат цинка в концентрации 2 мкМ (оптимальная концентрация, контроль) или 1000 мкМ (избыток). В варианте с дефицитом металла сульфат цинка в раствор не добавляли. Измерения проводили через 7 и 14 сут от начала действия стресс-факторов.

Проведенные исследования показали, что воздействие дефицита цинка в течение 7 сут не влияло на рост и состояние ФСА ячменя, значимых отклонений изученных показателей от контроля не наблюдалось. При этом активность СОД и ПО, а также содержание МДА, были ниже, чем в контроле, что косвенно свидетельствует об относительно низком уровне АФК в клетках. Спустя 14 сут роста растений при дефиците цинка было зафиксировано снижение (по отношению к контролю) накопления надземной биомассы (на 20%) и замедление скорости фотосинтеза (на 23%). При этом содержание фотосинтетических пигментов и активность антиоксидантных ферментов не отличались от контрольного варианта, а количество МДА оставалось ниже контрольных значений, указывая на отсутствие признаков развития окислительного стресса.

Избыток цинка в первые 7 сут также не вызывал торможения роста побега, но оказывал выраженное отрицательное воздействие на работу ФСА растений. Так, под действием 1000 мкМ цинка у проростков уменьшалось содержание хлорофиллов и каротиноидов (на 15% по отношению к контролю) и почти в 2 раза снижалась скорость фотосинтеза. Наряду с этим регистрировалось усиление окислительных процессов о чем свидетельствует повышение содержания МДА и активности СОД и ПО (в 4 и 5 раз по отношению контролю, соответственно). С увеличением продолжительности действия избытка цинка его негативное влияние на растения усиливалось. В частности, спустя 14 сут было отмечено уменьшение высоты и биомассы побега (на 18 и 40% по отношению к контролю, соответственно) и дальнейшее снижение количества фотосинтетических пигментов и скорости фотосинтеза. Помимо этого, в клетках продолжало увеличиваться содержание МДА, а повышение (по сравнению с контролем) активности ферментов было выражено слабее, чем после 7 сут действия высокой концентрации цинка.

В целом, действие как недостатка, так и избытка цинка в среде оказывает отрицательное воздействие на растения ячменя, вызывая торможение роста и снижение активности ФСА. Ингибирование фотосинтетической функции при избытке металла происходит на фоне развития в клетках окислительного стресса и связано, вероятно, с ослаблением антиоксидантной защиты. При дефиците цинка снижение скорости фотосинтеза не сопровождается усилением окислительных процессов и, очевидно, вызвано другими причинами, например, уменьшением активности карбоангидразы – одного из ключевых цинк содержащих белков, участвующих в фиксации углерода в клетках.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (тема № 0218-2019-0074).

Влияние немеханического изолирования микроспор на выход эмбрионных структур у озимой тритикале

Блинков А.О. **, Рубец В.С.* **, Халилуев М.Р.* ***

* Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева.
Тимирязевская ул., 49, Москва, Россия.

** Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии.
Тимирязевская ул., 42, Москва, Россия.
aoblinkov@gmail.com

Гаплоидные технологии стали незаменимым инструментом в селекции растений, с их помощью стало возможным закреплять ценные рецессивные признаки, проводить за короткие сроки интрогрессии генов устойчивости при отдалённой гибридизации, осуществлять манипуляции с уровнями пloidности и за один сезон получать чистые линии. Для эффективной работы с данными методами необходима большая исходная популяция удвоенных гаплоидов. В связи с этим, важной составляющей современных исследований является повышение эффективности формирования эмбрионных структур при культивировании различных эксплантов: пыльников и микроспор. Подбор условий и режимов для выделения микроспор у самоопыляющихся злаков особенно важен, поскольку у них тонкая, непрочная экзина, разрушение которой приводит к их гибели и снижению выхода гаплоидных растений соответственно. Таким образом, целью данной работы являлась модификация метода выделения и культивирования микроспор для повышения выхода гаплоидных растений озимой тритикале.

За основу настоящей работы для изолирования и культивирования микроспор был использован немеханический метод их выделения, который в английской научной литературе называют *shed-microspores culture*. Его преимуществом является меньшая подверженность микроспор стрессам, в отличие от механического изолирования, в котором присутствуют такие этапы как измельчение растительного материала (с помощью блендера или пестика), многократные центрифугирования, отделение дебриса через ряд фильтров, смена изолирующих и питательных сред.

Растительным материалом для исследований служил сорт озимой тритикале Тимирязевская 150. Донорные растения выращивали в полевых условиях. Использовали колосья, содержащие ранние одноядерные микроспоры. До этапа выделения микроспор предварительно колосья выдерживали в условиях темноты при 4°C в течение 7 суток. За этот период времени микроспоры достигали средней одноядерной вакуолизированной стадии развития. На восьмые сутки колосья подвергали поверхностной стерилизации 50%-ным раствором коммерческого средства Белизна в течение 10 минут, после чего промывали в стерильной дистиллированной воде 3 раза по 5 минут. Пыльники одного колоса (в среднем 120 пыльников) выделяли из цветковых чешуй, разрезали скальпелем пополам и помещали в колбы Эрленмейера, содержащие 20 мл неагаризованной питательной среды 190-2, предложенная Pauk et al., 2000. Таким образом, плотность микроспор в среднем составляла 60×10^3 микроспор/мл. Микроспоры инкубировали в темноте при 30°C на вращающемся шейкере-инкубаторе (Certomat B. Braun, Germany) (100 об/мин). Через 3-4 суток наблюдался выход микроспор из пыльников, который можно было отметить визуально (раскрытие продольных щелей пыльников, образованию мутной зернистой среды). Выход микроспор из пыльников был также подтвержден с помощью микроскопического анализа. На 5 сутки культивирования проводили отделение микроспор от пыльников путём фильтрования среды через нейлоновые фильтры с диаметром пор 90 мкм. Полученную суспензию с микроспорами продолжали культивировать в темноте при температуре 28°C до появления эмбриоподобных структур. Все полученные новообразования переносили на агаризованную питательную среду 190-2Cu для формирования полноценных растений. Культивирование осуществляли при 16/8-часовом фотопериоде и температуре 25°C.

Для сравнения эффективности данного метода выделения микроспор и получения гаплоидных растений параллельно была проведена серия экспериментов по культивированию изолированных пыльников согласно Wędrzony, 2003, а также изолированных микроспор согласно Pauk et al., 2000.

Изолирование микроспор по разработанному нами протоколу показало свою высокую эффективность: в среднем было получено 105 эмбрионных структур на 100 пыльников. В сравнении выход при культивировании изолированных пыльников составил в среднем 32 эмбрионные структуры на 100 пыльников, в то время как метод культивирования изолированных микроспор в наших условиях оказался крайне неэффективным, поскольку его применение не позволило получить ни одного новообразования.

Формирование и выход зелёных растений при использовании метода изолированных пыльников и собственного разработанного протокола были сравнимы: около 24% растений от общего количества эмбрионных структур, из которых только 10% оказались зелёными. Большинство полученных растений оказались альбиносами. Таким образом, в конечном итоге для метода культивирования изолированных пыльников эффективность составила 3.8 зелёных растения с колоса, а для собственного разработанного протокола – 12.6 зелёных растений с колоса.

Влияние нефтяного загрязнения на рост и эндомикоризу люцерны

Кураמיшина З.М. *, Саттарова Л.Р. **

* Стерлитамакский филиал Башкирского государственного университета. Ленина пр., 49, Стерлитамак, Россия.

** Башкирский государственный университет. Заки Валиди ул., 32, Уфа, Россия.

kuramshina_zilya@mail.ru

Нефтепродукты являются одними из наиболее распространенных и опасных токсикантов. Основными загрязнителями являются: нефтеперерабатывающие заводы, трубопроводы и насосные станции. Отрицательное воздействие на почву и растительность, воздух, поверхностные и грунтовые воды, экологические системы и здоровье человека наблюдается на всех этапах промышленного использования нефтепродуктов: при переработке, хранении, транспортировке. Почвы, загрязненные углеводородами, пагубно влияют на почвенные микроорганизмы, растения и экосистемы в целом. Нефтепродукты, попадая в почву, заполняют поры и вода и воздух перестают поступать к корням растений, что приводит к засухоподобным симптомам.

Цель работы – исследовать влияние нефти на рост, физиолого-биохимические показатели и эндомикоризу растений люцерны (*Medicago sativa*). Нефть вносили в почву в концентрациях 1; 20 и 50 г/кг почвы. В качестве субстрата использовали чернозём выщелоченный. Растения выращивали в течение 60 дней, затем аккуратно извлекали растения из земли, не повреждая корней и листьев, промывали в проточной воде, определяли массу и длину побегов и корней. Корни отмывали, окрашивали и анализировали на наличие микоризы. Определяли активность каталазы, пероксидазы, уровень малонового диальдегида (МДА) и содержание свободного пролина.

В результате проведенных экспериментов было показано, что низкая концентрация нефти 1 г/кг почвы стимулировала рост растений, а высокие концентрации (20 и 50 г/кг почвы) – подавляли. С ростом концентрации степень ингибирования роста повышалась. Появление поллютанта в почве вызывало окислительный стресс у растений. Активность каталазы в растениях, выросших на почвах, загрязненных нефтью, была выше по сравнению с контролем. Наиболее высокая активность каталазы наблюдалась при концентрации нефти 20 г/кг почвы, однако, при дальнейшем увеличении концентрации до 50 г/кг активность каталазы уменьшалась, но была выше, чем у растений, выросших в почве без внесения нефти. С ростом концентрации нефти наблюдали увеличение и активности пероксидазы. Количества малонового диальдегида в растениях, выросших при концентрации нефти 1 г/кг почвы, было на 8,7 % выше по сравнению с контролем. При концентрациях нефти 20 и 50 г/кг почвы содержание малонового диальдегида относительно контроля повышалось на 1,58 и 4,74%, соответственно.

В ходе эксперимента наблюдали и изменение уровня пролина. При внесении нефти в количестве 1 г/кг почвы наблюдался самый высокий показатель содержания свободного пролина (в 2,3 раза выше, чем у растений, выросших без нефти). При концентрациях нефти 20 и 50 г/кг почвы пролин в растениях увеличивался в 2 и 1,8 раза, соответственно (относительно контроля). Повышение содержания свободного пролина в растениях при загрязнении почвы нефтью, вероятно, связано с осмотическим стрессом. Как известно, недостаток влаги может быть связан с покрытием корней растений гидрофобной нефтяной пленкой. Также увеличение пролина служит ответной реакцией растения на окислительный стресс, вызванный углеводородами нефти. Его выработка необходима организму для поддержания клеточного рН и дезактивации продуктов перекисного окисления липидов.

Известно, что арбускулярные микоризные грибы (АМГ), почти повсеместно встречающиеся корневые симбионты растений, улучшают здоровье растений в ряде стрессовых условий, включая высокие температуры, засуху, засуху и загрязнение тяжелыми металлами. Существуют также некоторые доказательства того, что АМГ может способствовать повышению фиторемедиации органических веществ, но механизмы, лежащие в основе этой активности, остаются неизвестными. Ряд микоризных грибов активно метаболизируют углеводородные загрязняющие вещества, но количество АМГ, как правило, полагают, зависит от обеспеченности почв углеродом. В некоторых почвах АМГ может косвенно изменять функцию почвы, модифицируя бактериальные или эктомикоризные сообщества, но неизвестно, происходит ли это в загрязненных почвах. Хотя симбиозы растений и АМГ широко распространены и часто взаимовыгодны, органические загрязнители могут негативно влиять на эти отношения, приводя к снижению роста АМГ, колонизации корней, а также созреванию и прорастанию спор. Нами показано, что корни контрольных растений люцерны, выросших на незагрязненной нефтью почве, характеризовались высокой частотой встречаемости микоризы (70%). У растений, выросших в условиях нефтяного загрязнения, наблюдали понижение частоты встречаемости (F,%). Так при концентрации нефти 1 г/кг, 20 г/кг и 50 г/кг почвы, частота микоризации понижалась на 2,0; 26,5 и 44,2 %, соответственно, по сравнению с растениями, выросшими на незагрязненной почве. Более резкое снижение наблюдали при анализе интенсивности микоризации (M,%) корней (при концентрации нефти 1 г/кг, 20 г/кг и 50 г/кг почвы интенсивность колонизации микоризы в корневой системе падала на 64,9%, 95,6% и 96,5%, соответственно, по сравнению с контролем. Углеводороды нефти снижали показатели частоты и интенсивности микоризации корня растений, но обилие арбускул в микоризованной части корневых фрагментов было высоко, что свидетельствует о том, что симбиоз при этом остается функциональным.

Влияние низкой положительной температуры на антиоксидантную систему кукурузы

Табаленкова Г.Н., Силина Е.В.

Институт биологии Коми научный центр РАН. Коммунистическая 28, Сыктывкар, Россия.
tabalenkova@ib.komisc.ru

В условиях Севера первостепенное значение для выживания растений имеет их способность адаптироваться к воздействию низких температур. К настоящему времени основные закономерности и особенности формирования холодоустойчивости однолетних растений достаточно хорошо изучены, хотя некоторые аспекты этой проблемы требуют проведения дополнительных исследований. Это особенно актуально в условиях севера, где в связи с расширением в сельскохозяйственном производстве ассортимента возделываемых культур, используется продуктивная, но теплолюбивая кукуруза, часто страдающая от низких положительных температур в начале вегетационного периода. Учитывая это, целью данного исследования явилось изучение влияния низкой положительной температуры на антиоксидантную систему кукурузы. Растения кукурузы сорт Дорка в фазе 4-х листьев выдерживали 3 ч в холодильной камере при температуре +6⁰С, затем переносили на 2 ч в температуру +20⁰С (последействие). Другую часть растений оставляли при температуре +20⁰ (контроль). Определяли содержание растворимого белка, пероксида водорода, свободных аминокислот, активность СОД и интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ). Проведенные опыты показали, что низкая положительная температура вызывала существенное уменьшение содержания в листьях растворимого белка, незначительное снижение активности СОД и достоверное уменьшение активности ПОЛ. В период последействия содержание в листьях растворимого белка и активность СОД практически не изменилось, а интенсивность ПОЛ приблизилось к контрольному значению. После трех часового охлаждения в листьях наблюдается тенденция к снижению содержания хлорофиллов и каротиноидов, особенно, в 2.5 раза, β-каротина, принимающего непосредственное участие в тушении О₂. По мнению Вл.В.Кузнецова снижение содержания β-каротина вызванного ингибированием синтеза является показателем чувствительности культуры к холоду. К основным исходным веществам, обеспечивающим синтез белков, относятся свободные аминокислоты (АК), именно они являются одними из самых активных участников метаболизма. Анализ данных показал, что в ответ на понижение температуры в листьях кукурузы в 1.8 раз увеличилось содержание свободных АК при снижении содержания растворимого белка. Накоплено большое количество косвенных доказательств, что пролин обладает антиоксидантными свойствами, которые связывают с его способностью стабилизировать структуры белков и мембран за счет образования гидрофильных оболочек, что в свою очередь препятствует инактивации белков гидроксильными радикалами и синглетным кислородом. Исследования показали, что при трех часовой экспозиции кукурузы при T= 6⁰С в листьях наблюдали значительное, по сравнению с контролем (в 3 раза), увеличение содержания пролина, уровень которого сохранялся и после прекращения холодового воздействия. При этом в 1.5 раза повышается содержание так называемых «стрессовых», АК (аланин, фенилаланин, γ-аминомасляная пролин,) и непротеиногенных АК, участвующих в общем адаптивном ответе растений на стресс. Следует отметить, что накопление непротеиногенных АК продолжалось и в период последействия (+20⁰ С). Для характеристики интенсивности метаболических процессов в растительной клетке используется отношение дикарбоновых кислот (аспарагиновая+глутаминовая к-ты, Σ₁) к ароматическим (тирозин+ фенилаланин, Σ₃). Показано, что при высоких скоростях метаболизма отношение меняется в сторону накопления дикарбоновых АК, при низких ароматических АК. Как показали наши опыты при понижении температуры у листьев отношение Σ₁ : Σ₃ увеличивается с 20 до 30. После прекращения холодового воздействия отношение Σ₁ : Σ₃ снижается почти в 3 раза. Следовательно, ответной реакцией на понижение температуры было интенсификация метаболизма связанного с репарационными процессами в листьях. Рассматривая влияние температуры на корреляционные связи между данными показателями можно отметить, что значимая отрицательная корреляция наблюдалась в листьях (r = - 0.93) между активностью СОД и содержанием растворимого белка, содержанием пролина и активностью СОД, между содержанием Н₂О₂ и активностью ПОЛ (r = - 0.77). Сравнительно низкая активность СОД, ПОЛ в листьях растений, подвергнутых воздействию температуры +6⁰С, очевидно связана с невысоким содержанием в клетках активных форм кислорода. Способность растений поддерживать баланс АФК в клетках при продолжительном воздействии низкой температуры говорит об эффективной работе в листьях антиоксидантной системы. Таким образом, полученные результаты позволяют сделать заключение об ответных реакциях растений кукурузы на понижение температуры. Отмечено, что даже относительно непродолжительное (3-х ч) воздействие низкой положительной температуры (+6 °С) вызывает у растений кукурузы снижение активности СОД и ПОЛ при усилении образования в тканях пероксида водорода, свободных и стрессовых аминокислот. Между некоторыми показателями существуют выраженные реципрокные отношения, которые наиболее четко заметны между уровнем пролина и активностью СОД.

Влияние низкоинтенсивного переменного магнитного поля и гипертермии и их комбинирования на содержание супероксидного анион-радикала и гидроперекисей в высечках листьев гороха

Синицына Ю.В., Кальясова Е.А., Берестова Е.В., Веселов А.П.

Институт биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского,
пр. Гагарина, 23, г. Н.Новгород, Россия.
jsin@inbox.ru

Одним из главных отрицательных последствий гипертермии (ГТ) является окислительный стресс, в условиях которого необходимо нейтрализовать избыток активных форм кислорода. Поэтому большой интерес представляет поиск способов снижения негативного воздействия гипертермии с помощью использования других физических факторов, например магнитного поля (МП), которое может оказывать протекторный эффект. Целью данной работы стало определение характера действия магнитного поля по отношению к гипертермии при комбинировании их последовательного воздействия. Для достижения поставленной цели было проведено исследование влияния магнитного поля и гипертермии на содержание прооксидантов (супероксидного анион-радикала и гидроперекисей) в высечках листьев гороха.

Растения гороха *Pisum sativum* L. выращивали методом водной культуры, культивировали в климатической камере в режиме день/ночь 16/8 и при температуре 23 °С. Для исследований использовали проростки возрастом 14 дней. Условия гипертермии создавали помещением растений в термостат на 60 мин при 42 °С. Для создания переменного МП (частота 15 Гц, индукция 1,5 мТл) использовали магнитотерапевтическую установку (ElectroBiology Inc., США). Содержание супероксидного анион-радикала и сумму гидроперекисей определяли в высечках листьев спектрофотометрически по реакции с нитросиним тетразолием и ксиленоловым оранжевым соответственно.

В первой серии опытов исследовалась зависимость содержания прооксидантов в высечках листьев от времени воздействия физических факторов – растения обрабатывали МП или ГТ в течение 60 и 120 мин. После обработки МП показано снижение содержания супероксидного анион-радикала на 20% после 120 мин обработки, гидроперекисей – на 15% после 60 и 120 мин обработки. Гипертермия вызывала дозозависимое увеличение (по отношению к контролю) продукции супероксидного анион-радикала в 3,3 раза после 60 мин обработки и в 5 раз после 120 мин, а гидроперекисей – в 1,5 и 1,7 раз соответственно.

Во второй серии опытов проводились исследования комбинирования (последовательного воздействия) физических факторов на содержание прооксидантов:

1. Высечки листьев растений 60 мин подвергались воздействию МП при температуре 23 °С, после чего помещались в условия ГТ еще на 60 мин. Сравнение проводили с высечками листьев, содержащимися 60 мин в присутствии геомагнитного поля при 23 °С и затем помещенных в условиях ГТ. Показано значительное повышение содержания прооксидантов во всех экспериментальных группах, особенностей воздействия переменного МП выявлено не было.

2. Высечки листьев растений 60 мин выдерживались в условиях ГТ, затем на 60 мин подвергались воздействию МП при температуре 23 °С. Сравнение проводили с высечками листьев, выдержанными 60 мин в условиях ГТ и еще 60 мин при температуре 23 °С в присутствии геомагнитного поля. Показано, что ГТ вызывает стойкое повышение уровня исследуемых прооксидантов (оно сохранялось через 60 мин после окончания действия ГТ), при этом воздействии МП вызывало дополнительное увеличение уровня супероксидного анион-радикала на 30%, а содержание гидроперекисей на 15%.

3. Провели сравнение последовательного действия исследуемых факторов: сравнивались показатели высечек из листьев, подвергнутых воздействию 60 мин ГТ с последующей обработкой переменным МП (60 мин), и листьев, обработанных переменным МП (60 мин), а затем помещенных в условия ГТ еще на 60 мин. Показано, что оба варианта обработки увеличивали содержание прооксидантов относительно уровня в растениях, выдержанных в контрольных условиях (120 мин, 23°С, геомагнитное поле). При этом вариант обработки с предшествующим воздействием МП вызывал большее увеличение и содержания супероксидного анион-радикала и уровня гидроперекисей.

По результатам работы можно заключить, что исследуемые физические факторы вызывали разнонаправленные изменения содержания прооксидантов в высечках листьев: гипертермия значительно увеличивала, а переменное магнитное поле несколько уменьшало как содержание супероксидного анион-радикала, так и уровень гидроперекисей. Последовательное воздействие обоих физических факторов в любой комбинации приводило к накоплению супероксидного анион-радикала и гидроперекисей, при этом обработка магнитным полем после гипертермического воздействия вызывала меньшее накопление прооксидантов, чем обработка растений переменным магнитным полем с последующим воздействием гипертермией. Таким образом, нами было показано компенсаторное действие низкоинтенсивного магнитного поля по отношению к гипертермии, протекторное действие магнитного поля выявлено не было.

Влияние низкотемпературной обработки на образование андроклиных структур в культуре изолированных пыльников и формирование растений-регенерантов у озимой пшеницы сорта Иркутская

Любушкина И.В.^{*,**}, Поморцев А.В.^{*}, Полякова М.С.^{*}, Арбузова Г.А.^{*,**}, Кириченко К.А.^{*},
Соколова Н.А.^{*}, Войников В.К.^{*}, Анапияев Б.Б.^{***}

* Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН. Лермонтова ул., 132, Иркутск, Россия.

** Иркутский государственный университет. Сухэ-Батора ул., 5, Иркутск, Россия.

*** Казахский национальный исследовательский технический университет им. К.И. Сатлаева, Казахстан.
mingronland@mail.ru

Современная биотехнология растений предлагает широкий выбор перспективных методов для получения новых сортов. Особый интерес среди них вызывают гаплоидные технологии, преимущество которых заключается в достаточно быстром получении чистых линий. Поскольку у гаплоидных растений каждый ген представлен в виде единственной аллели, то мы можем наблюдать равнозначное проявление рецессивных аллелей наряду с доминантами. Таким образом, в результате спонтанной диплоидизации или после проведения соответствующей процедуры, например, обработки колхицином, мы можем получить чистую гомозиготную линию в течение одного года. Один из применяемых в гаплоидии методов – это индуцированный андрогенез. Он основывается на получении гаплоидных растений из микроспоры или клеток пыльцевого зерна. Образование гаплоидов может происходить как путем прямого андрогенеза через образование эмбриоидов в культуре изолированных пыльников без промежуточных этапов, так и через каллусогенез. Несмотря на перспективность данного метода, его применение сегодня весьма ограничено, особенно для озимых культур. Это обусловлено наличием критических точек в ходе данной процедуры: так, некоторые сорта озимых злаков показывают низкую частоту образования эмбриоидов, другие – недостаточный выход растений-регенерантов. Еще одной проблемой применения данного метода у озимых злаков является образование растений-альбиносов, лишенных хлорофилла. В связи с этим целью нашей работы явилось изучение влияния низкотемпературной обработки на эффективность андрогенеза в культуре изолированных пыльников *in vitro* у озимой пшеницы. В работе использовалась озимая пшеница сорта Иркутская. Донорные растения в осенне-зимний период выращивали на станции искусственного климата (фитотрон) СИФИБР СО РАН. Температура поддерживалась интервале 22-26 °С, фотопериод составил 16 часов. Полив осуществляли еженедельно. В весенне-летний период донорные растения выращивали в поле на экспериментальном участке Заларинского агроэкологического стационара (деревня Тунгуй). Растительный материал отбирался на стадии трубкования. После срезки трубки помещались в воду и подвергались холодовой предобработке в климатических камерах BINDER при 4 °С в темноте в течение 3-15 суток. В асептических условиях донорные колосья обрабатывали 98% спиртом. Пыльники вычленились из 6-10 колосков средней трети колоса. Извлеченные пыльники помещались на модифицированную среду №6, соержащую 9% сахарозы, глицин (2 мг/л), аскорбиновую кислоту (1 мг/л), НУК (1 мг/л) и 2,4-Д (1 мг/л). После пересадки пыльники культивировали в темноте при температуре 26 °С в течение 4 недель до появления каллусов и эмбриоподобных структур. В дальнейшем эмбриоподобные структуры и каллусы переносили на среду для регенерации 190-2Cu с регуляторами роста НУК (0,5 мг/л) и кинетином (0,5 мг/л) или без регуляторов роста и помещали в темноту при 4 °С на 3, 5 или 7 суток. Затем сосуды с каллусами и эмбриоподобными структурами переносили под непрерывное освещение при 22-24 °С. Эффективность андрогенеза оценивали по частоте образования каллусов и эмбриоподобных структур к общему числу пыльников и частоте образования общего числа проростков и числа зеленых проростков к числу эмбриоподобных структур и каллусов. Нами было показано, что значимым фактором, влияющим на образование андроклиных структур в культуре изолированных пыльников озимой пшеницы сорта Иркутская является длительность холодовой предобработки донорных растений. Следует отметить, что для каждого генотипа температура и продолжительность такого воздействия на донорные растения устанавливается экспериментально. В нашей работе установлено, что максимальная частота образования эмбриоидов (1,5-2,5%) в культуре изолированных пыльников наблюдалась в тех случаях, когда длительность холодовой предобработки донорных колосьев составляла от 6 до 12 суток. В то же время максимальная частота образования каллусов (5-7%) в культуре изолированных пыльников регистрировалась после холодовой предобработки растений озимой пшеницы в течение 3-6 суток. Отметим, что к концу 2-ой недели холодового воздействия частота образования эмбриоидов в культуре изолированных пыльников снижалась почти в 4 раза. Изучаемый нами сорт озимой пшеницы Иркутская отличался весьма высокой частотой образования растений альбиносов – они составляли до 70% от общего числа растений-регенерантов, при этом доля лишенных хлорофилла альбиносных растений была ниже, если андроклиные структуры подвергались длительной холодовой обработке (в течение 7 суток). Таким образом, нами показано, что низкие положительные температуры являлись важным фактором, влиявшим на частоту андрогенеза в культуре изолированных пыльников и образование зеленых растений-регенерантов у озимой пшеницы.

Работа выполнена с использованием коллекций ЦКП «Биоресурсный центр» и оборудования ЦКП «биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта №20-34-80003 мол_эв_а.

Влияние плазменно-радиоволновых обработок на эффективность образования клубеньков на корнях у растений клевера лугового (*Trifolium pratense* L.)

Недведь Е.Л. , Калацкая Ж.Н.* , Усик А.В.* , Люшкевич В.А.** , Филатова И.И.** , Ламан Н.А.**

* Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси.
Академическая ул., 27, Минск, Республика Беларусь.

** Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси, пр-т Независимости, 68-2, Минск, Республика Беларусь.
nedved_e@tut.by

Симбиоз бобовых культур с клубеньковыми бактериями является одной из уникальных и эффективных растительно-микробных природных систем, осуществляющих процесс биологической азотфиксации и имеющий огромное экологическое значение. Создание высокопродуктивных растительно-ризобиальных комплементарных систем является актуальной задачей. Определенный интерес представляет технология управления растительными организмами посредством адресного воздействия сигналами физической природы. Обработка семян холодной плазмой и электромагнитными полями – это современная экотехнология, направленная на повышение эффективности растениеводства. Большая часть исследований в этой области сосредоточена на влиянии плазменных и радиоволновых обработок на прорастание семян, ранний рост проростков, изменения биохимических показателей растений. В данной работе изучали влияние плазменно-радиоволновых обработок на образование клубеньков у растений клевера лугового. Семена обрабатывали высокочастотными электромагнитным полем (ЭМП) и плазмой на частоте 5,28 МГц на экспериментальной установке Института физики НАН Беларуси. Плазменную обработку осуществляли в атмосфере воздуха при давлении 200 Па и вкладываемой в разряд удельной мощности порядка 0,025 Вт/см³. Обработку ЭМП проводили при атмосферном давлении. Время воздействия плазмы и ЭМП составляло 5 и 10 минут соответственно. Контролем служили необработанные растения. Посев семян осуществляли через 10 дней после их обработки. В полевых условиях при обработке семян плазмой у растений клевера 1-го года вегетации на стадии 1-2 тройчатых листьев отмечали возрастание длины корней на 27% по сравнению с контролем. Значительно увеличивалась и масса корней – в 1,5 раза по сравнению с необработанными растениями в варианте с обработкой ЭМП и в 2,5 раза в варианте обработкой плазмой. Так же отмечалось увеличение числа боковых корней при обработке семян плазмой, при этом возрастало и количество клубеньков на растение – на 50% по отношению к контролю. У растений клевера 2-го года вегетации также отмечалось увеличение числа клубеньков на растение при плазменно-радиоволновых обработках: на 27% в варианте обработки ЭМП и на 38% в варианте обработки плазмой, длина корней возрастала на 13% и 7% соответственно. Таким образом, увеличение количества клубеньков могло быть следствием возрастания площади поверхности корневой системы клевера при плазменной обработке семян. При выращивании растений до стадии формирования первого тройчатого листа в лабораторных условиях (освещенность 4 тыс. лк, режим освещения – 14 ч света, 10 ч темноты) на торфяном почвогрунте, марка «Двина» масса корней возрастала на 55% при обработке семян ЭМП и на 23% при обработке их плазмой по сравнению с контролем. Длина корней возрастала на 18% только в варианте обработки плазмой, однако клубеньки на корнях клевера во всех вариантах обработки практически не формировались. В связи с этим, чтобы оценить влияние плазменно-радиоволновых обработок на способность растений к нодулообразованию, проводили искусственное заражение микробным препаратом «Ризофос», марки «Клевер» (производитель Институт микробиологии НАН Беларуси) на основе эффективных штаммов клубеньковых и фосфатмобилизующих бактерий. Для этого на обработанные и контрольные семена клевера наносили суспензию биопрепарата из расчета 200 мкл на 1 кг семян (в соответствии с регламентом), тщательно перемешивали до полного смачивания семян. Количество клубеньков возрастало на 45% при обработке ЭМП и на 26% при обработке плазмой относительно контрольных растений, семена которых были инокулированы препаратом «Ризофос», но не подвергались плазменно-радиоволновым воздействиям. При этом длина корней оставалась на уровне контрольных растений, тогда как их масса значительно возрастала, в варианте ЭМП – на 47% в сравнении с инокулированным контролем. Сопоставление данных биометрических показателей корневой системы с таковыми у инокулированных биопрепаратом растений клевера показало сходство действия плазменно-волновых обработок на длину и массу корней. На основании полученных данных можно сделать вывод, что плазменно-радиоволновые обработки оказывали эффективное действие на способность к формированию клубеньков у растений клевера на фоне возрастания массы и длины корней. Таким образом, применение плазменно-радиоволновых обработок семян бобовых растений может являться эффективным для повышения биологического азота в почве и получения экологически безопасной продукции для человека и животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного комитета по науке и технологиям Республики Беларусь, грант № Ф19ЛИТГ-008.

Влияние полиметаллического загрязнения почв на физиологические параметры *Poa pratensis*

Силина А.К., Журавлева Д.Н., Горелова С.В.

Тульский государственный университет, Естественнонаучный институт, Тула, проспект Ленина, 92.
salix35@gmail.com

В связи со все возрастающим техногенным загрязнением почв и выбором стратегий их ремедиации, все более актуальной проблемой в настоящее время является изучение физиологической реакции растений на стресс, вызванный воздействием поллютантов.

Нами, в целях отбора растений, подходящих для задач фиторемедиации почв промышленных санитарно-защитных зон (СЗЗ) и СЗЗ автомагистралей, изучено влияние почв с превышением содержания комплекса тяжелых металлов на мятлик луговой (*Poa pratensis*).

Исследования проводились в рамках модельного эксперимента. Растения выращивались в лабораторных условиях в пластиковых кашпо объемом 1 л на почвах санитарно-защитных зон автомагистрали и предприятий металлургической промышленности г. Тулы. Полив проводился дистиллированной водой, для исключения дополнительного внесения элементов в почвы. Почва Косогорского металлургического завода (КМЗ) характеризовалась высоким содержанием Fe (78100 мг/кг), превышением ПДК по Mn (в 3,8 – 4,4 раза), и Zn (на 41%); почва Тулачермет характеризовалась аномально высоким содержанием Fe (120600 мг/кг), превышением ПДК (ОДК) по V-Mn (на 40-50% по V и на 10% по Mn), Ni (на 110-175%), Cu (на 127%), Zn (на 29-192%), As (на 115-220%) и нефтепродуктов (в 4 раза); почва пр. Ленина характеризовалась высоким содержанием Fe (37400 мг/кг), превышением допустимых концентраций Mn (на 6%), Cu (на 186%), почва набережной Упы под Криволученским мостом (напротив Оружейного завода) – высоким содержанием Fe, превышением ПДК по Mn, ОДК по Cr (в 63 раза), Ni (3,6 раза), Cu (в 36 раз), Zn (в 83 раза), Pb (в 5,8 раз), As (в 6 раз), превышением содержания нефтепродуктов. В качестве фона использовали почву с территории музея - заповедника Л.Н. Толстого Ясная Поляна, в которой превышения ПДК и ОДК по нормируемым элементам отмечено не было.

Выращиваемые на опытных почвах месячные растения характеризовались более низким содержанием хлорофилла а (1,22-1,67 мг/г) по сравнению с контролем (1,97 мг/г). Наибольшее снижение содержания фотосинтетических пигментов отмечено у растений, выращиваемых на наиболее загрязненной почве набережной (на 38 %) и почве СЗЗ автомагистрали (до 30 %). На этих же почвах (набережная, проспект Ленина) снижалось содержание хлорофилла b в побегах мятлика на 20 % по сравнению с контролем. Содержание каротиноидов было на 26-31 % ниже контроля в побегах мятлика на почвах КМЗ, Набережной, проспекта Ленина.

На почвах КМЗ и набережной у побегов мятлика лугового наблюдали снижение содержания низкомолекулярных антиоксидантов – аскорбиновой кислоты и глутатиона на 31-34 и 21-27 % соответственно.

Содержание фенольных соединений в побегах мятлика лугового, выращенного на почвах с полиэлементными аномалиями, варьировало от 5,26 до 16,74 мкг/г и было максимальным на почвах проспекта Ленина. Содержание фенольных соединений в побегах *Poa pratensis*, выращенных на почвах с проспекта Ленина и КМЗ было выше относительно контроля на 41% и 11% соответственно. Поскольку общими компонентами-загрязнителями данных почв являются Fe и Mn, возможно их присутствие стимулирует выработку фенольных соединений в изучаемом растении. Содержание фенольных соединений в побегах, выращенных на почвах Тулачермет и набережной было ниже относительно контроля на 22% и 47% соответственно. При этом на почвах проспекта Ленина у мятлика также наблюдалось достоверное увеличение содержания глутатиона.

Высота растений в возрасте 7 суток была ниже контроля, однако выравнивалась на 21 сутки и побеги растений *Poa pratensis*, росшие на почвах с полиэлементными аномалиями превосходили в росте побеги мятлика на фоновых почвах от 22 % на набережной до 74 % на почвах СЗЗ предприятий металлургии.

Полученные результаты позволяют сделать заключение, что изучение мятлика лугового как возможного фиторемедианта следует продолжить для почв СЗЗ металлургических производств. Высокие концентрации Mn, Cr, Ni, Cu, Zn, Pb, As почв набережной являются токсичными для *Poa pratensis*, угнетая работу фотосинтетического аппарата и синтез низкомолекулярных антиоксидантов. Для данных почв следует подбирать другие растения, более устойчивые к аномально высоким концентрациям перечисленных элементов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-29-05257 «Техногенное загрязнение почв токсичными элементами и возможные методы его устранения»

Влияние предобработки мелатонином на растения *Hordeum vulgare* в условиях избыточного содержания ионов кадмия

Данилова Е.Д., Ефимова М.В.

Национальный исследовательский Томский государственный университет, пр. Ленина 36, Томск, Россия
nusy.l.d@gmail.com

Избыточное содержание подвижных форм тяжелых металлов – общее свойство кислых почв, составляющих более трети площади всех пахотных земель. Помимо собственно негативного влияния на растения, повышенная доступность ионов тяжелых металлов в почвенном растворе приводит к их попаданию в агропродукцию и отрицательно влияет на здоровье людей. Одним из наиболее токсичных металлов является кадмий.

В последнее время значительное внимание исследователей привлекает вещество фитогормональной природы – мелатонин. Ввиду способности мелатонина повышать устойчивость растений к различным повреждающим факторам, представляется целесообразным изучение механизмов адаптации растений к действию тяжелых металлов. Многостороннего исследования по индуцированной мелатонином толерантности к кадмиевому стрессу у растений ячменя до сих пор проведено не было.

Работа выполнена в условиях, максимально приближенных к условиям произрастания на территориях, загрязненных солями тяжелых металлов – pH среды по Влайеу составляла 4.5. Использование гидропонной культуры для исследования токсического действия тяжелых металлов обосновано с физиологической точки зрения тем, что основной токсический эффект на растения в большинстве случаев оказывают именно свободные ионы тяжелых металлов в почвенном растворе, а не ионы, связанные с твердой фазой почвы. Изучено действие $CdCl_2$ (2 мкМ) и мелатонина (1 и 10 мкМ) на ростовые параметры (массу растений и площадь листовой поверхности), интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ), содержание пролина и фотосинтетических пигментов, а также функционирование фотосистемы II. Растения ячменя в возрасте 12 суток разделяли на 4 варианта, два из которых были подвергнуты 24-х часовой прикорневой обработке растворами мелатонина. Далее растения переносились на питательную среду с добавлением хлорида кадмия, за исключением контрольного варианта. Фиксация растительного материала, определение ростовых параметров и фотосинтетической активности фотосистемы II проводились на 7-е сутки после начала эксперимента.

В варианте с добавлением хлорида кадмия в питательный раствор отмечено снижение содержания всех исследуемых групп фотосинтетических пигментов (хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов), уменьшение массы растений и площади ассимилирующей поверхности. Содержание малонового диальдегида (показатель отражающий величину ПОЛ) и пролина в варианте с добавлением $CdCl_2$ достоверно превышало контрольные значения. Предобработка мелатонином, вне зависимости от используемой концентрации, увеличивала содержание пигментов, суммарную площадь листовой поверхности и максимальный квантовый выход (F_v/F_m) фотосистемы II, относительно варианта с добавлением только хлорида кадмия, что свидетельствует о сохранении фотосинтетической активности растениями ячменя.

Таким образом, нами показано, что важные физиологические процессы растений ячменя подвержены негативному воздействию ионов кадмия. Предобработка растений мелатонином способствует сохранению продуктивности растений за счет поддержания фотосинтетической активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-34-90051_Аспиранты).

Влияние предпосевной обработки семян БАВ на фотосинтетическую деятельность флаговых листьев пшеницы (*Triticum aestivum* L.)

Платовский Н.Н., Здиорук Н.В., Раля Т.Х., Горе А.И.

Институт генетики, физиологии и защиты растений министерства образования, культуры и науки
ул. Лесная 20, г. Кишинев, Республика Молдова, MD – 2002.
nik.plat@hotmail.com

В условиях все большего увеличения антропогенной нагрузки, приводящей к стремительному изменению климатических условий в сторону потепления, растительный организм испытывает все более сильное угнетение, вызванное недостатком влаги. В связи с этим все большее внимание уделяется таким направлениям исследования, как селекция, работающая в сторону создания и выявления новых, более устойчивых и продуктивных сортов и гибридов пшеницы, а также разработке или модификации агротехнических приемов, направленных на увеличение потенциальной урожайности и снижению рисков культивирования сельскохозяйственных культур. Однако наряду с данными направлениями исследований также большой интерес представляют технологии применения природных биорегуляторов роста, которые приводят к снижению действия неблагоприятных факторов внешней среды на растительный организм путем влияния как на внутренние процессы регуляции химических реакций, так и на внешние параметры роста и развития растительного организма. На протяжении нескольких лет исследований нами было изучено влияние предпосевной обработки семян мягкой озимой пшеницы биологически активным веществом (БАВ) *Реглалг*, который содержит смесь ненасыщенных жирных кислот, органических кислот, фенольных соединений, кетонов и других биологически активных компонентов, выделенных из водорослей рода *Spirogira* sp. в специальных условиях и растворенных в 20% этаноле. Благодаря рациональному комбинированию таких компонентов обеспечивается широкий спектр действия препарата. Действие биорегулятора *Реглалг* на семена пшеницы приводит к увеличению глубины залегания узла кушения в почве путем укорачивания подземного штамба (эпикотила) растений пшеницы. Данное свойство позволяет более рационально использовать доступные резервы влаги в более глубоких горизонтах почвы при недостатке влаги путем образования узловых корней в более глубоких горизонтах почвы, а также снижению влияния низких отрицательных температур в зимний период времени. На основании выше изложенного целью наших исследований стало определение работы фотосинтетического аппарата растений пшеницы, полученных из семян, обработанных биопрепаратом *Реглалг*. Для проведения эксперимента на опытном поле института Генетики, Физиологии и Защита растений были посеяны сорта озимой пшеницы молдавской и украинской селекции (10 генотипов) с ярко выраженными свойствами устойчивости к действию неблагоприятных факторов внешней среды. В качестве объекта исследований послужили флаговые листья различных сортов озимой пшеницы, на которых проводили исследования фотосинтетической деятельности в зависимости от глубины залегания узла кушения в почве. Фотосинтетическую деятельность регистрировали в динамике развития растений по фазам вегетации (колошение, цветение, налив зерна, молочная спелость) с помощью таких методов как: индекс хлорофилла, РАМ-флуориметрия, электрофорез белкового комплекса RuBisCo. Конечным и в тоже время весомым показателем являлось определение продуктивности колоса и урожайности растений. В ходе проделанной работы было установлено, что растения, полученные из семян, обработанных биопрепаратом *Реглалг*, дают прибавку к урожайности примерно на 300–500 кг/га больше, по сравнению с контрольными растениями за счет формирования большего числа плодородных стеблей, содержания семян в колосе и среднем весе одного семени. Также данные показатели полностью коррелируют с такими показателями, как содержание хлорофилла в флаговых листьях на протяжении всего периода старения листовой пластинки, количественное содержание белкового комплекса RuBisCo и скорость его убывания по мере старения листа, а также флуоресцентными показателями фотосинтетической деятельности флагового листа в зависимости от его возраста. Благодаря проделанной работе удалось выявить, что растения, полученные от предпосевной обработки биопрепаратом *Реглалг*, задерживаются по скорости высыхания в конце фазы развития на 2–3 дня, по сравнению с контрольными растениями. Данный эффект позволяет получить прибавку к урожайности за счет расположения узловых корней глубже в почве, тем самым способствуя получению доступа к влаге. Благодаря этому растения задерживаются в скорости старения листовой пластинки, что позволяет колосу накапливать питательные вещества на 2–3 дня дольше, что отражается на увеличении средней массы семени и количестве семян в колосе. Таким образом, рациональное применение биологически активных соединений способствует задержке старения растительного организма путем снижения действия на него неблагоприятных факторов внешней среды.

Исследования проведены в рамках проекта Государственной Программы „20.80009.7007.07” Определение параметров, характеризующих устойчивость растений с разным уровнем организации к действию экстремальных температур с целью уменьшения влияния климатических изменений», финансируемой Национальным Агентством по Исследованиям и Развитию.

Влияние предпосевной обработки семян комплексными соединениями на адаптацию пшеницы к воздействию засухи

Якубова М.М., Хамрабаева З.М., Содикзода М.С.

Таджикский национальный университет. пр. Рудаки, 17, Душанбе, Таджикистан.
awst2001@mail.ru

Проблема устойчивости организма, его адаптации к изменяющимся факторам среды остается одной из центральных проблем биологии. Адаптация - это развитие любого признака, который способствует выживанию вида и его размножению. Среди многочисленных стрессовых воздействий засуха является наиболее весомым абиотическим фактором, имеющим большое значение для Республики Таджикистан с его резко континентальным климатом. В условиях засухи ключевую роль играют механизмы адаптации фотосинтетического аппарата, позволяющие растению преодолеть стрессовое воздействие. В последние годы используется большое количество БАВ для увеличения урожая и повышения устойчивости растений к неблагоприятным факторам. К ним относятся комплексные соединения микроэлементов, используемые в качестве активаторов роста и развития, которые находят применение в растениеводстве и животноводстве.

Нами были изучены адаптационные возможности изученных сортов пшеницы при действии почвенной засухи на основе определения содержания фотосинтетических пигментов в качестве тест-системы при предпосевной обработке семян координационными соединениями железа и цинка (КС).

Объектом исследования служили растения пшеницы *Triticum aestivum* L. сортов Ориён, Старшина, Алмалы, для которых ранее были установлены различия по морфометрическим показателям и урожайности. В ходе работы было рассмотрено изменение содержания хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов в зеленых листьях в нормальных условиях (контроль) и под воздействием абиотического стресса, вызванного недостатком влаги в почве (засуха), а также влияние предпосевной обработки семян КС на данные показатели.

Результатами исследования установлено увеличение содержания хлорофиллов *a* и *b* в листьях пшеницы при обработке КС на 6%, 14% и 10% для сортов Ориён, Старшина и Алмалы соответственно в сравнении с контрольным вариантом. В условиях засухи содержание хлорофиллов снижалось на 15%, 7% и 17% соответственно. Предпосевная обработка семян пшеницы КС оказала положительное влияние на дальнейшее развитие растений, т.к. содержание пигментов в условиях засухи снизилось всего на 6%, 3% и 7% соответственно. Результаты определения количества каротиноидов выявили обратную тенденцию, т.е. в условиях засухи данный показатель увеличился у всех опытных растений на 15%, 23% и 28% соответственно. Наблюдается тенденция к уменьшению содержания каротиноидов после обработки семян КС. Данный результат подтверждает защитную и фотопротекторную функцию каротиноидов, что может характеризовать засухоустойчивость в критический период и снятие стресс-напряжения в организме растений.

Полученные данные выявили снижение индекса хлорофиллов (соотношение *a/b*), который как важный информативный показатель характеризует работу фотосинтетического аппарата, от 1,29-1,40 до 1,18-1,23 (снижение светособирающей функции) у всех сортов пшеницы в условиях засухи. Предварительная обработка семян КС привела к увеличению индекса хлорофиллов.

При характеристике работы фотосинтетического аппарата немаловажную роль играет соотношение суммы хлорофиллов к содержанию каротиноидов, что характеризует общее состояние ассимиляционного аппарата. Как известно, чем меньше соотношение (*a+b/каротиноиды*), тем выше устойчивость растений к неблагоприятным температурным условиям. По полученным данным выявлено, что показатель соотношения зеленых и желтых пигментов листьев у сортов Ориён и Алмалы равнялся в контроле 2,6, а у сорта Старшина составлял 2,2. В условиях засухи он снижался до уровня 1,7-1,9. После обработки семян КС как в обычных условиях, так и при засухе данный показатель повышался.

Можно заключить, что содержание фотосинтетических пигментов в листьях изученных сортов мягкой пшеницы в условиях засухи с предварительной обработкой семян 0,05%-ным раствором гетероядерного комплексного соединения $[Fe^{II}Fe^{III}Zn^{II}Ac]$ свидетельствуют о том, что данный препарат является эффективным в качестве биостимулятора и активатора биохимических процессов в растениях, что в конечном счете способствует их лучшей адаптации в стрессовых условиях.

Влияние препаратов защитно-стимулирующего действия на содержание фотосинтетических пигментов и продуктивность зерновых культур

Полянская С.Н., Корытько Л.А., Мельникова Е.В., Машкин И.А.

Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси, 220072,
ул. Академическая, 27, г. Минск, Республика Беларусь.
snpoljan@mail.ru

Исследование механизмов формирования продуктивности зерновых культур связано с изучением процессов фотосинтеза. Основу метаболизма растений составляет совокупность реакций фотосинтеза, являющегося основным источником органических веществ. Будучи тесно связанным с процессами пластического и энергетического обменов, фотосинтез во многом определяет урожайность и продуктивность растений. Эффективность функционирования фотосинтетического аппарата растений определяется количеством, состоянием, активностью хлорофиллов и каротиноидов. К сожалению, пока не удалось найти тот единый качественный показатель, который характеризовал бы продукционный процесс. Для этого требуется проведение систематических биохимических исследований, которые позволят объединить количественные и качественные показатели, влияющие на процесс формирования урожая. Повышение урожайности зерновых культур возможно как селекционными методами, так и путем физиологической регуляции. В настоящее время накоплено достаточно данных о том, что внешние воздействия на растения приводят к изменениям метаболических процессов. Оптимизация состояния фотосинтетической активности путем применения защитно-стимулирующих препаратов является важным фактором повышения устойчивости и продуктивности злаковых культур. Современное сельскохозяйственное производство все чаще ориентируется на использование экологически безопасных биологических препаратов как для повышения урожая, так и для защиты растений от патогенов и вредителей. Таким требованиям соответствуют комплексные препараты, в состав которых входит собственно фунгицид и регулятор роста. В полевых опытах изучали влияние препаратов защитно-стимулирующего действия на основе гидрогуминовых и тритерпеновых кислот с добавлением фунгицида эхион в половинной дозировке на фотосинтетическую активность и продуктивность злаковых культур. Использовали районированные в Республике Беларусь сорта яровой пшеницы (Сударыня и Ласка) и ячменя (Мустанг и Адам). Опрыскивание растений проводили в фазу трубкования, содержание пигментов определяли в фазах колошения, цветения и молочной спелости. Показано, что у растений яровой пшеницы сорта Сударыня происходит увеличение содержания фотосинтетических пигментов под влиянием препаратов защитно-стимулирующего действия по всем вариантам опыта на протяжении онтогенетического развития растений и к фазе молочной спелости достигает 30 %, что свидетельствует об активации обмена веществ в растениях этого сорта и служит индикатором общего состояния растительного организма. Изменение количества хлорофилла в листьях яровой пшеницы сорта Ласка в течение вегетации было однотипным по всем вариантам: этот показатель был максимальным в процессе интенсивного роста растений (в фазу колошения до 11 %), а затем снижался к фазе молочной спелости. У растений ячменя сорта Адам суммарное накопление хлорофиллов было максимальным в фазу цветения (до 30 %), а затем снижалось к фазе молочной спелости до контрольных значений. При воздействии защитно-стимулирующих препаратов в растениях ячменя сорта Мустанг абсолютное содержание хлорофиллов было максимальным в фазу колошения и снижалось к фазе молочной спелости, оставаясь, при этом, выше контроля на 10-15 %. Изменение количества каротиноидов было сходным с изменением суммарного количества хлорофиллов у исследуемых сортов злаковых культур. Снижение содержания фотосинтетических пигментов к фазе молочной спелости у растений злаковых культур в сравнении с контролем обусловлено, согласно литературным данным, постепенным уменьшением абсолютного и относительного содержания хлорофилла в листьях растений начиная с фазы цветения, а также более быстрым (на 3-5 дней) прохождением фаз развития растений, обработанных защитно-стимулирующими препаратами в сравнении с контролем. Возможно под влиянием исследуемых препаратов более интенсивно происходит отток органических веществ из листьев в формирующиеся зерновки, что в итоге определило и более высокую урожайность. Следовательно, оптимизация обмена веществ у растений яровой пшеницы сорта Сударыня и ячменя сорта Мустанг под влиянием защитно-стимулирующих препаратов происходила в течение всей вегетации, а у пшеницы сорта Ласка и ячменя сорта Адам в основном проявлялось кратковременно (сразу после обработки). Исследуемые препараты оказывали положительное влияние на формирование продуктивности злаковых растений. Об этом свидетельствует увеличение количества продуктивных стеблей у сорта Сударыня до 42 %, у сорта Ласка – до 86 %, а у ячменя - до 16 %. Сходное влияние препараты оказали и на массу зерна одного колоса. Они увеличивали вес семян с колоса у злаковых культур до 30 % за счет увеличения числа зерен в колосе (до 38 %) и выполненности семян, о чем свидетельствует увеличение массы 1000 зерен (до 10 %) в сравнении с контролем. Следовательно, обработка растений препаратами защитно-стимулирующего действия на основе гидрогуминовых и тритерпеновых кислот с добавлением фунгицида эхион в половинной дозировке положительно влияла на основные составляющие фотосинтетического аппарата у растений яровой пшеницы и ячменя, что в результате способствовало повышению продуктивности злаковых культур.

Исследования выполнены при поддержке БРФФИ № Б18-146.

Влияние различных микроорганизмов на ответные реакции винограда на заражение милдью

Сундырева М.А., Мишко А.Е., Луцкий Е.О., Вялков В.В.

Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия.
40-летия Победы, 39, Краснодар, Россия.
taurim2012@yandex.ru

Взаимодействие растения с неспециализированными микроорганизмами способно спровоцировать некоторую иммунную реакцию, сенсibilизировать растение, однако не приведет к заболеванию. Таким образом, растение при последующем взаимодействии со специализированным патогеном, обладающим способностью подавлять иммунные реакции хозяина, будет обладать необходимым пулом метаболитов и защитных веществ для снижения распространения совместимого патогена. Целью работы было изучение характера физиологических изменений у винограда и развитие милдью (*Plasmopara viticola* L.) на листьях при обработке несовместимыми микроорганизмами и последующем заражении. Эксперимент проводили на листьях винограда двух сортов и гибридных форм, отличающихся по устойчивости к милдью: высокоустойчивые форма ТАНА 42 и сорт Восторг и слабоустойчивые форма ТАНА 33 и сорт Мускат белый. Листья гибридных форм были собраны на полевом участке в г. Краснодар, листья сортов были отобраны с растений, выращенных в стерильных условиях в вегетационных камерах. Обработки BS – *Bacillus subtilis*, TV – *Trichoderma viride*, SC – *Saccharomyces cerevisiae*, Vi – *Venturia inaequalis*, контроль – вода – проводили путем нанесения капель объемом 25 мкл на лист. Через 24 часа после обработки наносили суспензию спор *Plasmopara viticola* (PV) путем опрыскивания. BS и TV – коммерчески доступные антагонистические микроорганизмы, применяемые в растениеводстве для защиты от различных групп патогенов; SC – винные дрожжи – являются естественными симбионтами винограда, заселяющими его ягоды и вегетативные органы; Vi была выбрана в качестве агента прайминга, так как является несовместимым для винограда грибным патогеном.

На изучаемых сортах винограда наиболее эффективной была обработка SC. Применение BS, TV не показало существенной эффективности на высокоустойчивом сорте Восторг, однако BS и TV были эффективны на слабоустойчивом сорте Мускат белый. У обоих изучаемых сортов самая низкая эффективность была выявлена в варианте Vi, поражаемость на сорте Восторг возрастала. Через 48 и 96 часов после инокуляции микроорганизмами были выявлены наиболее яркие изменения в метаболическом профиле двух сортов, характеризующие эффективные и неэффективные системы прайминга. Через 48 часов после инокуляции у сорта Восторг происходило интенсивное накопление пероксида водорода, ответной реакцией стало существенное повышение экспрессии CHS, PR10, PR3. Снижение активности антиоксидантных метаболитов и ферментов, вероятно, необходимо для повышения содержания перекиси водорода и усиления сигнальной функции. Наиболее эффективная обработка SC стимулировала экспрессию аналогичного набора генов при заражении совместимым патогеном *Plasmopara viticola*. Обработка Vi, способствовавшая повышению поражаемости листовых дисков сорта Восторг при сочетании с PV ингибировала экспрессию большинства защитных генов. Слабоустойчивый сорт Мускат белый имел тенденцию к понижению содержания H₂O₂ вместе с ростом активности антиоксидантных ферментов и метаболитов во всех вариантах опыта. Применение SC, существенно снизившее поражаемость милдью у сорта Мускат белый, стимулировало высокий уровень экспрессии защитных генов аналогично PV. Обработка листьев этого сорта Vi, не оказавшая положительного эффекта, приводила, как и в случае с сортом Восторг, к ингибированию экспрессии большинства защитных генов, как отдельно, так и в сочетании с PV. Через 96 часов после инокуляции у двух сортов экспрессия большинства генов возрастала при заражении патогеном и его сочетании с Vi, когда проявилось интенсивное вторичное спороношение милдью. Таким образом, можно предположить, что на вторые сутки после инокуляции всеми изучаемыми микроорганизмами имеет место рецепция со стороны винограда и запуск ответных реакций, но для снижения поражаемости требуется эффективный антагонистический агент биоконтроля милдью, которым, вероятно, является использованные в работе *Saccharomyces cerevisiae*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-016-00210-А.

Влияние света высокой интенсивности и УФ-В на содержание фотосинтетических пигментов и фотосинтетическую активность растений *Arabidopsis thaliana* дикого типа и мутантов, дефицитных по фитохромам А и В

Креславский В.Д.^{*,}, Строчкина В.В.^{*}, Худякова А.Ю.^{*}, Ширишкова Г.Н.^{*}, Кособрюхов А.А.^{*}**

^{*} Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино, Россия.

^{**} Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
vkreslav@rambler.ru

Фитохромная система является одной из ключевых в процессе световой регуляции процессов фотосинтеза, поддерживая рост, метаболизм и фотоморфогенез растений. Содержание тех или иных фитохромов, прежде всего ключевых фитохромов (Фх) А и В, также важно для развития механизмов адаптации растений и поддержания стрессоустойчивости фотосинтетического аппарата [1]. Однако роль отдельных фитохромов в этих процессах мало изучена. Исследовано влияние абиотических стрессовых факторов - света высокой интенсивности (СВИ, 1, 2 и 4 ч, 1000 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹) и УФ-В (1 ч, 3.6 кДж м⁻²) на фотосинтетическую активность и содержание фотосинтетических и УФ-поглощающих пигментов (УФПП) в листьях растений *Arabidopsis thaliana* дикого типа (ДТ) (экотип Landsberg erecta), мутантов *phyB* и *phyA*, дефицитных по фитохромам А и В, соответственно.

Оценивали изменения скорости фотосинтеза (P_n), максимальный и эффективный квантовый выход фотосистемы 2 (ФС2), а также величину нефотохимического тушения (NPQ), квантовые выходы регулируемого (Y(NPQ)) и нерегулируемого (Y(NO)) нефотохимического тушения, скорость диссипации энергии поглощенных квантов D1o/RC, количество Q_B -невосстанавливающихся реакционных центров (РЦ) ФС2.

УФ-В понижал максимальный (F_v/F_m) и эффективный (Y(II)) квантовые выходы, индекс производительности ФС2 (PI_{ABS}) и количество Q_B -невосстанавливающихся РЦ ФС2, повышал во всех вариантах величину диссипации поглощенной энергии в расчете на РЦ (D1o/RC), а также снижал скорость фотосинтеза и дыхания. Наибольшие изменения отмечены у *phyB* мутанта, тогда как все изменения у *phyA* мутанта были близки к изменениям параметров у ДТ. Так, скорость фотосинтеза снижалась на 40% у ДТ и на 70% у *phyB* мутанта. Величина PI_{ABS} снижалась в 3.3 раза у ДТ и в 13 раз у *phyB* мутанта. Обнаружено, что обработка растений УФ-В вызывала снижение квантового выхода Y(NPQ) на 40% у ДТ и не изменяла у мутанта *phyB*. При этом другой квантовый выход Y(NO) возрастал у ДТ на 70% и у мутанта *phyB* на 90%. Можно предположить, что у мутанта лучше работает защитный механизм от окислительного стресса в виде тепловой диссипации поглощенной энергии. Мы связываем этот эффект с повышенным у мутанта размером пула ксантофилловых пигментов, индуцирующих тушение флуоресценции. Содержание фотосинтетических пигментов заметно не отличалось у ДТ и мутантов, тогда как содержание УФПП было выше у ДТ. Предполагается, что вклад в уменьшение фотосинтетической активности вносит пониженное содержание УФПП у *phyB* мутанта. Также сделан вывод, что при кратковременном действии УФ-В, именно дефицит ФхВ, а не ФхА, приводит к снижению устойчивости ФС2 и одновременно усиливает в большей степени, чем у ДТ, механизмы диссипации поглощенной энергии в тепло.

СВИ (4 ч) снижал скорость фотосинтеза, максимальный и эффективный квантовые выходы, индекс производительности ФС2 во всех вариантах и увеличивал величину D1o/RC. Так, снижение скорости фотосинтеза было 15% у *phyA* мутанта, 25% у ДТ и более чем вдвое у *phyB* мутанта. Однако в отличие от УФ-В обработки не было заметной разницы между содержанием фотосинтетических пигментов и УФПП у ДТ и мутантов. Разница по флуоресцентным параметрам наблюдалась только между ДТ и *phyB* мутантом и в отличие от УФ-В эффектов была небольшой. При 1 ч и 2 ч облучении СВИ достоверная разница между ДТ и мутантами по флуоресцентным параметрам не обнаружена. Скорость фотосинтеза определяется как поступлением в цикл Кальвина восстановительных эквивалентов и АТФ за счет первичных световых процессов фотосинтеза, так и степенью открытости устьиц, скоростью поступления CO₂ к местам ассимиляции. Дефицит фитохромов может снижать проводимость и плотность устьиц [2], что, вероятно, обуславливает разницу в величине P_n между ДТ и мутантом с дефицитом ФхВ при действии СВИ, тогда как УФ-В-индуцированные изменения величины P_n могут быть также связаны со снижением поступления в цикл Кальвина восстановительных эквивалентов и АТФ за счет ингибирования активности ФС2.

Таким образом, при двух разных стрессовых воздействиях (УФ-В и СВИ) основную роль в поддержании стрессоустойчивости фотосинтетического аппарата вносит ФхВ, но не ФхА.

Литература

1. Kreslavski V.D., Los D.A., Schmitt F.J. et al. // BBA – Bioenergetics. 2018. V. 1859. P. 400–408.
 2. Voccalandro H.E., Rognone M.L., Moreno J.E. et al. // Plant Physiol. 2009. V. 150. P. 1083–1092.
- Работа была поддержана грантом РФФИ №20-04-00512.

Влияние сезонного снижения температуры на функциональное состояние РЦ ФС II в листьях *Avena sativa* L.

Софронова В.Е.

Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН. Проспект Ленина, 41, Якутск, Россия.
vse07_53@mail.ru

В природных условиях Центральной и Северо-Восточной Якутии значительная часть дикорастущих кормовых растений в злаково-осоковых фитоценозах часто не успевает пройти весь цикл роста и развития и уходит под снег в зеленом состоянии, образуя ценный корм для многих животных. Яровой овес является удобной моделью для исследования теоретических основ формирования криокорма и выявления адаптивных ответов первичных процессов фотосинтеза у злаковых растений на осеннее снижение температуры.

Мы исследовали динамику изменения показателей флуоресценции хлорофилла *a*, включая ЛР-тест, и фотосинтетических пигментов в листьях ярового овса позднего срока сева в период осеннего похолодания. Во время проведения исследований растения проходили фазы трубкования, выметывания, и восковой спелости. В течение трех недель сентября, по мере снижения среднесуточных температур от 8 до 2°C, содержание хлорофиллов уменьшалось на 40%, что не характерно для летних растений с оптимальным сроком сева в аналогичных фазах роста и развития. Соотношение хлорофиллов *a/b* варьировало в пределах 2.2–2.4. Суммарное содержание каротиноидов, доля β -каротина, лютеина, неоксантина и пигментов виолаксантинового цикла (ВКЦ) изменялось незначительно и практически не зависело от сокращения фотопериода, а также от сезонного снижения температуры. В этот период данные РАМ-флуорометрии выявили повышение квантового выхода энергизационного *qE* компонента нефотохимического тушения (параметра ϕ_{NPQ}), снижение скорости электронного транспорта в ФС II (ETR). На снижение значений ETR, помимо тушения по *qE* механизму в антенне, влияние оказали изменения гетерогенности РЦ ФС II. Анализ ОЛР кривых показал увеличение доли Q_B -невосстанавливающих центров в РЦ ФС II. В этих центрах окисление происходит путем обратной реакции с компонентами донорной стороны ФС II, РЦ быстрее переходят в закрытое состояние, а скорость реокисления Q_A снижается. Рост доли Q_B -невосстанавливающих центров приводил к снижению параметра ET_0/RC , означающего поток электронов перенесенных от Q_A на Q_B , а также вероятности (ψ_{E_0}), квантового выхода электронного транспорта (ϕ_{E_0}) за пределы Q_A , индекса производительности ФС II (PI_{ABS}), отражающего снижение функциональной активности ФС II. Величина показателя F_v/F_m , характеризующего фотохимическую активность комплексов ФС II, составила 0.72–0.76. При температурах около 0°C его значения снижались до 0.62. Одновременно наблюдали более быстрый рост фазы O–J, увеличение значений F_0 , что может наблюдаться не только при увеличении доли Q_A - и Q_B -невосстанавливающих центров, но и при необратимом отделении ССК II от корового комплекса ФС II с образованием комплексов с малым размером антенны. Однако, по нашим данным, различия величин соотношения хлорофиллов *a/b* между летними и осенними растениями, произрастающими при температурах около нуля не значимы. Учитывая, что 90% от общего содержания хлорофилла *b* входит в состав ССК II, мы предполагаем, что предпочтительное необратимое сокращение ССК II по отношению к коровому комплексу ФС II в листьях овса в процессе холодового закалывания отсутствует. При околонулевых температурах значение F_v снижалось примерно на 50%, что обусловлено не только увеличением доли Q_B -невосстанавливающих центров, но и сокращением РЦ ФС II, способных к восстановлению Q_A . При этом возрастала независимая от функционирования ВКЦ диссипация поглощенной энергии в тепло, что проявлялось в увеличении значений параметров DI_0/RC , ϕ_{D_0} . Эти параметры отражают конститутивное (не регулируемое светом фотоингибиторное тушение *qI*) как в ССК II, так и в РЦ. По нашим данным, в листьях овса при низких положительных температурах отсутствует конститутивное накопление зеаксантина, ответственного за рост DI_0/RC , ϕ_{D_0} в антенных пигмент-белковых комплексах. Поэтому одновременное увеличение ABS/RC , пропорционального относительному размеру антенны, отнесенному к доле фотохимически активных РЦ, и DI_0/RC , ϕ_{D_0} мы связываем в основном с увеличением доли “спящих центров”. Такие РЦ могут абсорбировать и улавливать энергию так же, как и активные РЦ, но не могут переводить ее в энергию разделенных зарядов, поэтому поглощенная энергия испускается в тепло. Увеличение DI_0/RC также может быть связано с энергетическим разобщением между отдельными ФСЕ. Сделан вывод, что в этих условиях часть РЦ ФС II теряет фотохимическую активность с преобразованием их в диссипативные центры энергии возбуждения. При этом существенная часть инактивированных РЦ быстро восстанавливает активность при повышении температуры, что предполагает образование фотоинактивированных форм комплексов ФС II, стабилизированных низкими температурами. Снижение среднесуточной температуры до –3°C с ночными минимальными температурами –7...–8°C в течение 3 суток приводило к гибели растений. В процессе эволюции яровые злаки не сформировали генетически детерминированный механизм устойчивости к отрицательным температурам путем внеклеточного льдообразования.

Влияние синтетических регуляторов роста на элементы антиоксидантной защиты растения картофеля

Кириллова И.Г., Камакина Е.С.

ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет им. И. С. Тургенева», Комсомольская ул., 95. Орёл, Россия.
kafbotany17@mail.ru

В настоящее время синтезировано много регуляторов роста: фосфорорганические, кремнийорганические, brassinosteroids и т.д. Механизм их действия на растение до конца не выяснен. В настоящей работе проведено сравнительное изучение действия кремнийорганического регулятора роста Энергия-М (ортокрезоксисукусной кислоты триэтаноламмониевая соль) и Эпин-Экстра, действующим началом которого является эпибрассинолид, на растение картофеля. Предполагается, что биогенный амин (триэтаноламин) придает препарату Энергия-М свойства адаптогена и иммуномодулятора. Исследования проводили с растениями картофеля сорта Жуковский, которые выращивали в вегетационных условиях (почвенная культура). Обработку синтетическими регуляторами роста Энергия-М и Эпин-Экстра проводили путем предпосадочной обработки клубней водными растворами в концентрации 80 мг/л (Энергия-М) и в концентрации 2.2×10^{-6} М/л (Эпин-Экстра) в течение 8 часов. Применяли также опрыскивание надземных органов растений в фазе всходов водными растворами данных регуляторов роста в концентрации 50 мг/л (Энергия-М) и 1.04×10^{-8} М/л (Эпин-Экстра). Активность пероксидазы определяли по методу Бояркина, активность каталазы – по количеству выделившегося кислорода с последующим пересчетом на пероксид водорода, количество малонового диальдегида – спектрофотометрическим методом по реакции с тиобарбитуровой кислотой. Как показали исследования, предпосадочная обработка клубней картофеля кремнийорганическим регулятором роста Энергия-М увеличила активность пероксидазы в листьях и молодых клубнях картофеля. Увеличение составило 1.21-2 раза соответственно. Эпин+Экстра также несколько повысил активность пероксидазы в листьях и клубнях. Что касается другого окислительного фермента – каталазы, то показано, что активность каталазы повысилась в листьях и клубнях картофеля при действии эпибрассинолида (обработка посадочных клубней). Опрыскивание надземных органов также несколько увеличило активность каталазы в клубнях нового урожая. Кремнийорганический регулятор роста Энергия-М также способствовал повышению активности каталазы в листьях и молодых клубнях картофеля. Опрыскивание всходов, напротив, понизило активность каталазы в молодых клубнях. Определение малонового диальдегида показало, что на фоне активизации ферментов - антиоксидантов его уровень снизился в 1.7 раза в клубнях картофеля при действии кремнийорганического регулятора роста, что указывает на мембраностабилизирующее действие изучаемого регулятора роста. Эпин-экстра также понизил содержание малонового диальдегида в клубнях нового урожая в 1.3 раза. Таким образом, выявлено, что антиоксидантная система растения картофеля чувствительна к действию синтетических регуляторов роста – Энергия-М и эпибрассинолида. Показана их антиоксидантная активность, что свидетельствует о положительной роли эпибрассинолида и кремнийорганического регулятора роста в повышении устойчивости растений картофеля. Эффект данных регуляторов зависел от концентрации и способа обработки растений.

Влияние смены природных сезонов на процессы фотосинтеза в коре деревьев

*Дрозденко Т.В. **, Кукарских Г.П. *, Антал Т.К. **, Волгушева А.А. **

* Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. Ленинские горы, 1, Москва, Россия.

** Псковский государственный университет. пл. Ленина, 2, Псков, Россия.
volgusheva_alena@mail.ru

Фотосинтез является важнейшим процессом, обеспечивающим рост и развитие растений. В условиях сезонного климата фотосинтез у высших растений протекает, в основном, в листьях деревьев в теплое время года. После завершения листопада процессы фотосинтеза продолжают идти в хлоропластах коры неодревесневевших побегов. Влияние абиотических факторов на фотосинтетические процессы, происходящие в листьях растений, изучены достаточно подробно. Однако, процессы, происходящие в хлоропластах коры деревьев, освещены недостаточно. Подробную информацию о функционировании первичных процессов фотосинтеза и, соответственно, о состоянии растений, можно получить с помощью индукционных кривых флуоресценции хлорофилла с высоким разрешением (1).

Мы исследовали сезонные изменения фотосинтетических процессов в хлоропластах коры четырех видов деревьев (клен, береза, тополь, липа), произрастающих в экологически чистом районе Звенигородской биологической станции МГУ. Измерение индукционных кривых флуоресценции проводили в апреле, июне и сентябре. Средняя дневная температура в эти месяцы составляла +9, +25, +14 °С, соответственно. Фотосинтетическую активность коры побегов 1-го года регистрировали непосредственно с дерева с помощью РЕА- флуориметра (Hansatech) и оценивали с помощью ЛР-теста.

Анализ результатов показал, что в сентябре происходило уменьшение доли активных реакционных центров ФС2 (параметр Fv) в хлоропластах коры деревьев на 40-50%, при этом наблюдали снижение общего выхода флуоресценции (Fo и Fm), по сравнению с июнем. Фотохимическая активность ФС2 (параметр Fv/Fm) снижалась в пределах 15%. Эти данные свидетельствуют о значительном снижении количества активных центров ФС2, в то время как оставшиеся РЦ ФС2 работают почти с той же эффективностью. Кроме того, наблюдали восстановление пула хинонов, возможно, в результате увеличения хлордыхания и/или более быстрого восстановления ФС1 за счет снижения скорости фиксации CO₂. Следует отметить, что изменение сезона в первую очередь отражалось на изменении так называемой термальной фазы кривой флуоресценции, отражающей восстановление пула хинонов и ФС1. Помимо этого в осенний период наблюдалось уменьшение размера антенны ФС 2 и увеличение нефотохимического тушения.

Наши результаты позволяют предположить, что смена сезонов и связанное с этим похолодание вызывает снижение эффективности функционирования электрон-транспортной цепи в хлоропластах коры скорее за счет восстановления акцепторной стороны ФС1, нежели в результате нарушений функционирования ФС2. Эти сезонные изменения в функционировании фотосинтетической электрон-транспортной цепи в хлоропластах коры определяются снижением потребности дерева в конечных продуктах фотосинтеза.

1. Kalaji et al. (2014) Photosynth Res. DOI 10.1007/s11120-014-0024-6

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032500058-7 при частичной поддержке гранта РФФИ №20-04-00465.

Влияние содержания в почве лигносульфоната натрия на накопление минеральных элементов в листьях огурца

Икконен Е.Н., Юркевич М.Г., Курбатов А.А.

Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН»,
Пушкинская, 11, Петрозаводск, Россия.
likkonen@gmail.com

Лигносульфонат (ЛГС) является побочным продуктом в процессе производства целлюлозы и его попадание в водоемы со сточными водами рассматривается как один из показателей их загрязненности. Однако ввиду высокого содержания в ЛГС органических и минеральных веществ, в последние годы обсуждается возможность его использования для повышения почвенного плодородия, что особенно актуально для почв, дефицитных по элементам минерального питания. Исследовали влияние внесения в почву лигносульфоната натрия в диапазоне концентраций 0 – 10 (объемн. %) на накопление в листьях огурца (*Cucumis sativus* L.) макро- и микроэлементов. Растения выращивали в контролируемых условиях среды на дерново-подзолистой супесчаной почве, которой характерно низкое содержание минеральных элементов. Одну часть растений поливали питательным раствором (высокий агрохимический фон), а другую часть поливали водопроводной водой (низкий агрохимический фон).

Дефицит питания растений, выращиваемых при низком агрохимическом фоне, проявился в существенном снижении их скорости роста и развития. Накопление сухой биомассы этими растениями было в 5 раз ниже, чем у растений, выращиваемых при высокой доступности элементов питания. При выращивании растений в почве, не содержащей ЛГС, в условиях низкого агрохимического фона содержание в листьях P, K и Mg сокращалось на 38, 28 и 36% соответственно, содержание Na и Ca увеличивалось на 260 и 14% соответственно, а содержание N не изменялось относительно растений высокого агрохимического фона. Дефицит питания вызывал двукратное повышение соотношения N/P и N/K при сохранении величины P/K. При поливе водой в листьях растений существенно повышалось накопление Fe, Ni, Cr, Al, Co и Pb, при этом, концентрация таких микроэлементов, как Fe, Ni, Al и Co достигала токсичных уровней. Близкое к токсичному уровню накопление Mn было отмечено для растений, выращиваемых как при высоком, так и низком агрохимическом фоне.

Присутствие ЛГС вносило существенные изменения в накопление растениями минеральных элементов независимо от фона питания растений. Внесение ЛГС в почву в малой концентрации (1%) способствовало повышению содержания N и P на 50 и 60% соответственно, но не влияло на накопление K при высоком агрохимическом фоне выращивания растений. При низком фоне питания ЛГС понижал в два раза содержание N в листе независимо от его концентрации в почве, но не влиял на уровень листового P и K, что обуславливало снижение величины соотношения N/P и N/K. Содержание Na в листе увеличивалось, достигая токсичных уровней при максимальных дозах ЛГС, независимо от фона питания растений. Накопление Ca в листе увеличивалось при низком и снижалось при высоком уровне содержания ЛГС в почве при обоих фонах питания. Содержание Mg также снижалось при высокой дозе внесения ЛГС как при достаточном, так и дефицитном питании растений. Независимо от внесенной концентрации ЛГС способствовал снижению содержания Mn, Zn, Ni и Co в листьях растений независимо от их обеспеченности основными элементами питания. Тогда как ЛГС не влиял на накопление Fe, Cu, Cr и Pb в листьях растений, которые росли при высоком агрохимическом фоне, под влиянием ЛГС содержание этих элементов снижалось у растений, росших при дефиците питания.

Таким образом, результаты подтвердили, что на бедной элементами минерального питания дерново-подзолистой супесчаной почве успешный рост и развитие растений огурца возможны только при их регулярной подкормке. На данном виде почв дефицит питания отражается как на торможении роста растений, так и на накоплении ими макро- и микроэлементов. Тогда как в целом при недостатке питания содержание макроэлементов в единице массы листа снижалось в основном за счет уменьшения концентрации P, K и Mg, удельный вес микроэлементов существенно возрастал в основном за счет накопления Fe, Ni, Cr, Al, Co и Pb. Присутствие ЛГС в почве повлияло на перераспределение вклада элементов в химический состав листа при обоих контрастных уровнях питания, но в большей степени при дефиците доступности элементов для растений. В условиях низкого агрохимического фона ЛГС не способствовал значимому увеличению скоростей роста и развития растений, а также вызывал накопление в листьях Al. Кроме того в присутствии ЛГС растения накапливали токсичные концентрации Na независимо от обеспеченности основными элементами питания. К положительному влиянию ЛГС можно отнести снижение им концентрации Fe, Mn, Ni и Co у растений, выращиваемых при дефиците питания, с токсичных уровней до уровня растений, получавших достаточное питание. Также ЛГС снижал токсичные уровни накопления растениями Mn независимо от фона питания растений. Кроме того, при дефиците питания ЛГС сбалансировал соотношения N, P и K до оптимальных значений.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№19-29-05174).

Влияние спектрального состава света на параметры газообмена и транспирации у проростков ячменя (*Hordeum vulgare* L.)

Аверчева О.В., Парыгина А.Д., Бассарская Е.М., Кочетова Г.В., Жигалова Т.В.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, кафедра физиологии растений. Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Москва, Россия.
olga.avercheva@gmail.com

Спектральный состав света – один из ключевых факторов, регулирующих рост и развитие растений. Помимо других параметров, он воздействует на формирование фотосинтетического аппарата и работу устьиц, от чего в свою очередь зависит эффективность поглощения углекислого газа, транспирации и эффективность использования поглощенной воды. Наиболее существенно на рост и развитие растений влияют красный и синий свет, они же наиболее эффективно используются фотосинтетическим аппаратом.

Мы исследовали параметры газообмена и транспирации у 9-дневных проростков ячменя, выращенных при освещении красными (КС) и синими (СС) светодиодами (максимум испускания – 660 и 450 нм, соответственно). Контролем служили растения, выращенные при освещении люминесцентными лампами (ЛЛ). Освещенность на уровне верхушки листьев составила 70 мкмоль/(м² с) фотонов фотосинтетически активной радиации (ФАР), фотопериод – 16/8 часов. Растения выращивали на питательной среде Хоглэнда с добавлением MES-NaOH-буфера (рН 6,5). Температура воздуха в климатической камере поддерживалась на уровне 22-23°C. На первом листе 9-дневных проростков снимали световые кривые параметров газообмена и транспирации – скорость ассимиляции углекислого газа (А, мкмоль СО₂/(м² с)), скорость транспирации (Е, ммоль Н₂О/(м² с)), концентрацию СО₂ в подустьичном пространстве (С_i, мкмоль/моль), устьичную проводимость (gs, ммоль Н₂О/(м² с)) и эффективность использования воды в фотосинтезе (WUE, ммоль СО₂/моль Н₂О). Значения параметров определяли с помощью инфракрасного газоанализатора в составе прибора CIRAS-3 (PP Systems, США) и вычисляли при помощи встроенного в прибор программного обеспечения. Во время эксперимента листья освещали при помощи встроенного в прибор светильника, красными светодиодами (максимум испускания 625 нм). При снятии световых кривых использовали значения уровня фотонов ФАР от 0 до 1500 мкмоль/(м² с).

При небольших уровнях ФАР (до 400 мкмоль/(м² с), в т.ч. при уровне ФАР 70 мкмоль/(м² с), при котором выращивали растения) не обнаружено достоверных различий между вариантами по скорости ассимиляции СО₂ и транспирации. Однако при более высоких уровнях ФАР растения, выращенные на КС, отставали по этим параметрам от растений, выращенных на СС и ЛЛ. Световое насыщение этих параметров у ЛЛ- и КС-растений достигалось при близких значениях ФАР – около 600 мкмоль/(м² с), в то время как у СС-растений даже при 1000-1500 мкмоль/(м² с) не происходило полного насыщения. Устьичная проводимость у КС-растений практически при всех уровнях ФАР (от 100 мкмоль/(м² с) и выше) была достоверно ниже, чем у ЛЛ- и СС-растений. Концентрация СО₂ в подустьичном пространстве у КС-растений снижена по сравнению с контролем при 100-400 мкмоль/(м² с), но не при более высоких уровнях ФАР, что может быть связано с недостаточным поступлением СО₂ в лист.

Результаты работы говорят о том, что листовой аппарат растений, выращенных на КС, имеет сниженную способность к адаптации к высоким уровням освещения. Он хорошо адаптирован к уровню ФАР, при котором выращивались растения, но при более высоких уровнях ФАР показывает сниженную ассимиляционную активность, что может быть связано с более низкой устьичной проводимостью, сниженным количеством или активностью Рубиско, особенностями работы устьичного аппарата, анатомии листа и другими причинами. СС-растения, напротив, показывают повышенную способность адаптироваться к высоким уровням ФАР, достигая светового насыщения ассимиляции и транспирации при значениях ФАР выше, чем в контроле. При этом эффективность использования воды достоверно не различалась между вариантами при всех исследованных уровнях ФАР. По всей видимости, растения при любом из исследованных спектральных составов света способны сбалансировать поглощение воды и фотосинтез.

Исследование выполнено с использованием ресурсов ЦКП «Фенотипирование фототрофных организмов» и при поддержке ПНР МГУ (контракт 0850-44-2020).

**Влияние спектрального состава света на фотосинтетическую активность
и продуктивность растений салата *Lactuca sativa* L.**

Ивлев А.А.**, *Товстыко Д.А.**, *Шмаков А.С.**, *Шмарев А.Н. , *Чуксин И.С.** ,
*Литвинский В.А.**** , *Тараканов И.Г.****

* Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева, ул. Тимирязевская, 49, Москва, Россия.

** Институт фундаментальных проблем биологии РАН, ул. Институтская, 2, Пущино, Россия.

*** Всероссийский научно-исследовательский институт агрохимии им. Д.Н. Прянишникова,
ул. Прянишникова, 31а, Москва, Россия.
ivatar@yandex.ru

В контролируемых условиях в специальном многофункциональном фотобиологическом исследовательском блоке с использованием искусственного освещения на основе узкополосных светодиодов была проведена серия экспериментов с растениями салата-латука, *Lactuca sativa* L., сорт Афицион. Экспериментальная схема включала создание световых режимов для исследования реакций растений на исключение определенных спектральных диапазонов света в области фотосинтетически активной радиации; для сравнения были изучены реакции на квазимонохроматическое излучение в красной и синей областях. Представлены данные по фенотипированию растений, накоплению фотосинтетических пигментов, определению фотосинтетической активности и РАМ-флуориметрии, характеризующие их функциональную активность и характер стрессовых реакций на аномальные световые условия. Изучение изотопного состава углерода фотоассимилятов в суточном цикле позволило охарактеризовать баланс процессов карбоксилирования и фотодыхания на основе ранее разработанной осцилляционной модели фотосинтеза. Так, доля фотодыхания в тканях листьев растений возрастала в ответ на действие красного света, в то время как синий свет ускорял карбоксилирование. Однако, в последнем случае наблюдали и самую низкую эффективность водопотребления. Эти данные были подтверждены наблюдениями на световых режимах, где отсутствовали отдельные области спектра ФАР. Тот факт, что свет различных длин волн влияет на изотопный состав общего углерода, позволяет выяснить характер его действия на организацию обмена веществ в растениях в целом. Дальнейшее изучение этих фотозависимых механизмов должно помочь в разработке способов тонкой регуляции физиологических процессов при выращивании растений в системах интенсивного культивирования с искусственным освещением, например, на фабриках растений.

Исследования поддержаны грантом РФФ № 19-16-00078.

Влияние хлоридного засоления на анатомо-морфологическую характеристику клеток эпидермиса и паренхимы коры гипокотыля двух генотипов томата *in vitro*

Богоутдинова Л.Р. *, Баранова Е.Н. *, Баранова Г.Б. *, Халилуев М.Р. **, **

* Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия.

** ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия.
bogoutdinova_lr@rambler.ru

Засоление является одним из главных стрессовых факторов, лимитирующих выращивание сельскохозяйственных культур. При изучении механизмов устойчивости растений к стрессовым воздействиям создание и поддержание контролируемых условий позволяет за сравнительно непродолжительный период времени провести скрининг потенциально устойчивых форм уже на ранних этапах развития. Таким образом, целью настоящего исследования являлось изучение мезоструктурной организации клеток эпидермиса и паренхимы коры гипокотыля двух генотипов томата (*Solanum lycopersicum* L.) в условиях хлоридного засоления *in vitro*.

Растительным материалом для исследований служили проростки томата селекционной линии ЯЛФ и сорта Рекордсмен. Стерилизованные семена культивировали на питательной среде Мурасиге-Скуга, дополненной 3% сахарозой и 0,7% агаром. На этапе формирования настоящих листьев у проростков отсекали часть гипокотыля и переносили на среду для индукции ризогенеза, не содержащей хлорида натрия (контроль), а также с добавлением NaCl в концентрациях 50, 100, 150, 200 и 250 мМ. На восьмые сутки культивирования фрагменты гипокотылей размером 2–3 мм, полученные из срединной части проростков, фиксировали в растворе глутарового альдегида, проводили постфиксацию в растворе четырехоксида осмия, обезвоживали и заключали в смесь эпоксидных смол. Полутонкие поперечные срезы семядольных пластинок получали с помощью ультрамикротомы LKB.

В ходе работы показаны существенные различия между исследуемыми генотипами по размеру эпидермальных и паренхимных клеток коры гипокотыля. Так, у томата линии ЯЛФ с добавлением 50 мМ NaCl площадь эпидермальных клеток была существенно меньше, однако в условиях максимального хлоридного засоления наблюдалось повышение данной характеристики. В отличие от линии ЯЛФ, достоверное снижение площади эпидермальных клеток гипокотыля у сорта Рекордсмен происходило при концентрации NaCl, составляющей 100 мМ. В условиях 200 и 250 мМ NaCl у сорта Рекордсмен обнаружено увеличение вышеназванного параметра, достигающее значения контрольного варианта. Добавление 50 и 100 мМ NaCl приводило к уменьшению площади клеток паренхимы коры гипокотыля у проростков томата линии ЯЛФ, тогда как в условиях 250 мМ NaCl было отмечено увеличение площади клеток данной ткани. При 150 мМ NaCl наблюдалось уменьшение площади паренхимных клеток гипокотыля у сорта Рекордсмен. Влияние солевого стресса также показано и на размере межклеточного пространства. Так, у проростков томата линии ЯЛФ данный показатель был существенно меньше по сравнению с контролем при концентрациях NaCl от 50 до 200 мМ. Максимально изученная концентрация приводила к увеличению площади межклетников, значение которой было сравнимо с контрольным вариантом. При действии 50 мМ NaCl у сорта Рекордсмен отмечено существенное увеличение межклеточного пространства, а повышение концентрации NaCl от 100 и до 250 мМ приводило к уменьшению площади межклетников.

Обнаруженное уменьшение площади клеток и межклетников может быть связано с изменением осмотического баланса в следствии обезвоживания и деформации клеточной стенки. В то же время, набухание клеток может быть обусловлено накоплением токсичных ионов в вакуолях и/или же плазмолизом. Таким образом, показано, что эпидермальные и паренхимные клетки гипокотыля томата сорта Рекордсмен оказались менее чувствительными к солевому стрессу в условиях *in vitro*.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 0574-2019-0002 (AAAA-A18-118051890089-0).

Влияние холодной обработки на выход из покоя растений ясеня обыкновенного *in vitro* и *in vivo*

Лебедев В.Г., Шестибратов К.А.

Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.
Проспект Науки, 6, Пушкино, Россия.
vglebedev@mail.ru

Глобальное изменение климата оказывает серьезное влияние на экосистемы и фенологические модели могут оказаться полезными для прогнозирования его последствий. У деревьев бореального и умеренного климата зимний покой является важным адаптивным механизмом их выживания. У многих древесных видов длительность охлаждения и сумма температур, необходимых для распускания почек, взаимосвязаны, но это связь нелинейная. Изучение требований растений к температурному режиму во время покоя и выхода из него проводится в основном на плодовых деревьях, а работ с лесными породами известно значительно меньше. Кроме того, подобные исследования в основном проводятся или с поздними сукцессионными видами (бук) или с ранними (осина, береза). В своей работе мы изучали влияние длительности охлаждения в условиях *in vitro* и *ex vitro* растений ясеня обыкновенного (*Fraxinus excelsior* L.), относящегося к промежуточным сукцессионным видам, на скорость выхода из покоя.

Холодовая обработка при 4-5°C укорененных растений ясеня *in vitro* вызвала задержку в росте после их высадки в теплицу, продолжительность которой коррелировала с длительностью экспозиции. Наиболее быстрый рост отмечался при обработке в течение 5-7 недель, а после 13 недель наблюдали снижение жизнеспособности растений. Длительная холодная обработка вызывала побурение и последующее опадение листьев у растений ясеня *in vitro*. На однолетних растениях ясеня оценивали влияние холодной обработки в течении 300-3000 ч. Клональное микроразмножение ясеня на среде с дигидрохверцетином в последующем значительно сократило потребность в низких температурах: растения выходили из эндопокоя после накопления 500 ч охлаждения, тогда для контроля требовалось более 1000 ч. Продолжительность распускания почек у таких растений также была значительно меньше. Мы предполагаем, что эффект может быть вызван антиоксидантной активностью флавоноида дигидрохверцетина. Для описания весенней фенологии мы использовали двухфазную модель, учитывающую действие как зимних низких температур, так и накопление температуры весной. Потребность в сумме температур для распускания почек у ясеня хорошо описывалась как обратная экспоненциальная функция числа часов охлаждения $\leq 5^{\circ}\text{C}$.

Необходимы дальнейшие исследования по изучению роли антиоксидантов в выходе древесных растений из покоя. Поздноцветущий и нечувствительный к фотопериоду ясень является хорошим объектом для изучения влияния внешних и внутренних факторов на механизмы впадения и выхода из покоя. Более глубокое изучение этих механизмов может быть использовано для получения генотипов, более адаптивных к изменениям климата, современными методами (маркерная селекция, генная инженерия).

Влияние частичной декапитации колоса главного побега растений озимой мягкой пшеницы на формирование зерновок с различными морфотипами зародыша

Казакова А.С.

Азово-Черноморский инженерный институт – филиал ФГБОУ ВО Донской ГАУ в г. Зернограде,
ул. Ленин, 21, г. Зерноград, Ростовская обл., Россия.
Kasakova@inbox.ru

Озимая мягкая пшеница формирует зерновки с различной морфологией зародышевой части, что принято называть морфотипом зародыша (МТЗ). Всего выделено восемь морфотипов, которые носят численное и буквенное обозначения (МТЗ-1а, МТЗ-1, МТЗ-2, ..., МТЗ-7). Зерновки с различными МТЗ разнятся не только по массе и размерам зерновки, но и по способности прорасти в условиях дефицита влаги, формировать мощные проростки, а также и по урожайности. Морфотипы 2, 3, 4 и 5 составляют основную массу зернового вороха, их содержание - 95 % и выше, поэтому мы их называем основными МТЗ. Морфотипы 1а, 1, 6 и 7 – минорные МТЗ, так как на их долю в коммерческих семенах приходится до 5 %. Именно семена с минорными МТЗ формируют более слабые растения и дают меньшую урожайность. Интересно, что семена с минорными МТЗ могут формироваться в любом колоске колосьев главного и бокового побегов, а также в любой позиции в колоске. В неблагоприятных по гидротермическому режиму условиях весенне-летнего периода вегетации растений пшеницы увеличивается число зерновок с минорными МТЗ. Мы считаем, что одним из реальных путей увеличения урожайности озимой пшеницы является создание таких её сортов, у которых будут формироваться семена только с основными морфотипами. Для этого необходимо изучить влияние внутренних и внешних факторов на формирование зерновок с основными и минорными МТЗ. В связи с этим целью данного исследования явилось изучение влияния конкуренции зерновок в колосе за питательные вещества на формирование зерновок с основными и минорными МТЗ.

Объектом исследования служили семена озимой мягкой пшеницы Ростовчанка 5. Репродуцировали семена на участках размножения отдела озимых пшениц АНЦ «Донской». Пшеницу выращивали по принятой в зоне технологии. В фазу цветения колос главного побега подвергали частичной декапитации – удаляли колоски с одной стороны. В фазу полной спелости зерна контрольные и опытные растения вырывали с корнем и складывали в коробки. Для анализа отбирали по 25 колосьев главного побега опытного и контрольного вариантов. Каждый колос разбирали на колоски, нумеруя их снизу вверх. Каждый колосок разбирали на зерновки по их позициям внутри колоска также снизу вверх. При этом отмечали наличие пустоцветов в каждом колоске. Полученные таким образом зерновки взвешивали каждую и определяли её МТЗ. Для корректного сравнения контрольного и опытного вариантов в контроле в рассмотрение брали данные колосков только с одной стороны колоса. Полученные результаты подвергали статистическому анализу.

В результате исследований установлено, что формирование зерновок с основными или минорными МТЗ подвержено влиянию конкурентных отношений колосков в колосе. Удаление половины колосков изменяет соотношение числа зерновок с различными МТЗ. В контроле в колосе главного побега число зерновок с основными МТЗ составляло 88 %, а в опыте – 98 %. Следовательно, улучшение снабжения формирующихся зерновок водой и питательными веществами приводит к сдвигу в сторону образования основных морфотипов. При этом снижается содержание зерновок со всеми минорными МТЗ и двумя главными, а содержание зерновок с МТЗ-2 и МТЗ-3, которые в контроле составляют большинство, существенно увеличивается. Однако при этом в опытном варианте происходит уменьшение массы зерна в каждом колоске и колоса в целом, так как не формируются зерновки в пятой позиции, а увеличение массы зерновок во второй и четвертой позициях не компенсирует это уменьшение массы колоска. Отмеченные изменения сопровождаются увеличением числа пустоцветов в средних колосках опытных колосьев. Таким образом, формирование зерновок с основными и минорными морфотипами зависит от внутренних факторов: от состояния растения, от напряженности конкурентных взаимоотношений между колосками и между зерновками за воду и питательные вещества.

Влияние штамма *Pseudomonas* sp. GEOT18 – эндофита тубероидов *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae Juss.) – на ростовые процессы тест-объектов

Рассохина И.И.^{*, **}, *Платонов А.В.*^{*}, *Маракаев О.А.*^{**}, *Зайцева Ю.В.*^{**}, *Сидоров А.В.*^{**}

^{*} ФГБУН Вологодский научный центр РАН (Россия, г. Вологда).

^{**} ФГБОУ ВО Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова (Россия, г. Ярославль).
rasskhinairina@mail.ru

Применение микробиологических препаратов является одним из основных направлений развития системы органического растениеводства. Перспективными для использования в сельскохозяйственной практике являются представители рода *Pseudomonas*, для которых показана способность повышать продуктивность растений, активировать мобилизацию нитратов и фосфатов, стимулировать развитие клеток, образование боковых корней, корневых волосков и др. Цель нашего исследования – выявить влияние суспензии штамма *Pseudomonas* sp. GEOT18, изолированного из внутренних тканей стеблекорневых тубероидов генеративных особей *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae Juss.), на посевные характеристики семян, ростовые процессы и содержание хлорофиллов в листьях тест-объектов в водной и почвенной культурах.

В качестве тест-объектов были кресс-салат (сорта Весенний и Дукат), овес посевной (сорта Лев и Яков), ячмень обыкновенный (сорта Нур и Памяти Чепелева). Опытные семена выдерживали в течение 30 минут в суспензии штамма *Pseudomonas* sp. GEOT18, контрольные – в воде. Штамм идентифицировали с помощью молекулярно-генетического анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК, полученная последовательность депонирована в базу данных GenBank под номером MT180656. Суспензию штамма *Pseudomonas* sp. GEOT18 получали на среде LB в условиях постоянного перемешивания при температуре 22-24 °С в течение 16-18 ч. опыты проводили в камере климатостата КС-200 при температуре 25 °С. Энергию прорастания и всхожесть семян определяли в чашках Петри на 3-и и 7-е сутки соответственно. Выращивание тест-объектов в водной и почвенной культурах проводили в десятикратной повторности. Для водной культуры использовали среду Кноппа. В каждый сосуд помещали по 10 проростков (водная культура) или семян (почвенная культура). Определяли морфометрические параметры, сырую и сухую массы растений, степень грибного поражения посевов. Содержание хлорофиллов выявляли спектрофотометрическим методом при длинах волн 665 нм и 649 нм, пигменты извлекали 96 %-м этиловым спиртом.

Установлено, что в опытных вариантах у кресс-салата сорта Весенний всхожесть семян увеличилась на 24 %, у ячменя сорта Памяти Чепелева – на 23 %. У овса сортов Лев и Яков в опыте длина побега оказалась больше относительно контроля на 23 % и 13 %, а длина корня – на 40 % и 21 % соответственно. В контрольных вариантах посевов на 7-е сутки грибное поражение составляло до 90 % от площади чашек Петри, в опытных вариантах заражение не отмечалось или было единичным. В водной и почвенной культурах у опытных овса и ячменя отмечена тенденция к увеличению площади листьев, сырой и сухой масс, а также среднесуточных приростов по отношению к контролю. Для ячменя эти различия оказываются наиболее выраженными. Например, сырая масса растений на 10-е сутки выращивания выше на 8 %, а сухая – на 27 %, чем в контроле. Кроме того, в опытных вариантах водной и почвенной культур в листьях тест-объектов содержание хлорофиллов ($a+b$) в среднем на 10-15 % превышает аналогичные показатели у растений в контроле.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о положительном влиянии штамма *Pseudomonas* sp. GEOT18 на всхожесть семян кресс-салата сорта Весенний и ячменя сорта Памяти Чепелева. Вероятно, используемые бактерии проявляют также антагонистическое действие по отношению к повреждающим посевам грибам. Однако это предположение требует дополнительного экспериментального подтверждения. Кроме того, штамм оказывает стимулирующее влияние на ростовые процессы тест-объектов, это в наибольшей степени проявляется у ячменя. В почвенной культуре этот эффект особенно заметен, что, вероятно, может быть связано с происхождением исследуемого штамма.

Влияние экзогенного мелатонина на фотосинтетическую и антиоксидантную активность растений семейства *Solanacea*

Шibaева Т.Г., Мамаев А.В., Шерудило Е.Г., Икконен Е.Н.

Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр РАН». Пушкинская, 11, Петрозаводск, Россия.
shibaeva@krc.karelia.ru

Мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптами́н) – гормон, индольное соединение, долгое время считавшееся присущим только животным и человеку. Универсальная представленность мелатонина у высших растений и его высокие концентрации в них, в отличие от животных организмов, привели к тому, что в 2004 г. был предложен термин «фитомелатонин». В настоящее время доказанными биологическими эффектами фитомелатонина можно считать антиоксидантный, антистрессовый и ростостимулирующий. Предполагается возможность практического применения мелатонина для повышения стрессоустойчивости и продуктивности растений. Доказано, что и корни, и листья растений способны поглощать мелатонин из среды выращивания. Благодаря малым размерам, липофильным и гидрофильным свойствам, молекулы мелатонина способны свободно проникать через морфологические и физиологические барьеры и быстро транспортироваться по межклеточным и межтканевым пространствам внутри растения.

Показано, что мелатонин в низких концентрациях может стимулировать рост растений в длину, а в высоких концентрациях оказывает ингибирующее действие. Применение различных концентраций мелатонина выявило, что эффект зависит от дозы и является видоспецифичным. Это предположительно связано с разной интенсивностью его поглощения. В литературе имеются данные о ростостимулирующем эффекте и антиоксидантном эффекте у одних видов и ингибирующем эффекте экзогенного мелатонина в той же концентрации у других видов. При проведении исследований на разных видах концентрации мелатонина могут отличаться на семь и более порядков. Целью данной работы было выявить влияние экзогенного мелатонина на фотосинтетическую и антиоксидантную активность листьев у трех видов сем. *Solanacea* – томата (*Solanum lycopersicum* L.), баклажана (*Solanum melongena* L.) и сладкого перца (*Capsicum annuum* L.). Концентрации мелатонина (1 и 200 мкМ) были выбраны с учетом того, что отличаясь многократно, обе были отмечены в литературе как стимулирующие рост и фотосинтетическую активность у других видов, в частности у огурца и брокколи.

Растения выращивали методом песчаной проливной культуры в камерах искусственного климата при температуре 23°C, плотности потока фотонов 150 мкмоль/(м²·с) ФАР, фотопериоде 16 ч, влажности воздуха 70% при поливе полным питательным раствором. Обработку мелатонином (1 и 200 мкМ) проводили двукратно (на 30 и 38 день выращивания) фолитарным методом и путем внесения 50 мл раствора под корень. Измерения проводили на растениях в возрасте 34 и 46 дней.

После первой обработки мелатонином в концентрации 1 мкМ наблюдалось увеличение на 10% скорости видимого фотосинтеза у баклажана и перца и ее снижение на 30% у растений томата. Первая обработка мелатонином в концентрации 200 мкМ снизила скорость видимого фотосинтеза в 2 раза у томата и перца и не повлияла на данный показатель у баклажана. Соответствующие изменения наблюдались и для значений устьичной проводимости. У растений всех видов, обработанных мелатонином в концентрации 200 мкМ, наблюдалось повышение значений относительного выхода электролитов на 30-37%, активности антиоксидантных ферментов (незначительное повышение активности каталазы и почти двукратное повышение активности гваякол пероксидазы), повышение содержания антоцианов и пролина.

После повторной обработки мелатонином в концентрации 1 мкМ фотосинтетическая активность растений всех видов сохранялась на уровне необработанных растений, а у растений томата на 70% увеличилось содержание антоцианов. Повторная обработка мелатонином в концентрации 200 мкМ значительно снизила содержание хлорофиллов и фотосинтетическую активность. При этом интенсивность перекисного окисления липидов (определенная по содержанию малонового диальдегида) повышалась на 25-45% в среднем для всех видов. Активность каталазы у всех видов была снижена, а активность гваякол пероксидазы возросла у томата и перца в 2 и 6 раз, соответственно. Кроме того, у всех видов отмечено увеличение содержания пролина более, чем в 3 раза.

Таким образом, экзогенный мелатонин в концентрациях 1 мкМ и 200 мкМ не оказал ожидаемого стимулирующего влияния на фотосинтетическую активность (за исключением небольшого непродолжительного повышения активности у перца и баклажана), а мелатонин в концентрации 200 мкМ частично ингибировал фотосинтетическую активность у всех трех видов. Повышение содержания пролина и активности гваякол пероксидазы скорее указывает на развитие окислительного стресса, чем на повышение антиоксидантной способности растений. При этом в литературе имеются данные, например о том, что не было обнаружено ингибирующего действия мелатонина в большой концентрации (до 600 мкМ) на рост корней *Arabidopsis thaliana*. Полученные результаты подтверждают видоспецифичность в реакциях растений на экзогенный мелатонин.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-016-00033а и из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0218-2019-0074).

Влияние экстремальных низких температур Полюса холода на липидный и жирнокислотный состав растений Якутии

Нохсоров В.В. *, Дударева Л.В. **, Петров К.А. ***

* Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова. Кулаковского ул., 48, Якутск, Россия.

** Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН. Лермонтова ул., 132, Иркутск, Россия.

*** Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН. Ленина пр., 41, Якутск, Россия.

vv.nokhsorov@s-vfu.ru

Введение. Одной из важных проблем современной биологии является изучение адаптации организмов к экстремальным условиям среды. Северо-Восточная Якутия – физико-географический регион с суровыми и весьма разнообразными условиями существования, здесь расположен Полюс холода Северного полушария. Весь регион находится в зоне вечной мерзлоты, мощность которой не превышает 700 м. Многие виды растений произрастают на пределе своего распространения.

Спецификой сезонного роста основной массы травянистой растительности Северо-Восточной Якутии является то, что она интенсивно развивается в первой половине лета, чтобы успеть пройти полный цикл вегетации, дать полноценные семена. Однако нередко хвощевые луга, особенно состоящие из *E. variegatum*, подвергаются длительному закаливанию паводковыми водами. В этих условиях они не успевают пройти полный цикл развития. При наступлении зимнего сезона осенневегетирующие растения уходят под снег с зелеными побегами, приобретая способность накапливать относительно больше запасных липидов и других питательных веществ [Petrov et al., 2020].

По современным представлениям, особенно важная роль в процессе адаптации растений к низкотемпературному стрессу отводится повышению концентрации ненасыщенных жирных кислот (ЖК) мембранных липидов, характерным изменениям в составе некоторых мембранных липидов. Например, известно, что способность клеток адаптироваться к низким температурам определяется их возможностью синтезировать *de novo* ненасыщенные ЖК, в частности, линоленовую, повышающую фазовое разделение липидов под действием низких температур. Целью представляемой работы является сравнительный анализ сезонной (лето, осень, зима) динамики количественного содержания мембранных липидов и ЖК-состава суммарных липидов в надземных частях *E. variegatum* и *E. scirpoides*, произрастающих в условиях криолитозоны (Северо-Восточная Якутия, Полюса холода).

Результаты и обсуждения. Проанализировав полученные нами данные, можно отметить определенные тенденции в изменениях содержания липидов и ЖК у исследованных видов хвощей, взятых для анализа на протяжении периода вегетации: летом, осенью и зимой при различной температуре воздуха криолитозоны. Резко континентальный климат мерзлотных экосистем, по всей вероятности, способствовал тому, что в процессе длительной эволюции сосудистые растения в этих условиях выработали сложные механизмы биохимической адаптации к экстремально низким температурам, среди которых существенная роль отводится метаболизму липидов и их особому ЖК составу. Согласно полученным данным, содержание полярных липидов фосфалипидов (ФЛ) и гликолипидов (ГЛ), выполняющих важнейшую структурно-функциональную роль в клеточных мембранах, в летне- и осенне-зимний периоды в побегах хвощей имеет сезонные различия. Так, содержание фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтаноламина (ФЭ) и фосфатидной кислоты (ФК) в тканях двух исследованных видов хвощей, в осенне-зимний период было выше, чем в летний. Известно, что ФХ и ФЭ у растений, так же, как и у животных, являются основными липидами плазматических мембран, мембран митохондрий и микросом. Помимо этого, ФХ входят в структуру внешней оболочки хлоропластов (20–30% от суммы полярных липидов) и в небольшом количестве – в составе ламелл хлоропластов. Фосфатидилглицеролы (ФГ) являются основными ФЛ мембран хлоропластов. Известно, что ФГ участвует в стабилизации фотосистемы (ФС) II и свето-собирающего комплекса II. Возможно, поэтому повышенный уровень содержания ФГ у *E. variegatum* хвоща пестрого осенью, по сравнению с летним периодом, коррелировал с увеличением содержания пигментов в этот же период.

Особый интерес представляет присутствие в липидном профиле обоих видов хвощей бетаиновых липидов (БЛ), в частности О-(1,2- диацилглицеро)-N,N,N-триметилгмосерина (ДГТС). ДГТС впервые был обнаружен в одноклеточной морской водоросли *Ochromonas danica* (*Chrysophyceae*) [Abida et al., 2015]. Дальнейшие исследования показали, что БЛ количественно значимы и широко распространены в растениях и морских водорослях. Кроме того, они присутствуют в грибах, и в тканях простейших. БЛ синтезируются также высшими сосудистыми растениями, такими, как хвощи, папоротники и мхи. Считается, что БЛ являются эволюционно древними классами липидов и характерны для криптогамных растений. Под воздействием различных видов стресса – осмотического, водного, при дефиците фосфора и т.д. – количество ДГТС может увеличиваться. Повышение содержания ДГТС в составе мембранных липидов рассматривают как один из древних механизмов биохимической адаптации растений с участием липидных молекул.

Результаты были получены в рамках выполнения государственного задания Минобрнауки России (FSRG-2020-0019). Работа поддержана Грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - кандидатов наук и докторов наук Российской Федерации (МК-1000.2021.5).

**Водорастворимые хлорофилл-связывающие белки (WSCP) высших растений:
получение и фотохимические свойства**

Обухов Ю.Н. *, Неверов К.В. *, Малеева Ю.В. **, Крицкий М.С. *

* Институт биохимии им.А.Н.Баха, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН. Ленинский проспект, 33, стр.2, Москва, Россия.

** Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова. Ленинские горы, 1, стр. 12, Москва, Россия.
y.u.g.a-0@mail.ru

Водорастворимые хлорофилл (Хл)-связывающие белки (WSCP, water soluble chlorophyll-binding protein) высших растений представляют собой не ассоциированные с мембраной гомотетрамерные пигмент-белковые комплексы, формируемые мономерами с массой около 20 кДа. В состав тетрамера может входить до 4 молекул Хл а и/или Хл b, таким образом, их структура существенно проще структуры известных фотосинтетических ансамблей. Во многих исследованиях было показано, что в клетках растений белки WSCP локализованы вне хлоропластов и не участвуют в процессе фотосинтеза. Считается, что их функция может быть связана с защитой от различных стрессовых воздействий, включая фотоокислительный стресс. Поскольку молекулы Хл в нативных WSCP упакованы в виде димеров аналогично организации Хл в реакционных центрах (РЦ) фотосинтеза, белки WSCP служат заманчивым объектом для моделирования РЦ, в том числе, в контексте изучения ранних процессов эволюции. Основной темой данной работы служит исследование практически неизученных фотобиохимических свойств белков WSCP класса II.

Основной объект исследований был выбран нами с использованием методов компьютерного анализа путем сравнения аминокислотных последовательностей гомологов WSCP. Таким объектом стал белок WSCP подкласса IIA из *Brassica oleracea* (BoWSCP), обнаруживший наибольший средний процент сходства аминокислотных последовательностей с остальными белками семейства и являющийся наиболее изученным членом семейства WSCP класса II. Белок WSCP подкласса IIB из *Lepidium virginicum* (LvWSCP) был выбран в качестве дополнительного объекта.

Разработан протокол ускоренного одностадийного получения тетрамерных Хл-белковых комплексов (ХБК) WSCP *in vitro*, основанный на извлечении Хл из тилакоидных мембран растений апобелками WSCP, присутствующими в лизате клеток штамма-продуцента с предварительной очисткой препарата ХБК термообработкой. Окончательная очистка тетрамеров WSCP проводилась на Ni-агарозной колонке. Методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии, а также спектроскопии кругового дихроизма была показана нативность полученных препаратов ХБК BoWSCP и LvWSCP.

Нами впервые продемонстрирована возможность функционирования ХБК BoWSCP и LvWSCP в водном растворе в качестве сенситизаторов фотоокисления доноров электрона (НАДН, аскорбат). Было установлено, что фотосенситизирующая активность ХБК BoWSCP при окислении НАДН более чем в 2 раза превышает таковую для ХБК LvWSCP. Анаэробные условия или добавление NaN_3 (тушителя триплетного состояния Хл и синглетного кислорода) предохраняет ХБК BoWSCP от разрушения при длительном облучении светом и замедляет (но не подавляет полностью) окисление НАДН. Это означает, что димеры Хл в ХБК BoWSCP в триплетном возбужденном состоянии могут вступать во взаимодействие с донорами электрона как напрямую, так и опосредованно, через генерацию ими активного синглетного кислорода.

Также получены данные в пользу возможности восстановления белками ХБК BoWSCP цитохрома *c* в водных растворах как в темноте, так и при фотовозбуждении. Механизм данного явления нуждается в дальнейшем углубленном исследовании.

Выявление изменения рН цитоплазмы растений картофеля, трансформированных рН-сенсором Pt-GFP, при различных стрессовых воздействиях

Печёрина А.А., Агеева М.Н., Гринберг М.А., Здобнова Т.А., Воденеев В.А., Брилкина А.А.

Нижегородский государственный университет им Н.И. Лобачевского.
Гагарина пр., 23, Нижний Новгород, Россия.
ihmmtatb@yandex.ru

Стимулы различной природы являются причиной изменения внутриклеточного рН растения. От уровня рН цитозоля зависят активность клеточных белков, мембранный транспорт, целостность компартментов и протекание окислительно-восстановительных реакций, поэтому важно изучение его динамики при действии различных факторов. Анализ уровня рН может быть осуществлен разными методами, например, с помощью микроэлектродов, зондов и генетически-кодирующих сенсоров, к которым относится ратиометрический флуоресцентный рН-сенсор Pt-GFP. Этот белок обладает двумя пиками на спектре поглощения флуоресценции (390 и 475 нм), величина которых зависит от рН среды: при низком рН выражены оба пика; при защелачивании рН пик при 395 нм сглаживается, а при 475 нм возрастает. Отличительными особенностями кодируемых сенсоров являются их нетоксичность для клеток, неинвазивность процедуры приёма сигнала сенсора и экспрессия во всех органах, позволяющая отслеживать колебания концентрации аналита в целом организме. Визуализация уровня рН растений, экспрессирующих Pt-GFP, возможна как в отдельных клетках и тканях с применением высоко разрешающей ЛСМ-микроскопии, так и на уровне целого живого организма с помощью установок оптического «whole-body» имиджинга, которые позволяют выявлять пространственно-временную динамику изменения рН. Целью данной работы было исследование изменения рН растений картофеля при различных типах стрессоров.

Картофель с генетически-кодируемым сенсором получали методом агробактериальной трансформации с помощью агробактерий штамма AGL0, несущих плазмиду pART27 с генами Pt-GFP и nptII (ген устойчивости к канамицину) под контролем промотора CaMV 35S (NanoLight® Technologies, США). Регенерацию стеблевых эксплантов проводили на питательной среде Мурасиге и Скуга (МС) с фитогормонами 6-БАП (3 мг/л) и ИУК (0,5 мг/л) в течение двух месяцев. Наличие вставки гена Pt-GFP в регенерировавших побегах подтвердили с помощью ПЦР.

Отбор линий трансформированных растений картофеля проводили на основе интенсивности флуоресценции на длинах волн, характерных для Pt-GFP, с помощью спектрофлуориметра RF-5301PC (Shimadzu, Япония) при длине волны возбуждающего света 460 нм.

Флуоресцентные изображения клеток, экспрессирующих Pt-GFP, разных органов (лист, стебель, корень) регенерировавших побегов картофеля получали с помощью конфокального микроскопа Axio Observer Z1 LSM 710 NLO/Duo (Carl Zeiss, Германия). Возбуждение флуоресцентного сенсора в растении осуществляли при 405 и 488 нм, флуоресценцию принимали в диапазоне 505-525 нм. Для получения калибровочной зависимости флуоресценции сенсора Pt-GFP от цитоплазматического рН в колумелле, коре зоны всасывания корня, коре стебля и адаксиальном мезофилле растения предварительно инкубировали в буферных растворах с рН 5, 6, 7 и 8, содержащих 25 ммоль/л протонофора карбонилцианид м-хлорфенилгидразона (КЦХФГ) и получали флуоресцентные изображения клеток. Далее изображения обрабатывали в программе ImageJ и рассчитывали значения отношения испускаемой флуоресценции при возбуждении 488 нм и 405 нм (F488/F405).

Определение относительного изменения рН на уровне whole-plant производили с использованием установки оптического имиджинга DVS-03 (ИФТ РАН, Россия), снабженной синим светодиодом (450 нм) для возбуждения сенсора Pt-GFP. В качестве стрессового воздействия использовали биотическое (личинка колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata*) или абиотическое (механическое) повреждение или температурное воздействие: +4 и +90°C. Воздействие наносили на часть листа. Одновременно производили измерение электрической активности. После гипертермии в зоне воздействия зафиксировано резкое повышение интенсивности флуоресценции и, следовательно, повышение рН. Для других видов воздействия наблюдалось временное снижение флуоресценции сенсора на участках листа, близких к зоне раздражения, что свидетельствует о закислении цитоплазмы клеток. С течением времени интенсивность флуоресцентного сигнала незначительно повышалась, возвращалась к исходной или становилась значительно выше, т.е. происходило восстановление исходного уровня рН или его защелачивание. Интенсивность и длительность ответа определяются типом повреждения и удаленностью от места воздействия. Динамика изменения рН может зависеть от функционирования электрогенной H⁺-АТФазы, которая в свою очередь участвует в генерации электрического сигнала. Характер ответов, выявленный для флуоресценции рН-сенсора, согласовывался с изменением электрических сигналов. С помощью полученных модельных растений картофеля, экспрессирующих рН-чувствительный сенсор Pt-GFP, возможно проводить динамические исследования изменения рН в живых клетках и в целом растении при различных внешних воздействиях.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 19-04-00614 А и 17-29-08026 офи_м).

Гены *CLE* в утолщении клубня и развитии флоэмы картофеля

Ганчева М.С.^{* **}, Лосев М.Р.^{*}, Додуева И.Е.^{*}, Лутова Л.А.^{*}

* Санкт-Петербургский Государственный Университет. Университетская наб. 7/9, Санкт-Петербург, Россия.

** ВНИИ Сельскохозяйственной Микробиологии. ш. Подбельского, 3, Санкт-Петербург, Россия.
ganchovai@gmail.com

Образование клубня у картофеля включает в себя несколько процессов. В первую очередь, развитие клубня зависит от делений клеток, которые начинаются в сердцевине и коре субапикальной зоны столона и продолжаются активными делениями в перимедуллярной зоне. Большую часть клубня занимает именно перимедуллярная зона, в которой образуется пул клеток, выполняющих запасную функцию. Во-вторых, для того, чтобы эффективно снабжать клетки клубня фотоассимилятами, в клубне образуются дополнительные тяжи флоэмы, которые формируют сеть, пронизывающую весь клубень. При этом, для достижения периода покоя клубнями необходима изоляция флоэмы почек клубня картофеля, от флоэмы остального клубня. Соединение проводящих систем происходит ближе к весне, в результате чего почки начинают снабжаться сахарами и расти.

В регуляции процессов деления клеток клубня, а также в развитии флоэмы клубня, могут принимать участие пептидные гормоны семейства *CLE*. У резуховидки два пептида *CLE*, *CLE41* и *CLE44*, участвуют в регуляции пролиферации камбия, благодаря которому происходит рост утолщением. В развитии флоэмы у *Arabidopsis* участвуют другие два пептида *CLE* – *CLE25* и *CLE45*. *CLE45* является негативным регулятором, который ингибирует дифференцировку флоэмы. *CLE25* экспрессируется во флоэме и позитивно регулирует дифференцировку элементов флоэмы – мутация в гене *CLE25* приводила к задержке формирования клеток флоэмы, вызывая торможению флоэмного транспорта, в результате чего фотоассимиляты не транспортировались, а накапливались в листьях, что приводило к укорочению корней и снижению биомассы растения. У картофеля (*Solanum tuberosum*), на основании гомологии с генами резуховидки, а также по результатам транскриптомного анализа и анализа с помощью ПЦР в реальном времени, были выявлены кандидаты на роль регуляторов деления клеток и дифференцировки клеток флоэмы – гены *StCLE8* и *StCLE12* экспрессировались в клетках перимедуллярной зоны, а *StCLE19* – в клетках флоэмы. Мы предполагаем, что пептиды *StCLE8* и *StCLE12* могут регулировать деления клеток перимедуллярной зоны, а *StCLE19* может участвовать как в образовании дополнительных тяжей флоэмы в клубне, так и в соединении проводящих систем спящих почек и остального клубня. Для дальнейшего изучения функций этих генов мы создали конструкции для сверхэкспрессии и анализа активности промоторов генов *StCLE8*, *StCLE12* и *StCLE19*.

Данная работа была выполнена при поддержке грантов РФФИ 20-316-80004 и 18-04-01017.

Гены, определяющие карликовость арбуза *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai

Стрыгина К. *, Елацкова А. **, Елацков Ю. **, Теханович Г. **, Хлесткина Е. *

* Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова. ул. Большая Морская, 42, 44, Санкт-Петербург, Россия.

** Кубанская опытная станция ВИР, Краснодар, Гулькевичский район, п. Ботаника, ул. Центральная, 2, Россия.
k.strygina@vir.nw.ru

Бахчевые культуры (семейство Cucurbitaceae Juss.) характеризуются развитием длинной плети, достигающей 1,5-5 м в длину, что затрудняет сбор урожая. Используя методы молекулярной генетики и селекции, можно создать карликовые сорта бахчевых культур, приспособленных к произрастанию в условиях закрытого грунта. Целью данной работы является идентификация и маркировка генов в геноме арбуза *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai, ответственных за формирование карликовой плети, на основе уникальной коллекции бахчевых культур Федерального исследовательского центра Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР). В геномах видов семейства Cucurbitaceae был проведён поиск гомологичных последовательностей генов арбузных карликов *dw-1* (ABC транспортёр), *dsh* (гиббереллин-20-оксидаза) и *df* (гиббереллин-3-бета-гидроксилаза). В геномах видов *Benincaseae* Ser., кроме *Cucumis melo* L., была идентифицирована одна копия *dw-1*, а в геномах видов *Cucurbitaceae* Ser. и *C. melo* - две копии. Ген *dsh* был идентифицирован в двух копиях у *C. lanatus*, в четырёх копиях у *Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn. и в одной копии у других проанализированных видов, за исключением *Cucurbita maxima* Duchesne ex Lam. и *C. moschata* Duchesne, у которых ген не был идентифицирован. У *C. lanatus*, *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl. и всех видов рода *Cucurbita*, а также у *B. hispida* и всех видов рода *Cucumis* были обнаружены две и три копии *df*, соответственно. Был проанализирован аллельный полиморфизм генов *dw-1*, *dsh*, *df* и их копий *dsh2* и *df2* в геномах арбузов сортов коллекции ВИР. Всего было изучено 23 сорта и линии и 28 гибридов *C. lanatus*, среди которых было 12 кустовых, 2 ультракустовых, 7 короткоплетистых и 30 плетистых образцов. В результате было выявлено значительное изменение гена *dw-1* у двух ультракустовых и 10 кустовых генотипов, которое могло привести к изменению функции гена. Для оставшихся двух кустовых образцов при секвенировании генов *dsh*, *df*, *dsh2* и *df2* значимых мутаций выявлено не было. Таким образом, в коллекции бахчевых культур ВИР содержатся источники неустановленных генов кустовости.

Настоящее исследование выполнено в рамках государственного задания ВИР согласно тематическому плану НИР по теме № 0481-2019-0001 "Геномные и постгеномные технологии для выявления новых генетических маркеров селекционно значимых свойств и новых аллельных вариантов хозяйственно ценных генов в генофонде культурных растений и их диких родичей".

Гибридные информационные войны в растительно-микробных сообществах

Гоглев Ю.В. *, Гоголева Н.Е. *, Коннова Т.А. *, Осипова Е.В. *, Горшков В.Ю. *,
Шапошников А.И. **, Юзихин О.В. **, Белимов А.А. **

* Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра "Казанский научный центр Российской академии наук", Академика Арбузова, 8, Казань, Россия.

** Институт сельскохозяйственной микробиологии (ВНИИСХМ РАН), шоссе Подбельского, 3, Пушкин-8, Санкт-Петербург, Россия.
gogolev.yuri@gmail.com

При формировании и развитии растительно-микробных сообществ важную роль играет не только способность макро- и микроорганизмов распознавать специфических и неспецифических партнеров, но так же возможность манипулировать друг другом и другими организмами и вырабатывать правильную стратегию для создания информационной среды, в конечном итоге, благоприятствующей данному виду, как члену сообщества. Выработка химических сигналов внутривидовой и межвидовой коммуникации помогает мобилизовать ресурсы на популяционном уровне и внутри консорциумов дружественных сообществ, создавать и укреплять симбиотические (мутуалистические) взаимоотношения и препятствовать развитию паразитических и патогенных сценариев. Благодаря этому, присутствие патогенов и потенциальных паразитов не всегда сопровождается патологией и снижением общей продуктивности. С другой стороны, перехват и блокировка чужих сигналов, а также передача ложной информации создают широкие возможности для информационных войн, характеризующихся высокой эффективностью при минимальных энергетических затратах.

Растительно-микробный переговорный обмен сигналами (кросс-толк) подробно изучен на примерах бобово-ризобияльного симбиоза, некоторых PGPR и специализированных патогенов, таких как *Pseudomonas syringae* и *Agrobacterium tumefaciens*. Однако, изучение множества других сообществ выявило глобальную распространенность межвидового сигналинга, как и то, что в природных биотопах он является частью сложных сигнальных цепей и сетей, в которые, помимо растений бактерий и грибов, вовлечены насекомые, нематоды, позвоночные, а также, в значительной степени, вирусы и бактериофаги. Так, было показано, что насекомые используют симбиотические бактерии для инфицирования растений не столько как оружие нападения, сколько как источник элиситоров, переключающих фитоиммунитет на борьбу с инфекцией, что оголяет фланг обороны для атаки фитофагами. С другой стороны, микоплазмы, вырабатывая белковый фактор разобщения жасмонат-зависимой сигнальной системы, не получают прямой выгоды, однако, создают условия преференции цикадкам, которые являются для них переносчиком и альтернативным хозяином. Кроме того, микоплазмы стимулируют множественный рост молодых побегов, флоэма которых служит для них экологической нишей и питательным субстратом для симбиотических насекомых.

Не только выработка, но также деградация сигнальных молекул противника служит эффективным приемом манипулирования. Одним из полезных свойств *Bacillus subtilis* является то, что они оберегают своих растений-хозяев, разрушая аутоиндукторы кворум-сенсинга патогенных псевдомонад; растения, в свою очередь, обогащают корневые выделения субстратами, благоприятными для роста бацилл. Ризобактерия *Variovorax paradoxus* разрушает предшественник этилена, используя его как источник питания, пролонгируя вегетационный период растений, стимулируя рост корней и корневую экссудацию, создавая, таким образом, благоприятную для себя среду обитания. Некоторые PGPR способны к деградации и усвоению абсцизовой кислоты, что не только стимулирует рост растений, но также благотворно сказывается на плодородии почв. Кроме того, перехват АБК, вырабатываемой многими грибами в качестве фактора вирулентности, дает преимущество растениям в борьбе с фитопатогенами. В проведенном нами исследовании была выполнена оценка данных эффектов. Был также впервые описан последовательный ряд метаболитов микробной редукции АБК. Расшифровка химической структуры ключевого звена этого процесса позволяет утверждать об открытии нового пути катаболизма данного фитогормона. По результатам транскриптомного анализа составлен предварительный список ферментов, которыми располагают бактерии для усвоения АБК.

На основании накопленной информации можно предположить, что сигнальный гомеостаз природного сообщества достигается при участии всех его членов и является важным элементом устойчивости экосистем.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект №17-14-01363; работы по транскриптомному анализу поддержаны Грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Гликирование белков растений в контексте онтогенетических изменений и экологических взаимодействий

Фролов А.А.^{* **}, Билова Т.Е.^{* **}, Ким А.^{}, Царев А.А.^{* **}, Илинг К.^{***}, Шумилина Ю.С.^{* **}, Лукашева Е.М.^{*},
Матаморос М.А.^{****}, Демченко К.Н.^{*****}, Цыганов В.Е.^{*****},
Зинц А.^{**}, Жуков В.А.^{*****}, Вессйоханн Л.А.^{**}**

* Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб. 7/9, Санкт-Петербург, Россия.

** Лейбниц-Институт Биохимии Растений, Weinberg 3, 06120 Halle (Saale), Germany.

*** Институт фармации, Мартин-Лютер университет Галле-Виттенберг,
Halle-Wittenberg, DE 06120, Halle/Saale, Germany.

**** Испанский Национальный Исследовательский Совет, Департамент Питания Растений,
Apartado 13034, 50080 Zaragoza, Spain.

***** ФГБУН Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН,
ул. Профессора Попова, 2, 197376, Санкт-Петербург, Россия.

***** Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии,
шоссе Подбельского, д. 3, Пушкин-8, 196608, Санкт-Петербург, Россия.

Гликирование представляет собой группу неферментативных пост-трансляционных модификаций белков, образующихся в результате взаимодействия их amino- и гуанидиновых групп с карбонильными соединениями – восстанавливающими сахарами и α -дикарбонильными продуктами их окислительной деградации. Химические процессы, лежащие в основе гликирования, часто объединяемые термином «реакция Майара белков», хорошо известны в медицине и пищевой химии. Действительно, образующиеся в результате конечные продукты глубокого гликирования (КПГГ), с одной стороны, вносят существенный вклад в старение и патогенез таких заболеваний как атеросклероз, сахарный диабет, болезнь Альцгеймера, с другой – образуются в процессе термической обработки пищи. В человеческом организме КПГГ обладают выраженным провоспалительным и атерогенным эффектом. Не смотря на то, что гликирование белков животных и человека известно в течение почти века, в растениях этот процесс был описан лишь десять лет назад, когда группой профессора Торнелли было показано усиление образования КПГГ в модели светового стресса арабидопсиса. В ходе нашей работы было показано, что конститутивный уровень образования КПГГ в растениях существенно выше чем в крови и тканях животных – более 1000 сайтов гликирования было выявлено в белках арабидопсиса и рапса. При этом, наблюдались значительные отличия в механизмах, паттернах и интермедиатах гликирования. Так, в отличие от животных, у растений КПГГ преобладают над продуктами раннего гликирования, причем выше уровень аргининовых модификаций, которые встречаются преимущественно в регуляторных белках. Это наблюдение хорошо согласуется с высоким содержанием активных форм кислорода и высокореактивных сахаров в тканях растений, которые (в отличие глюкозы у животных и человека) являются основными гликирующими агентами у растений. Далее, нами было показано, что с возрастом в органах растений увеличивается уровень гликирования специфических сайтов белков – так называемых горячих точек гликирования, причем, это затрагивает не только листья, но и такие специфические структуры как корневые клубеньки бобовых. Интересно, что подобные горячие точки гликирования были выявлены нами в белках растений, подвергнутых действию засухи и светового стресса. Важно отметить, что в значительной степени такие сайты гликирования находились в регуляторных белках – транскрипционных факторах, рецепторах, регуляторных ферментах. Это позволяет предположить роль гликирования в регуляции функций растительного организма, что безусловно открывает новое направление в физиологии растений.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№18-016-00190).

Дегидрины в сезонном цикле хвойных растений в условиях криолитозоны

Татарина Т.Д., Перк А.А., Пономарев А.Г., Васильева И.В.

Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, пр. Ленина, 41, Якутск, Россия.
t.tatarinova@gmail.com

Воздействие стресс-факторов различной природы индуцирует в растениях синтез специфических стрессовых белков, во многом определяющих формирование их фенотипической устойчивости. К их числу относятся и дегидрины, высокогидрофильные термостабильные или LEA-белки, содержащие консервативные K-, Y- и S-сегменты. Показано, что накопление дегидринов способствует приобретению устойчивости не только к осмотическому, но и к низкотемпературному стрессу. Уникальные климатические условия Центральной Якутии, для которой характерны экстремально низкие зимние температуры и многолетняя мерзлота, значительно ограничивают распространение древесных видов растений, в т. ч. вечнозеленых. К таковым относятся представители семейства Сосновые (*Pinaceae* Lindl.) – сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) и ель сибирская (*Picea obovata* Ledeb.), которые наряду с летнезеленой лиственницей Каяндера (*Larix cajanderi* Mayr), являются основными лесообразующими хвойными видами Северо-Востока Сибири. Вместе с тем, при формировании устойчивости к условиям экстремального климата криолитозоны, эколого-физиологические характеристики, а также пределы адаптационного потенциала сосны и ели, могут существенно различаться. Так, сосна является светолюбивым видом, произрастает в более засушливых и легкодренируемых местообитаниях, в отличие от ели, которая теневынослива и предпочитает увлажненные почвы. В период длительного зимнего покоя в условиях Якутии надземные органы древесных растений испытывают особенно сильное воздействие неблагоприятного холодового фактора, приводящего к осмотическому стрессу. Вследствие физико-химических особенностей структуры, одной из функций дегидринов может являться участие в защите биополимеров от денатурации и в сохранении целостности клеточных структур и мембран от повреждений, вызванных дегидратацией.

Целью работы явилась сравнительная характеристика состава дегидринов и их изменений в сезонном цикле хвойных растений на примере вечнозеленых видов – сосны обыкновенной и ели сибирской в природно-климатических условиях Центральной Якутии. Сбор образцов (однолетние побеги) проводили в лесопарковой зоне в окрестностях г. Якутска (62°15' с.ш., 129°37' в.д.). Разделение суммарных белков проводили методом гель-электрофореза в 13.5% ПААГ. Для иммуноблоттинга белки переносили на ПВДФ-мембрану (Bio-Rad, USA). Идентификацию дегидринов выполняли с помощью поликлональных антител против их консервативного K-сегмента (Agrisera, Sweden). Дегидрины визуализировали при помощи кроличьих антител, конъюгированных с щелочной фосфатазой (Sigma, USA).

В побегах сосны обыкновенной и ели сибирской, произрастающих в условиях криолитозоны, спектры белков в сезонном цикле характеризовались разнообразием дегидринов, максимальное содержание которых выявлено в период зимнего покоя и которые, вероятно, ассоциированы с формированием зимостойкости растений. Устойчиво высокий уровень дегидринов в побегах сосны и ели наблюдался зимой в декабре-феврале, когда отмечались сверхнизкие отрицательные температуры. Во время зимнего покоя в однолетних побегах *P. sylvestris* обнаружены мажорные дегидрины с м.м. 14, 15, и 66 кДа, также в гораздо меньшем количестве представлены белки в области м.м. 22, 26-28, 41, 48, 55 и 127 кДа. В побегах *P. obovata* выявлялись мажорные дегидрины с м.м. 13, 15, 17, 24, 29, 35, 37, 45 и 57 кДа. В целом, дегидрины в побегах сосны и ели при наличии общих черт в сезонном цикле, отличались числом мажорных дегидринов, которое у ели превышает таковое сосны. Возможно, это связано с более влаголюбивым характером данного вида. Дегидрины в области 55-66 кДа в побегах изученных растений проявляются круглогодично, что может свидетельствовать об их конститутивных свойствах. Значимых различий в характере сезонных изменений состава дегидринов между двумя видами в осенний и зимний периоды не выявлено. Независимо от видовых особенностей, наиболее выраженным изменениям подвержены низкомолекулярные дегидрины. Так, сезонно-зависимыми белками являются, в побегах сосны дегидрины с м.м. 14 и 15 кДа, в побегах ели – 13 и 15 кДа. С началом ростовых процессов в апреле-мае наблюдались значительное снижение их содержания, вплоть до полного исчезновения в побегах сосны летом, и низкий, но стабильный, уровень в побегах ели. Возобновление синтеза дегидринов в побегах обоих видов происходило осенью при переходе к покою (конец августа-сентябрь) с достижением максимальных значений в октябре к концу фенологической осени. Такое появление дегидринов, особенно низкомолекулярных, в период осенней акклимации растений к холоду указывает на их индуцибельный характер, вызванный процессами сокращения долготы дня и нарастания холодового фактора. Накопление и поддержание высокого уровня дегидринов в побегах сосны и ели при переходе к покою и во время низкотемпературного зимнего периода предполагают их участие в защите клеток от обезвоживания. Изменения состава и разнообразие дегидринов в сезонном цикле сосны обыкновенной и ели сибирской указывают на их важную роль в формировании морозоустойчивости вечнозеленых хвойных растений к условиям экстремального климата криолитозоны.

**Действие экзогенного этилена на содержание полиаминов
и УФ-В-устойчивость мутанта *spms1-1***

Прудникова О.Н., Ракитина Т.Я., Карягин В.В., Ракитин В.Ю.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева РАН; Россия, 127276, Москва, ул. Ботаническая 35.
rakit@ippras.ru

Радиация в диапазоне 280-320нм (УФ-В) воздействует на рост и морфогенез растений, повреждает фотосинтетический аппарат, структуру ДНК. Для реализации ответных реакций на различные дозы УФ-В участвуют соединения, связанные с защитой растений. Это салициловая кислота, антиоксиданты, **полиамины**, ионы кальция, активные формы кислорода и в первую очередь фитогормоны, такие как **этилен** и **абсцизовая кислота (АБК)**. Полиамины осуществляют защитные функции при окислительном стрессе, связывая свободные радикалы, активные формы кислорода, предотвращая перекисное окисление липидов. Во многих случаях продемонстрирована протекторная роль этих соединений, особенно спермидина и спермина.

Ранее мы показали, что УФ-В радиация вызывает в растениях *A. thaliana* увеличение синтеза этилена, а также путресцина – предшественника высших полиаминов спермидина и спермина, которые, осуществляя протекторные функции, интенсивно расходуются при стрессе. Использование ингибитора действия этилена 1 МСР и мутантов этиленового сигнального пути (ЭСП) *A. thaliana etr 1-1* и *ctr 1-1* позволило установить, что накопление путресцина не зависело от функционирования ЭСП, однако активированный образующимся при УФ-В стрессе этиленом ЭСП уменьшал потери спермидина и спермина, ускоряя синтез этих полиаминов из путресцина.

Изучали действия экзогенного этилена на ростовые реакции, устойчивость, изменение содержания полиаминов при УФ-В стрессе у спермин- дефицитного мутанта *spms 1-1* в сравнении с WT.

В экспериментах использовали двухнедельные растения *Arabidopsis thaliana* расы Columbia (Col-0) дикого типа и *spms 1-1*. Обработку этиленом в концентрациях от 0,01 до 100 мкл/л проводили в 20-литровых герметичных стеклянных камерах 24 часа до облучения УФ-В. Этилен получали щелочным гидролизом 2-хлорэтилфосфоновой кислоты. Содержание этилена, кислорода, углекислого газа и азота в камерах контролировали методами газовой хроматографии. Интенсивность УФ-В облучения в диапазоне 280 - 320нм на уровне растений составляла $5 \pm 0,5$ Вт/м². Растения облучали умеренной 7 кДж/м², высокой 14 кДж/м² и летальной 21 кДж/м² дозами УФ-В радиации. Через 24ч после облучения во всех вариантах определяли содержание свободных полиаминов.

Проведенные эксперименты показали, что экзогенный этилен не влиял на содержание полиаминов в неподвергнутых УФ-В стрессу растениях дикого типа и *spms1-1*. Предварительная обработка растений этиленом повышала их УФ-В-устойчивость. Этилен способствовал поддержанию необходимого уровня высших полиаминов, усиливая их синтез из накапливающегося под влиянием УФ-В стресса путресцина. Различий в УФ-В устойчивости растений *spms1-1* и дикого типа, обработанных этиленом, обнаружено не было.

Динамика жирнокислотного состава фосфолипидов растений в условиях кратковременной гипоксии и среды CO₂

Ершова А.Н.^{*}, Тюрина И.В.^{**}

^{*} ФГБОУ ВО «Воронежский государственный педагогический университет», ул. Ленина, 86, Воронеж, Россия.

^{**} ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Университетская пл., 1, Воронеж, Россия.
aershova@vspsu.ac.ru

Липиды являются важнейшим структурным, запасным и функциональным компонентом растительных клеток. По своей химической структуре группа природных липидов многочисленна, гетерогенна и находятся в состоянии постоянного динамического равновесия. Фосфолипиды, относятся к полярным липидам и являются интегральными компонентами клеточных мембран, определяя вместе с белками их структуру и функции. Факторы внешней среды оказывают существенное влияние на состав и свойства липидов растений. Известно, что гетерогенность фосфолипидов определяется особенностями их жирнокислотного состава. Уменьшение содержания суммарных липидов, в основном за счет группы полярных липидов, отмечалось при анаэробном выращивании отдельных видов растений, устойчивых или неустойчивых к аноксии. Проведенные исследования касались изучения влияния длительных (многосуточных) экспозиций в условиях дефицита кислорода. В то же время ранее нами было показано, что уже при кратковременном (до суток) нахождении растений в условиях гипоксии происходили изменения в фонде свободных жирных кислот за счет увеличения содержания ненасыщенных кислот. Предполагалось, что это могло быть результатом распада фосфолипидных компонентов мембран, усиливающегося в клетках растений при дефиците кислорода. При этом выявили, что высокие концентрации диоксида углерода усиливали все эффекты гипоксии на содержание и состав свободных жирных кислот. В связи с этим исследовали динамику изменения жирнокислотного состава фосфолипидов растений, которые находились в условиях аэрации, кратковременной гипоксии и CO₂-среды.

Объектом исследования были 10-12 дневные проростки кукурузы (*Zea mays L.*). Проростки помещали на 3-24 часа в затемненные вакуум-эксикаторы, через которые пропускали газовые среды: воздух (контроль), азот (содержание кислорода менее 1,0% v/v) или CO₂ из баллона. Липиды экстрагировали после фиксации проб кипящим изопропанолом – смесью гексан : изопропанол (3:2). в присутствии антиоксиданта ионола и очищали от нелипидных примесей. Фосфолипиды из липидной фракции выделяли методом тонкослойной хроматографии. Гидролиз фосфолипидов и метилирование жирных кислот проводили в запаянных ампулах при +100°C в присутствии метилирующей смеси. Метилловые эфиры жирных кислот экстрагировали гексаном, упаривали в токе азота при +40°C и доводили объем до 0,5 мл. Метилловые эфиры жирных кислот анализировали методом газожидкостной хроматографии на приборе "Chrom 42" (Чехия) в изотермическом режиме с пламенно-ионизационным детектором и колонкой, заполненной 10% полиэтиленгликольсукцинатом на хроматоне N-AW ("Chemapol", Чехия). Пики метилловых эфиров жирных кислот идентифицировали по времени удерживания на колонке в сравнении со стандартным набором K-101 Mixture Zot 1314 ("Sigma", США). Содержание каждой кислоты выражали в % от суммы площадей всех обнаруженных кислот и рассчитывали индекс ненасыщенности жирных кислот (ИН).

Было установлено, что в фосфолипидах проростков кукурузы доминирующими среди жирных кислот были пальмитиновая (C16:0) и линолевая C18:2) кислоты, содержание которых составляло 27.39% и 54.78% от суммы всех кислот. При дефиците кислорода в первые 3-6 часов содержание диеновой C18:2 кислоты в фосфолипидах снижалось, а моноеновой пальмитолеиновой кислоты (C16:1) увеличивалось до 7.54%. При этом индекс ненасыщенности (ИН) жирных кислот уменьшался с 1.15 (аэрация) до 0.96. Уменьшение в фосфолипидах проростков кукурузы при гипоксии содержания ненасыщенных жирных кислот могло быть обусловлено как деструкцией фосфолипидов, так и усилением процессов перекисного окисления их жирных кислот под действием липоксигеназ. К 24 часам гипоксии содержание C18:2 постепенно возрастало до уровня аэрируемых растений, что могло происходить за счет усиления синтеза полиеновых кислот из моноеновых под действием соответствующих десатураз. ИН жирных кислот фосфолипидов повышался, но оставался еще ниже аэрируемых растений, так как одновременно снижалось содержание пальмитолеиновой кислоты с 7.74% до 0.92% и возрастало пальмитиновой кислоты до 29.17%. При действии CO₂-среды на проростки отмечались более значительные изменения в составе жирных кислот фосфолипидов, чем в среде инертного газа азота. Проведенные исследования показали, что изменения в составе жирных кислот фосфолипидов растений, попадающих в условия дефицита кислорода (гипоксия) начинают проявляться уже при достаточно коротких, часовых экспозициях (3-6 час), а не многосуточных, как ранее отмечалось. Предполагается, что наблюдаемое достаточно быстрое восстановление уровня ненасыщенности жирных кислот фосфолипидов позволяло проросткам кукурузы, относящимся к среднеустойчивым растениям, в условиях кратковременного дефицита кислорода стабилизировать структуру и свойства своих мембран, что повышало их адаптационные возможности. При этом углекислый газ, как компонент газовой среды, выступал не только в роли аллостерического регулятора активности ферментов, но влиял на фосфолипидные компоненты мембран клеток, выступая в роли низкомолекулярных регуляторных молекул не только в организме животных, но и растений.

Динамика роста и развития растений картофеля в условиях хлоридного засоления

Мурган О.К., Ефимова М.В.

Национальный исследовательский Томский государственный университет, пр. Ленина 36, Томск, Россия.
reborn_rinni@mail.ru

Хлоридное засоление является одним из негативных факторов окружающей среды, снижающих продуктивность культур значимых для сельского хозяйства. Подавляющее большинство сельскохозяйственных культур относится к растениям гликофитам, механизмы солеустойчивости многих из них достаточно хорошо исследованы, чего нельзя сказать о растениях картофеля. В то же самое время картофель является четвертой по значимости продуктовой сельскохозяйственной культурой в мире, производство которой имеет важную роль для обеспечения продовольственной безопасности и социальной стабильности во многих странах. Это делает актуальным изучение механизмов солеустойчивости хозяйственно ценных сортов картофеля для понимания стратегии их адаптации к условиям засоленных местообитаний и разработки эффективных технологий повышения их солетолерантности.

Ранее нами было установлено, что растения картофеля сорта Луговской отвечали на засоление (продолжительность 7 суток) значительным ингибированием ростовых процессов, снижением содержания хлорофилла *a* и торможением образования столонов, что свидетельствует о достаточно низкой солеустойчивости сорта. Вместе с тем при слабом и умеренном солевом стрессе растения сохраняли водный гомеостаз за счет эффективной осморегуляции, активно накапливали пролин, обладающий стресс-протекторным действием, и практически не обнаруживали развития окислительного стресса. Высказано предположение, что уровень солеустойчивости данного сорта лимитируется, с одной стороны, низкой способностью корневой системы удерживать ионы натрия и обеспечивать избирательный транспорт ионов в надземную часть и, с другой стороны, низкой эффективностью системы компартментации ионов натрия из цитоплазмы клеток листа в центральную вакуоль для снижения их токсического эффекта. В данной работе нами была проведена оценка влияния хлорида натрия (75 и 150 мМ) на динамику роста и развития растений картофеля.

Исследования проводили на растениях *Solanum tuberosum* L. среднеспелого сорта Луговской. Оздоровленные растения-регенеранты картофеля *in vitro* получали из апикальной меристемы и на протяжении 21 суток культивировали на агаризованной модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга (МС). Корни растений отмывали от агаризованной среды и проводили недельную адаптацию микроклонов к жидкой половинной среде МС и условиям воздушной среды под люминесцентными лампами L36W/77 Fluora («Osram», Германия) при плотности потока квантов ФАР 100–150 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ в фитотроне с 16-часовым фотопериодом и температурой 20 ± 3°C. После 2-х недельного роста на гидропонной установке в среде МС растения переносили на питательную среду МС в отсутствие (контрольный вариант) или в присутствии 75 или 150 мМ NaCl (опытные варианты). Используемые в данной работе концентрации NaCl были подобраны в предварительных опытах. Суточную динамику линейных размеров осевых органов, площади ассимилирующей поверхности, количества ярусов, числа листьев, столонов, сырой биомассы растений оценивали на 1-, 3- и 5-е сутки после начала солевого воздействия.

Негативный эффект хлоридного засоления проявлялся на растениях через первые сутки воздействия. Суммарная площадь ассимилирующей поверхности, вне зависимости от действующей концентрации соли, уменьшалась на 15%, биомасса растений также снижалась, но только при 150 мМ NaCl. На третьи сутки действия стрессора в высокой концентрации наблюдалось замедление столонообразования, сокращения площади листовой поверхности, уменьшение роста стебля и, как следствие, суммарной массы растений на 23%, 35%, 10% и 33% соответственно. В связи с этим была ниже на 33% относительно соответствующих значений контрольного варианта. В то время, как в ответ на действие низкой концентрации NaCl реакция растений выражалась только в сокращении размеров фотосинтетического аппарата и массы растений на 18 и 12%. Увеличение продолжительности действия хлоридного засоления до 5 суток привело к ожидаемому усилению негативного эффекта стрессора. При этом степень повреждения растений характерная для 75 мМ NaCl соответствовала изменениям ростовых показателей в ответ на 3-суточное воздействие 150 мМ NaCl.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 20-54-00013-Бел_а).

Динамика роста: полисахаридный ансамбль растительных клеточных стенок

*Козлова Л.В. *, Петрова А.А. *, Назипова А.Р. *, Горшков О.В. *,
Энейская Е.В. **, Кульминская А.А. **, Горшкова Т.А. **

* Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук».

** Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

Растительная клеточная стенка – многофункциональное и многокомпонентное надмолекулярное образование, преимущественно состоящее из углеводов. Полисахаридный ансамбль клеточных стенок гисто- и стадийспецифичен. Изменение состава и структуры отдельных полимеров позволяет растениям тонко регулировать такие свойства клеточных стенок, как эластичность, проницаемость для воды, адгезивность, заряд и пр. Способность «настроить» углеводный оркестр в соответствии с актуальными потребностями в полной мере реализуется в ходе роста растительных клеток растяжением. Такая настройка может осуществляться как за счет синтеза новых полисахаридов, так и в результате модификации уже существующих молекул или регулировки их взаимодействия друг с другом. В докладе будут рассмотрены изменения клеточных стенок, сопровождающие рост растяжением и гистогенез в корне кукурузы, а также механизмы, используемые растительными клетками для осуществления этих изменений.

Методом транскриптомного профилирования была оценена экспрессия гликозил-трансфераз и гликозил-гидралаз, ответственных за формирование и модификацию клеточной стенки. Результаты были сопоставлены с данными протеомного анализа из открытых источников. Подтверждение активности исследуемых ферментов было получено с применением иммуноцитохимической визуализации с использованием набора специфических антител на полисахариды клеточных стенок, а также хромогенных и флуоресцентных субстратов. Динамика механических свойств клеточных стенок в корне кукурузы была оценена с использованием атомно-силовой микроскопии на нефиксированных срезах. Компьютерное моделирование подтвердило, что различия механических свойств, наблюдаемые в продольном и радиальном направлениях, достаточны, чтобы обеспечить анизотропный рост корня (большой в длину, чем в ширину).

Таким образом, нами была установлена возможная цепочка событий от запуска экспрессии отдельных генов до реализации роста растяжением в целом органе.

Работа выполняется при поддержке гранта РФФИ №18-14-00168.

Динамика содержания фитогормонов и развитие функционального ответа при действии локального раздражителя

Ладейнова М.М., Березина Е.В., Мудрилов М.А., Брилкина А.А., Кузнецова Д.В., Воденев В.А.

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского.
Пр. Гагарина, 23, Нижний Новгород, Россия.
ladeynova.m@yandex.ru

В природе растения подвержены действию различных факторов, в том числе локального характера. Локальные факторы вызывают раздражение отдельных частей растения, в то время как остальная незатронутая действием фактора часть растения получает сигнал о данном событии. В качестве дистанционного сигнала на действие локальных повреждающих факторов могут выступать электрические реакции. Локальные повреждающие воздействия изменяют активность фотосинтетических процессов и влияют на содержание фитогормонов. Процессы распространения электрического сигнала и изменения активности фотосинтеза могут быть связаны через такие фитогормоны как абсцизовая кислота и жасмоновая кислота, так как они способны влиять на работу устьичного аппарата, тем самым изменяя интенсивность транспирации. Таким образом, цель данной работы - исследовать изменения гормонального статуса и активности фотосинтетических процессов при распространении дистанционного электрического сигнала, индуцированного действием локального фактора.

В качестве объекта исследования в работе были использованы растения гороха (*Pisum sativum* L.) 19-дневного возраста для анализа фитогормонов, для электрических и фотосинтетических ответов 18-20-дневного возраста. Для измерения содержания фитогормонов и активности фотосинтеза использовались листовые пластинки трёх последующих листьев от раздражаемого листа. В качестве модельного локального раздражителя был выбран ожог кончика листа. Распространение электрических сигналов исследовалось внеклеточно с помощью хлорсеребряных макроэлектродов, каждый из которых был установлен на черешке листа. Анализ фотосинтетических параметров проводился с использованием РАМ-флуориметра. Для оценки содержания фитогормонов осуществляли предварительную пробоподготовку, которая включала фиксацию листовых пластинок жидким азотом через различные промежутки времени после нанесения локального раздражения, гомогенизацию в экстрагирующем растворе, первичную и вторичную холодовую экстракцию, центрифугирование, отбор надосадочной жидкости с последующим концентрированным путём выпаривания и фильтрацию. Полученный растительный экстракт используется для качественного и количественного определения фитогормонов на жидкостном хроматомакс-спектрометре Shimadzu LCMS-8040.

Распространение электрического сигнала от места раздражения происходит с изменением амплитуды и скорости. Наибольшая амплитуда реакции отмечается на третьем после раздражаемого листе, второй и четвёртый лист характеризуются меньшей амплитудой, причём электрическая реакция развивается быстрее на третьем листе, несмотря на то, что второй лист ближе к зоне раздражения; наиболее удалённый от места локального раздражения четвёртый лист характеризуется наименьшей выраженностью электрической реакции. Измерение активности фотосинтеза в тех же условиях раздражения выявляет изменения таких параметров как NPQ и YII в последующих за повреждаемым ожогом листьях. Наблюдается снижение уровня эффективности фотохимических реакций фотосистемы II (YII) и рост уровня нефотохимического тушения (NPQ), причём эти изменения раньше проявляются на третьем, чем на втором листе. Анализ содержания фитогормонов в нераздражённых листьях осуществлялся через различные промежутки времени от 5 мин до 120 мин. Концентрация жасмоновой кислоты быстро возрастает в начальные промежутки времени, наиболее выраженные изменения её концентрации наблюдаются в третьем листе. Содержание абсцизовой кислоты напротив увеличивается на больших временных точках во втором листе. Наименее выраженную динамику фитогормонов можно наблюдать в самом удалённом от места локального раздражения четвёртом листе. Таким образом, можно проследить зависимость пространственно-временной динамики фитогормонов, фотосинтеза и электрического сигнала. Жасмоновая кислота может выступать посредником между электрическим сигналом и фотосинтетическим ответом, вместе с абсцизовой кислотой выступая регулятором адаптационных изменений при действии различных стрессовых факторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-34-90179).

Дифференциальная экспрессия генов в популяциях растений из Чернобыльской зоны отчуждения

Волкова П.Ю. *, Дуарте Г.Т. **, Подлущий М.С. *

* ФГБНУ «Всероссийский НИИ радиологии и агроэкологии». Киевское шоссе, 109 км, Обнинск, Россия.

** Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology. Am Mühlenberg, 1, Potsdam-Golm, Germany.
volkova.obninsk@gmail.com

Ионизирующее излучение является эволюционно древним стрессовым фактором, интенсивность которого в современной биосфере возрастает, главным образом, за счёт антропогенного воздействия. Несмотря на хорошо известные последствия острого облучения, эффекты длительного действия повышенных уровней ионизирующего излучения на растения изучены слабо. Территории, загрязнённые в результате радиационных катастроф, предоставляют уникальную возможность для изучения последствий гетерогенного хронического облучения популяций растений в сочетании с другими антропогенными и экологическими стрессорами. Принимая во внимание более высокую радиочувствительность биоты в естественной среде обитания, по сравнению с контролируемыми экотоксикологическими экспериментами, полевые исследования имеют решающее значение для определения чувствительности разных видов растений к низким дозам хронического радиационного воздействия (не превышающим, по определению МАГАТЭ, 10 мГр/сут).

В настоящей работе представлены результаты сравнительного анализа данных секвенирования РНК, полученных в популяциях радиочувствительного древесного растения сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и радиорезистентного травянистого растения пастушьей сумки обыкновенной (*Capsella bursa-pastoris* L.). Экспериментальные участки были заложены в Полесском радиационно-экологическом заповеднике на территории 30-км зоны отчуждения Чернобыльской АЭС. Секвенирование РНК хвои *P. sylvestris* и листьев *C. bursa-pastoris* на платформе Illumina, позволило выявить группы дифференциально экспрессирующихся генов, которые могут быть вовлечены в адаптацию к хроническому действию ионизирующего излучения. Показано обогащение по терминам GO, связанным с работой антиоксидантной системы, синтезом шаперонов, гистонов и контролем ряда физиологических процессов. Комплексный анализ данных транскриптомики и биохимических особенностей хронически облучаемых растений позволил сформулировать обобщённые представления об адаптивных реакциях, характерных для растений, в течение ряда поколений произрастающих на загрязнённых радионуклидами территориях. В 2021 году данные были дополнены анализом экспрессии генов у потомков *Arabidopsis thaliana* из зоны отчуждения Чернобыльской АЭС.

Работа была поддержана грантами РФФИ № 14-14-00666 (*P. sylvestris*), РФФИ № 20-74-10004 (*A. thaliana*), РФФИ № 18-34-20012 (*C. bursa-pastoris*).

**Зависимость действия мелатонина на уровень фотосинтетических пигментов
у проростков *Lychnis chalconica* L. от спектрального состава света**

Бойко Е.В., Головацкая И.Ф., Нечаева М.В.

Национальный исследовательский Томский государственный университет пр. Ленина, 36, Томск, Россия.
CaterinaSoloveva@gmail.com

На сегодняшний день имеются единичные исследования, демонстрирующие зависимость биосинтеза мелатонина у *Glycyrrhiza uralensis* от селективного света и взаимодействие мелатонина и селективного света при регуляции биомассы и вторичных метаболитов у каллусной культуры *Fagonia indica*. Ранее нами было показано светозависимое действие мелатонина на формирование проростков *A. thaliana* на синем (СС) и красном свете (КС). В связи с этим предположили взаимодействие селективного света и мелатонина в регуляции других процессов. Среди важнейших светозависимых процессов можно выделить синтез и поддержание уровня фотосинтетических пигментов. Целью данного исследования стало изучить действие мелатонина на содержание фотосинтетических пигментов (хлорофилла *a* – Хл *a*, хлорофилла *b* – Хл *b*, каротиноидов – Карот) в семядолях 7-дневных проростков *Lychnis chalconica* L. на КС и СС. Культивирование проростков осуществляли на 50 % питательной среде Мурасиге–Скуга. Обработку мелатонином корней производили на 5-ые сутки в концентрациях 0.1 пМ и 1 мкМ, длительность обработки составила 2-е суток, интенсивность освещения была 150–170 мкмоль фотонов/м²с.

В результате проведенного исследования было установлено, что на СС формировалась большая поверхность семядолей, чем на КС. Двухдневная обработка проростков экзогенным мелатонином способствовала неоднозначному изменению размеров семядолей в условиях разного спектрального состава света. При выращивании растений на КС отмечалось небольшое торможение (12%) роста семядолей при действии низкой концентрации мелатонина. В то время как на СС с увеличением концентрации индоламина в среде происходило увеличение площади семядолей на 12 и 52% соответственно для 0.1 пМ и 1 мкМ по сравнению с контролем. Одновременное исследование сформированности фотосинтетического аппарата семядолей показало, что содержание зеленых и желтых хлоропластных пигментов в семядолях лихниса зависит от селективного света. Так на СС количество Хл *a* и Карот было выше, чем на КС. Внесение мелатонина в среду изменяло содержание пигментов фотосинтеза. На КС отмечали значительное увеличение в 1.5–2 раза всех групп фотосинтетических пигментов под действием исследуемых концентраций мелатонина. Наибольший стимулирующий эффект отмечен для мелатонина в концентрации 1 мкМ. На СС установлен противоположный эффект, так уровень Хл *a* снижался на 30–35%, а содержание Хл *b* на 20–40% для 0.1 и 1 мкМ мелатонина соответственно. Уровень Карот увеличивался на 70 % при действии 0.1 пМ мелатонина, но снижался на 17% при 1 мкМ. Полученные данные свидетельствуют о возможном взаимодействии мелатонина и селективного света в регуляции роста и стабилизации фотосинтетического аппарата семядолей на ранних этапах онтогенеза проростков *Lychnis chalconica*. Вероятно, подобный эффект, который мы видим на КС, связан с участием фитохромов в регуляции уровня мелатонина. Объяснением снижения уровня фотосинтетических пигментов на СС может служить увеличение размеров площади семядолей или их светочувствительности, индуцированное экзогенным мелатонином.

Защитное действие оксида азота на рост и гормональный статус растений пшеницы в условиях засухи

Аллагулова Ч.Р., Авальбаев А.М., Федорова К.А., Масленникова Д.Р., Шакирова Ф.М.

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, г. Уфа, Россия.
allagulova-chulpan@rambler.ru

К числу наиболее распространенных стрессовых факторов, затрагивающих все звенья метаболизма растений, относится засуха. При этом наблюдается усиление интенсивности транспирации и дыхания, снижение фотосинтетической активности и водоудерживающей способности тканей, что приводит к существенному торможению роста и снижению продуктивности растений. Для предотвращения потерь урожая традиционно используются агрохимикаты, представляющие серьезную угрозу для человека и окружающей среды. Альтернативным подходом может стать применение природных регуляторов роста, среди которых все большее внимание привлекает оксид азота (NO). NO является газообразной сигнальной молекулой, вовлекаемой в регуляцию таких базовых физиологических процессов, как клеточный цикл, дифференциация тканей, морфогенез, прорастание семян, корнеобразование, цветение и созревание плодов. Установлено его значение в регуляции защитных реакций растений к стрессовым факторам различного происхождения. Ранее нами было показано, что проращивание семян пшеницы в присутствии донора NO нитропруссид натрия (SNP – sodium nitroprusside) в концентрации 200 мкМ способствует повышению устойчивости растений пшеницы к действию натрий-хлоридного засоления. Данная работа посвящена выявлению защитного эффекта 200 мкМ SNP на интенсивность ростовых процессов и гормональный статус растений пшеницы, подвергнутых действию засухи, моделируемой 12%-ым полиэтиленгликолем (ПЭГ). Работу проводили на 3-4-суточных проростках мягкой пшеницы *Triticum aestivum L.* сорта Салават Юлаев. Обработку донором NO осуществляли проращиванием семян в течение 3-х суток в присутствии 200 мкМ SNP. В результате проведенных экспериментов было выявлено значительное усиление интенсивности ростовых процессов в растениях пшеницы под влиянием обработки 200 мкМ SNP, о чем судили по энергии прорастания семян, линейным размерам проростков (длина корней и побегов), их сырой и сухой массе. Эти результаты подтверждают полученные нами ранее данные о способности SNP в концентрации 200 мкМ проявлять свойства стимулятора роста растений пшеницы. Засуха, моделируемая присутствием 12%-го ПЭГ в течение 24 ч в среде инкубирования 3-х суточных проростков вызвала существенное снижение показателей линейных размеров, их сырой и сухой массы. Присутствие SNP в среде прорастания проростков способствовало предотвращению индуцируемого засухой торможения ростовых процессов, что отразилось в поддержании линейных размеров и значений сырой и сухой массы на уровне контроля. В стрессовых условиях растения испытывают окислительный стресс, возникающий вследствие избыточной генерации АФК, способных вызывать повреждения мембранных структур. Основываясь на сведениях о способности NO оказывать влияние на состояние антиоксидантной системы растений, можно было ожидать, что SNP в концентрации 200 мкМ будет способствовать развитию в проростках антиоксидантной защиты и нейтрализации стресс-индуцируемой продукции АФК. Это должно найти отражение в уменьшении повреждающего действия засухи на целостность мембран. Проращивание проростков пшеницы в присутствии 200 мкМ SNP способствовало снижению негативного действия моделируемой ПЭГ засухи на целостность мембранных структур, о чем свидетельствуют данные об уменьшении уровня стресс-индуцированного экзоосмоса электролитов и накопления МДА. Проявление рост-стимулирующего и защитного эффектов SNP на растения пшеницы можно объяснить его влиянием на состояние гормональной системы, поскольку именно ей отводится ключевая роль в регуляции роста и развития растений. Поэтому важно было исследовать характер влияния обработки SNP на гормональный статус растений пшеницы в норме и в условиях моделируемой ПЭГ засухи. Выявлено, что 5-часовая обработка 3-сут проростков 200 мкМ SNP в нормальных условиях произрастания вызвала, на фоне отсутствия существенных изменений в содержании ИУК и некотором повышении уровня АБК, почти 2-кратное увеличение концентрации цитокининов уже к первому часу воздействия SNP, при этом повышенный вдвое уровень содержания цитокининов поддерживался в ходе всего опыта. Засуха вызвала в проростках существенное накопление АБК, снижение содержания ИУК и особенно цитокининов, тогда как SNP-предобработанные и подвергнутые стрессу растения характеризовались снижением уровня стресс-индуцированного накопления АБК, уменьшением падения содержания ИУК, а также поддержанием концентрации цитокининов на уровне контрольных растений. Эти данные подтверждают важную роль эндогенных цитокининов в реализации рост-стимулирующего и защитного эффектов SNP в растениях пшеницы. Таким образом, совокупность полученных результатов позволяет заключить, что SNP в оптимальной в стимуляции роста концентрации 200 мкМ характеризуется ярко выраженным защитным эффектом на растения пшеницы, подвергнутых засухе. Предобработка растений пшеницы донором NO существенно снизила уровень негативного действия дефицита влаги на показатели роста и способствовала поддержанию целостности мембранных структур. Важный вклад в реализацию рост-стимулирующего и защитного действия NO может вносить его способность оказывать влияние на состояние гормональной системы растений пшеницы, связанной с увеличением концентрации цитокининов в норме и с предотвращением их падения в условиях стресса.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 20-04-00904а).

Изменение протеома бактерий *Rhizobium leguminosarum* под влиянием экзогенных конечных продуктов глубокого гликирования

Шумилина Ю.С.* , Династия Е.М.* ,* , Иллинз К.**** , Царев А.А.* ** , Кузнецова А.В.* , Соболева А.В.* ** ,
Леонова Л.Е.* , Гришина Т.В.* , Васко Видал А.* ** , Зинц А.**** , Вестерманн Б.* ** , Фролов А.А.* ****

* Санкт-Петербургский государственный университет, Кафедра Биохимии, Санкт-Петербург, Россия.

** Институт биохимии растений им. Лейбница, Кафедра Биоорганической Химии, Халле, Германия.

*** Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения
Российской академии наук, Екатеринбург, Россия.

**** Университет Мартина Лютера Галле-Виттенберг, Халле, Германия.

schumilina.u@yandex.ru

Бобовые растения – один из главных источников белка в рационе человека. Урожайность бобовых растений зависит от многих факторов, однако ключевую роль играет успешность образования бобово-ризобияльного симбиоза. В тоже время, известно, что под действием абиотического стресса происходит накопление конечных продуктов глубокого гликирования (КПГГ) в растительных тканях. Не смотря на то, что в организме млекопитающих КПГГ проявляют выраженные про-воспалительные и про-атеросклеротические свойства, их эффекты на бактериальную и растительную клетку остаются в значительной степени неизвестными. Недавно полученные данные позволяют предположить участие процесса глубокого гликирования в формировании и онтогенезе клубеньков корней бобовых растений. Поэтому, с целью выявления механизмов, лежащих в основе этого, в данной работе были изучены эффекты экзогенных КПГГ (на уровне дериватов свободных аминокислот и пептидов) на изменение протеома бактерий *Rhizobium leguminosarum*.

На первом этапе исследования были проведены тесты на цитотоксичность КПГГ в отношении ризобий в концентрациях от 1 до 500 мкмоль/л. Полученные результаты показали, что все выбранные для исследования КПГГ оказались нетоксичными для ризобияльных бактерий. Кроме того, было обнаружено, что добавление 25 мкмоль/л КПГГ способствовало повышению интенсивности роста бактериальной культуры в течение первых 5 часов. Параллельно, нами было установлено, что вероятно, этот эффект связан с вхождением продуктов гликирования в клетки, поскольку меченые флуоресцентной меткой КПГГ способны эффективно проникать в бактериальные клетки.

Для выявления сопутствующих изменений в протеоме бактерий, ризобии были проинкубированы с 25 мкмоль/л КПГГ в течение 0, 5 и 18 часов. Данные временные интервалы соответствовали различным фазам роста бактериальной культуры: лаг-фаза (5 ч), линейная (18 ч) и логарифмическая фазы (0 ч). Затем при помощи метода фенольной экстракции была выделена фракция тотального белка, измерена его концентрация и проведен его ограниченный протеолиз трипсином. Полученные триптические гидролизаты были исследованы при помощи нано-ESI-LIT-Orbitrap-MS (DDA). Результаты были проанализированы с помощью программного обеспечения ProteomeDiscoverer 2.1, Progenesis Q1, STRING. Сравнение протеомов ризобий, инкубированных в присутствии и отсутствии КПГГ, выявило снижение относительного содержания белков, участвующих в транскрипции, трансляции и энергетическом метаболизме в экспериментальных образцах. Кроме того, было установлено, что добавление КПГГ приводило к ускорению перехода ризобияльной культуры к линейной фазе роста, что свидетельствует о том, что КПГГ могут являться сигнальными молекулами для ризобий.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№18-016-00190).

Изменение размера светособирающей антенны ФС II – универсальный адаптационный механизм высших растений

Ветошкина Д.В., Найдов И.А., Журикова Е.М., Руденко Н.Н., Игнатова Л.К., Федорчук Т.П., Позднякова-Филатова И.Ю., Фролова А.А., Иванов Б.Н., Борисова-Мубаракшина М.М.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Федеральный исследовательский центр "Пушкинский научный центр биологических исследований российской академии наук", ул. Институтская, 2, Пушкино, Россия.
vetoshkina_d@mail.ru

Высшие растения вследствие неподвижного образа жизни постоянно сталкиваются с изменениями в условиях окружающей среды, что привело к формированию большого количества адаптационных механизмов. При увеличении освещенности, помимо изменений в морфологических показателях растений, происходят изменения, реализующиеся на уровне фотосинтетического аппарата, такие как расхождение хлоропластов к периферии клетки, изменение соотношения фотосистем, а также уменьшение количества светособирающих комплексов фотосистемы II (ФС II), что приводит к изменению количества поглощаемой энергии света и, следовательно, к защите фотосинтетического аппарата от фотоингибирования.

В ходе данной работы нами было исследовано влияние колонизации растений непатогенными ризосферными бактериями *Pseudomonas putida* BS3701, а также влияние условий засухи и засоления почвы на изменение размера антенны ФС II растений ячменя обыкновенного (*Hordeum vulgare*). При действии всех выбранных условий в течение 10–14 дней не было обнаружено изменений в значениях показателя жизнеспособности (Pi) и максимального квантового выхода (Fv/Fm) ФС II по сравнению с контрольными растениями. В то же время были обнаружены различия в строении фотосинтетического аппарата контрольных растений и растений, колонизированных *P. putida* BS3701. Колонизированные растения имели достоверно больший размер светособирающей антенны ФС II, чем контрольные растения, что было подтверждено увеличением количества белков светособирающих комплексов, а также увеличением уровня экспрессии генов, кодирующих эти белки. Через 10–14 дней от начала действия условий засухи и засоления почвы также наблюдались изменения в функционировании фотосинтетического аппарата растений, которые, напротив, привели к уменьшению размера светособирающей антенны ФС II, что было подтверждено снижением содержания белков антенны ФС II и снижением уровня экспрессии генов этих белков. В условиях засухи и засоления почвы содержание пероксида водорода в листьях было выше, а при колонизации растений *P. putida* BS3701 содержание пероксида оказывалось ниже по сравнению с контрольными растениями. Полученные данные коррелирует с данными работы (Borisova-Mubarakshina et al., 2015), где была показана обратная корреляция между содержанием пероксида водорода и размером антенны ФС II при изменении освещенности.

Проведенное исследование позволяет предположить, что изменение размера светособирающей антенны ФС II является универсальным адаптационным механизмом к действию абиотических и биотических факторов.

Borisova-Mubarakshina MM, Ivanov BN, Vetoshkina DV, Lubimov VY, Fedorchuk TP, Naydov IA, Kozuleva MA, Rudenko NN, Dall'Osto L, Cazzaniga S, Bassi R (2015) Long-term acclimatory response to excess excitation energy: evidence for a role of hydrogen peroxide in the regulation of photosystem II antenna size. *Journal of Experimental Botany* 66, 7151–7164. doi:10.1093/jxb/erv410.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда грант №17-14-01371.

Изменение содержания фитогормонов в растениях после аварии на Фукусимской и Чернобыльской АЭС

Битаршвили С.В., Гераськин С.А., Волкова П.Ю.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии, Обнинск, Россия.
bitarishvili.s@gmail.com

Загрязнение биосферы долгоживущими радионуклидами вследствие мирной и военной деятельности человека привели к тому, что в середине прошлого столетия радиационное загрязнение приобрело значение экологического фактора. Крупнейшие радиационные аварии на Чернобыльской и Фукусимской АЭС стали причиной загрязнения значительных территорий. Природные популяции растений, произрастающие на этих территориях, подвергаются хроническому стрессу и вынуждены адаптироваться к повышенным уровням радиации.

Важнейшую роль в процессах адаптации растений играют фитогормоны, которые регулируют течение биохимических реакций и реализацию физиологических программ, обеспечивая выживание и поддержание гомеостаза в неблагоприятных условиях.

В рамках данной работы был исследован фитогормональный статус японской красной сосны (*Pinus densiflora* Siebold et Zucc.), произрастающей на территориях, загрязненных в результате аварии на АЭС Фукусима. Сосна обладает высокой радиочувствительностью и входит в число референтных видов для оценки последствий облучения природных экосистем. В исследовании оценивали содержание основных классов фитогормонов: индолилуксусная кислота (ИУК), индолилмасляная кислота (ИМК), зеатин, гиббереллин и абсцизовая кислота (АБК) в хвое. На территории префектуры Фукусима (Япония) с 5-ти участков (1 контрольный и 4 участка с разными уровнями радиационного загрязнения) отобрали хвою второго года с 20-30 деревьев и лиофилизировали.

В 30-км зоне Чернобыльской АЭС было исследовано содержание АБК в травянистых растениях, принадлежащих к четырем семействам, с различной радиочувствительностью: пастушья сумка обыкновенная (*Capsella bursa-pastoris*) (ЛД₅₀ ~ 600 Гр); клевер ползучий (*Trifolium repens*) (ЛД₅₀ ~ 250 Гр); ежа сборная (*Dactylis glomerata*) (ЛД₅₀ ~ 30 Гр); водосбор обыкновенный (*Aquilegia vulgaris*) (ЛД₅₀ ~ 25 Гр). С 3-х экспериментальных и 2-х контрольных участков, находящихся на территории Полесского радиационно-экологического заповедника (Гомельская область, Республика Беларусь) отбирали листья исследуемых растений и замораживали в жидком азоте до экстракции.

Пробоотбор образцов сосны и травянистых растений был выполнен в июне 2019 года.

Качественный и количественный анализ фитогормонов осуществлялся методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Shimadzu LC-30 Nexera (Япония) с диодно-матричным детектором SPD-M20A (Shimadzu). Для разделения смеси веществ использовали аналитическую колонку с обращенной фазой C18 (Shim-pack XR-ODSII, 2 мкм, диаметр 3.0 мм, длина 100 мм, Shimadzu). Для пробоподготовки образцов использовали твердофазную экстракцию (неудерживающую) на приборе VacMaster-20 (Biotage, Норвегия) с использованием SPE колонок Biotage – ISOLUTE C18 (1 мл). Анализ проводили в трех повторностях, каждую повторность анализировали дважды для устранения инструментальных ошибок. Экспериментальные данные анализировали, используя непараметрическую статистику. Значимость отличий оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни.

В хронически облучаемых популяциях сосны обнаружен статистически значимый рост содержания основного ауксина растений ИУК, причем рост был сопряжен с мощностью дозы на участках ($r = 0.97$; $p=0.01$). Содержание другого ауксина ИМК значимо не изменялось. Выявлено увеличение содержания зеатина на 3-х самых загрязненных участках и снижение уровней ГК на этих же участках. Концентрации стрессового гормона АБК в хронически облучаемых популяциях сосны было увеличено на некоторых участках. Обнаружена корреляция между содержанием АБК и зеатина ($r=0.98$, $p=0.004$).

В 30-км зоне Чернобыльской АЭС обнаружено статистически значимое увеличение содержания АБК в растениях пастушьей сумки, клевера и ежи на всех исследованных загрязненных участках по сравнению с одним контрольным участком. При сравнении со вторым контролем значимые отличия обнаружены лишь на некоторых участках у наиболее радиочувствительных видов. Содержание АБК в растениях пастушьей сумки зависели от показателей плотности потока α - и β -частиц на участках ($r = 0.66$, $p<0.05$; $r = 0.70$, $p<0.05$ соответственно).

Выявленные изменения содержания фитогормонов у японской красной сосны и травянистых растений, произрастающих на радиоактивно загрязненных территориях в результате аварий на Фукусимской и Чернобыльской АЭС, вносят вклад в понимание механизмов адаптации исследуемых популяций к хроническому радиационному воздействию.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-54-50003; № 18-34-20012).

Изменение сценариев ксилогенеза у древесных растений: роль CLE-пептидов группы В и их рецепторов TDR

Галибина Н.А., Мощенская Ю.Л., Тарелкина Т.В., Новицкая Л.Л., Никерова К.М.

Институт леса – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Пушкинская ул., 11, Петрозаводск, Россия.

galibina@krc.karelia.ru

Формирование ксилемы, представляющей собой важный возобновляемый источник органического углерода, происходит в результате деятельности латеральной меристемы – камбия. Среди молекулярно-генетических механизмов, регулирующих его деятельность, первостепенное место отводится системе CLE-пептидов группы В (TDIF) их рецепторов (TDR), кодируемой генами *CLE41* и *PXY*. Поиск путей эффективного управления ксилогенезом актуален как с точки зрения повышения продуктивности древесных растений, так и получения древесины с заданными свойствами. Нами обнаружено, что эктопическая экспрессия *CLE41* в ксилеме приводит к нарушению ориентации клеточных делений камбиальных производных, что проявляется у карельской березы в изменении сценария ксилогенеза. Камбий – гетеротрофная ткань. Его деятельность осуществляется за счет притока из фотосинтезирующих листьев сахарозы, выполняющей помимо энергетической еще и сигнальную функцию. Экспериментально увеличивая содержание сахарозы в тканях ствола березы повислой, мы показали возможность изменять экспрессию генов *CLE41* и *PXY*. В связи с этим на разных стадиях камбиального роста изучено изменение экспрессии генов *CLE/PXY* с точки зрения возможных мишеней для основной транспортной формы сахаров – сахарозы.

Объектами исследования были две формы березы повислой: обычная береза повислая (*B. pendula* var. *pendula*), у которой формируется типичная для вида прямослойная древесина, и карельская береза (*B. pendula* var. *carelica*), а также деревья обычной березы повислой, у которых изменение программы дифференцировки производных камбия индуцировано путем искусственного повышения уровня фотоассимилятов (сахарозы).

Поиск генов, кодирующих *CLE41* и *PXY*, проводили в геноме березы повислой, опубликованном на портале CoGe. Предсказание структуры белков березы повислой выполняли с использованием ресурса National Center for Biotechnology Information (NCBI), предсказание физических свойств – с помощью ресурса Expert Protein Analysis System (ExPASy). Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA 7. Множественное выравнивание последовательностей осуществляли с помощью ClustalW. Филогенетическое дерево было построено с использованием метода присоединения ближайшего соседа (Neighbor-Joining method) с 1000 повторами bootstrap. Определение процента идентичности/сходства последовательностей выполнено в EMBOSS Needle. Выявлено две последовательности (Brev01.c0443.g0012 и Brev01.c0016.g0065), кодирующих додекапептид TDIF, и одна (Brev01.c0668.g0016.1), кодирующая ближайший гомолог PXY, гомологичных белкам *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa* и *Picea abies*. Специфические праймеры (Синтол, Россия) для амплификации участков исследуемых генов конструировали с помощью программного обеспечения Beacon Designer 8.21 (PREMIER Biosoft). В качестве референсных генов для нормализации данных количественной ПЦР использовали гены *Ef1a*, *GAPDH*. В период камбиального роста исследовали следующие фазы: (1) начало формирования прироста ксилемы; (2) активное формирование ранней тонкостенной древесины; (3) активизация утолщения клеточной стенки. Полученные результаты рассматриваются с точки зрения изменения донорно-акцепторных отношений в системе: «лист – флоэма – ксилема».

Разные сценарии ксилогенеза включали формирование (1) узорчатой древесины в местах аномалий у карельской березы; (2) безузорчатой древесины у карельской березы с увеличенным количеством клеток лучевой паренхимы. В качестве контроля (калибратора) служили растения, у которых формируется прямослойная (типичная для вида) древесина. В период наивысшей активности камбия клеточные деления происходят так часто, что при образовании новых клеток сформированные перед этим клетки сохраняют меристематические свойства. В узорчатых участках в местах локальных углублений ширина зоны активно делящихся клеток камбия, несмотря на преобладание актиклинальных и поперечных делений, не уменьшается. На данном участке резко возрастает темп образования клеток флоэмы. Углубления камбиального цилиндра состоят преимущественно из лучевых клеток и в сторону флоэмы на этих участках откладываются главным образом элементы паренхимы. Показано, что изменение в уровне экспрессии *CLE41* и *PXY* начинается в зоне лучевых инициалей камбия и лучевой паренхимы, высказана гипотеза о сахарозе, как возможной сигнальной молекуле для запуска экспрессии генов *CLE41/44* и *PXY*.

In silico анализ регуляторных *cis*-элементов, присутствующих в 2 Кб промоторной области, позволил выявить ряд мотивов, участвующих в регуляции экспрессии генов интереса. Представленные результаты могут быть использованы для выявления транскрипционных факторов, участвующих в регуляции альтернативных сценариев ксилогенеза.

Исследование выполнено за счет средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (ИЛ КарНЦ РАН) и РФФИ 19-04-00622_а.

Изменение физиологических показателей *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid. при воздействии поверхностно-активными веществами

Алексеева С.И., Охлопкова Ж.М.

Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова. Белинского ул., 58, Якутск, Россия.
alekseeva.sargy@mail.ru

Количество загрязняющих веществ, поступающих в окружающую среду в результате техногенеза, в ряде случаев значительно превосходит уровень их естественного поступления. Включаясь в природные циклы миграции антропогенные потоки приводят к быстрому распространению загрязняющих веществ в естественные водоемы. Одним из видов крупномасштабного загрязнения водных и наземных экосистем является загрязнение поверхностно-активными веществами (ПАВ). Особый интерес представляет изучение эффектов тех смесей веществ, в составе которых большинство ПАВ попадают в окружающую среду. Одно из важных значений занимают синтетические моющие средства (СМС), которые содержатся в сточных и загрязненных водах, сбрасываемых практически всеми промышленными предприятиями, поступают вместе с хозяйственно-бытовыми и городскими сточными водами в естественные водоемы.

В данной работе в качестве объекта выбрано водное растение *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid. Образцы растений были собраны из естественных водоемов на территории г. Якутска и культивированы в условиях лаборатории в ¼ питательной среды Гельригеля. В качестве исследуемых показателей вели учёт динамики роста и развития листецов-почек на каждом растении. Контрольные линии *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid. выращивались в ¼ питательной среды Гельригеля, опытные линии выращивались в ¼ питательной среды Гельригеля с добавлением 0,1-0,5 мг/л СМС (марка АСЕ, <5% по хлоросодержащим отбеливателям). Продолжительность культивирования контрольных и опытных линий составила 21 сутки. С помощью спектрофотометрического метода было исследовано содержание хлорофилла а и b в ацетоновых экстрактах опытных и контрольных линий культивированных рясок (при 663 и 646 нм, соответственно).

В образцах *Spirodela polyrhiza* опытной линии при воздействии СМС в 0,1 мг/л количество хлорофилла а снизилось в среднем на 26%, хлорофилла b – на 29%. При воздействии 0,5 мг/л СМС в растениях наблюдалось снижение количества хлорофилла а и b до 62-80%. Таким образом, выявлено изменение динамики роста и развития листецов растений *Spirodela polyrhiza* в опытных линиях, а также снижение в них содержания хлорофилла а и b.

Изменения водного статуса и листовой поверхности сои *Glycine max* L. Merr. при водно-солевом стрессе

Глазунов Г.П.* , Харчук О.А.** , Баитовая С.И.**

* Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. Ленинские горы, 1, Москва, Россия.

** Институт генетики, физиологии и защиты растений, ул. Лесная 20, Кишинев, Республика Молдова.
glazng@mail.ru* , kharchuk.biology@mail.ru**

Для территории Республики Молдова в летний период характерны засухи. Практически каждая из физиологических реакций растений зависит от влагообеспеченности, при этом изменение водного статуса растений влияет на рост и ассимиляцию CO₂. Хотя в филогенетическом аспекте растения сои относительно гидростабильны, однако могут различаться по способности регулировать транспирацию и водный баланс в течение дня и вегетационного периода на основе более изогидрического или более анизогидрического поведения. Устойчивость к засухе обеспечивается у разных видов растений с помощью двух стратегий адаптации: 1 – сохранение гидратации тканей путем закрытия устьиц и 2 – частичная потеря тургора и продолжающаяся ассимиляция CO₂. При этом даже сорта одного и того же вида могут иметь различные характеристики. Роль типа регуляции водного статуса в проявлении устойчивости растений изучена недостаточно. Согласно Allen и др. (1994), растения сои при выращивании в сосудах проявляют анизогидрический характер. В настоящей работе была поставлена задача определить действие осмотического стресса (при повышенном содержании сульфата в почве) на реакции водного статуса, роста и развития, связанные с комплексной устойчивостью растений сои к повторному стрессу.

Исследования проводили в 2016-2019 гг. в условиях вегетационного комплекса. Объектами исследования были растения сои *Glycine max* L. (Merr), районированных в Республике Молдова сортов, Аура и Амелина. Растения сои выращивали в сосудах объемом 10 л, в которых создавали условия водно-солевого стресса на фоне повторной засухи: на репродуктивных стадиях онтогенеза сои, в классификации стадий онтогенеза по Fehr, Caviness (1977): R1-R2, цветение и R4-R5, наполнение семян. Для моделирования сульфатного засоления при набивке сосудов почвой в каждый сосуд вносили по 40 г сульфата натрия. В каждом из периодов недостаточной влагообеспеченности засуху создавали прекращением поливов на 7 дней, степень водного дефицита контролировали по величине относительного содержания воды в листьях (Turner, 1981).

В фазах R1-R2 при действии водно-солевого стресса существенно снижалось содержание воды в листьях растений: особенно у сорта Аура, при меньшем снижении у сорта Амелина. В фазе R4 (повторная засуха) реакции исследуемых растений на засоление и комплексный стресс существенно отличались – растения сои сорта Аура реагировали существенным снижением относительного содержания воды в листьях, в то время как у растений сорта Амелина наблюдали меньшее снижение, особенно после повторной засухи. Растения сои сорта Амелина по сравнению с сортом Аура характеризуются большей водоудерживающей способностью листьев при действии стресса.

Согласно полученным данным, существует разница в реакции листовой поверхности растений исследуемых сортов на осмотический водно-солевой стресс. В ранней фазе осмотический стресс тормозит рост листовой поверхности растений, особенно у сорта Аура, но в процессе репарации после первой засухи у этого сорта листовая поверхность восстанавливается практически до уровня контрольных (постоянная влагообеспеченность 70% от полной влагоемкости) растений. У растений сои сорт Амелина в вегетативный период развития растений величина листовой поверхности больше по сравнению с сортом Аура, но в репарационный период между двумя засухами на фоне комплексного стресса листовая поверхность не восстанавливается до уровня контрольных растений.

В целом, изменения водоудерживающей способности листьев, относительного содержания воды в листьях, листовой поверхности растений двух сортов сои при осмотическом водно-солевом стрессе свидетельствуют о более изогидрическом характере регуляции водного статуса у сорта Амелина и более анизогидрическом – у сорта Аура.

Изменения функционирования липоксигеназного каскада при типичных и латентных инфекциях, вызванных *Pectobacterium atrosepticum*

Топоркова Я.Ю., Смирнова Е.О., Церс И.Д., Огородникова А.В., Парфурова О.И., Петрова О.Е., Горшков В.Ю.

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Федеральный исследовательский центр "Казанский научный центр Российской академии наук", Лобачевского 2/31, Казань, Россия
yanchens@yandex.ru

Окисление полиненасыщенных жирных кислот является источником важнейших соединений – оксипинов, играющих важную роль в регуляторных процессах, а также ответных реакциях на изменение условий окружающей среды. Основным источником оксипинов у растений является липоксигеназный каскад, первую реакцию в котором катализируют липоксигеназы (ЛОГ). При участии ЛОГ происходит образование гидроперекисей ПНЖК. Дальнейший метаболизм гидроперекисей жирных кислот протекает неферментативно либо контролируется рядом ферментов, в том числе представителями семейства CYP74, неклассическими цитохромами P450, к которым в настоящее время относятся алленоксидсинтазы (АОС), гидропероксидлиазы (ГПЛ), дивинилэфирсинтазы (ДЭС) и эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС). Кроме того, выявлены ферменты с двойной или тройной активностью.

Для цветковых растений характерны следующие оксипины – продукты липоксигеназного каскада: гидрокси-, дигидрокси-, тригидрокси-, оксо-, эпокси- или кето-производные жирных кислот, дивиниловые эфиры, альдегиды, спирты, альдокислоты, циклопентеноны и жасмонаты. Физиологические свойства оксипинов растений изучены крайне односторонне, с неоправданно большим вниманием к жасмонатам, травматину и летучим соединениям и недостатком внимания к другим оксипинам.

Типичные (симптоматические) инфекции растений, вызываемые *Pectobacterium atrosepticum*, связаны с индукцией ответов растений, опосредованных жасмонатами. В настоящей работе мы сравнили функционирование липоксигеназного каскада при типичных и латентных (бессимптомных) инфекциях, чтобы лучше понять физиологические основы мирного и антагонистического сосуществования растений и пектобактерий.

Недавно в лаборатории молекулярной биологии КИББ ФИЦ КазНЦ РАН было показано, что и типичная, и латентная инфекция растений табака, вызванная *Pectobacterium atrosepticum*, сопровождается активацией генов, кодирующих ЛОГ, АОС и ДЭС, однако в разной степени. Настоящая работа посвящена характеристике изменения активности ферментов липоксигеназного каскада и уровня соответствующих оксипинов при типичной и латентной инфекциях. Анализ экспрессии генов, активности соответствующих ферментов и относительного количества различных оксипинов позволил идентифицировать различия, связанные с липоксигеназным каскадом, при типичных и латентных инфекциях, вызванных *P. atrosepticum*. Кроме того, мы провели реаннотацию некоторых ферментов CYP74 в растениях табака и идентифицировали ген, который кодирует 9/13-специфичную ГПЛ с дополнительной эпоксиалкогольсинтазной активностью. Наши результаты вносят вклад в гипотезу о том, что различные типы взаимодействия растения с конкретным патогеном характеризуются разными профилями оксипинов растения-хозяина.

Работа поддержана Российским научным фондом: изучение изменений биосинтез оксипинов – продуктов ферментов CYP74 суперсемейства P450 – поддержаны грантом № 20-14-00338; изучение изменений биосинтез оксипинов – продуктов липоксигеназ – поддержаны грантом № 21-14-00397. Биоинформационные исследования выполнены в рамках государственного задания ФИЦ Казанского научного центра РАН.

Изучение светозависимых процессов в растениях горчицы сарептской *Brassica juncea* (L.) Coss. в условиях комбинаторной светокультуры

Тараканов И.Г. , Ломакин М.П.* , Шмарев А.Н.** , Слепцов Н.Н.* , Литвинский В.А.*** , Ивлев А.А.**

* Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева, ул. Тимирязевская, 49, Москва, Россия.

** Институт фундаментальных проблем биологии РАН, ул. Институтская, 2, Пушкино, Россия.

*** Всероссийский научно-исследовательский институт агрохимии им. Д.Н. Прянишникова, ул. Прянишникова, 31а, Москва, Россия.
ivatar@yandex.ru

Для исследования действия различных областей спектра оптического излучения на растения используют разнообразные экспериментальные подходы. Схема эксперимента может основываться на исследовании эффектов квазимонохроматического облучения. Кроме того, могут быть исследованы реакции растений на отсутствие определенных спектральных диапазонов в различных областях спектра ФАР. В наших исследованиях с горчицей сарептской, *Brassica juncea* (L.) Coss., мы использовали оба подхода. Растения выращивали в факторостатных условиях на специализированной установке «Люмитест», позволяющей изменять интенсивность различных участков спектра ФАР. В световом блоке использованы узкополосные светодиоды (СД) 460 нм (синий), 640 нм (коротковолновой красный), 660 нм (красный), 730 нм (дальний красный) свет. Поканальное регулирование плотности потока фотонов позволяет задавать различные варианты соотношения отдельных спектральных диапазонов в общем уровне облученности. Были изучены реакции растений на условия выращивания при разных световых режимах. Контрольный вариант включал все 4 типа светодиодов в соответствии со спектром действия фотосинтеза. В каждом из остальных режимов один из спектральных диапазонов был исключен для уточнения его роли в морфогенетической регуляции и продукционном процессе. Кроме того, были изучены реакции растений на квазимонохроматический красный и синий свет. Наиболее быстрое развитие растений и ранний переход к цветению наблюдали в контроле и в варианте «- 660 нм»; отсутствие в спектре оптического излучения полосы 730 нм, а также выращивание на монохроматическом синем и особенно красном свете (660 нм) существенно задерживало переход растений к генеративному развитию. В ходе комплексных исследований была изучена зависимость различных функциональных процессов от наличия определенного спектрального диапазона в спектре оптического излучения. Представлены данные по фенотипированию растений, накоплению фотосинтетических пигментов, газообмену (определение интенсивности фотосинтеза, дыхания, транспирации, устьичной проводимости). Исследования изотопного состава углерода фотоассимилятов из донорных листьев и акцепторных органов включали определение водорастворимых и водонерастворимых фракций органических веществ с помощью масс-спектрометрического анализа. С использованием ранее разработанной осцилляционной модели фотосинтеза это позволило более точно охарактеризовать баланс процессов карбоксилирования и фотодыхания при различной напряженности донорно-акцепторных отношений у растений.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-16-00078.

Изучение сезонных особенностей переноса углерода в тканях лиственницы с помощью метода внесения ^{13}C метки в кроны взрослых деревьев в условиях многолетней мерзлоты

Масягина О.В. , Прокушкин А.С.* , Артюхов А.А.** , Ринне-Гармстон К.*** , Удалова Т.А.** , Кирдянов А.В.* ,
Сенченков С.А.** , Меняйло О.В.* , Шашкин А.В.* , Адамчик Б.*** , Зальштедт Э.*** ,
Танг Ю.*** , Метелева М.К.* , Рублев А.Н.*****

* Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН». Академгородок, 50/28, Красноярск, Россия.

** НИЦ «Курчатовский институт». Площадь Академика Курчатова, 1, Москва, Россия.

*** Институт природных ресурсов Финляндии (Luke), Латокартанонкаари, 9, Хельсинки, Финляндия.

**** НИЦ космической гидрометеорологии «Планета». Большой Предтеченский пер., 7, Москва, Россия.
oxanamas@ksc.krasn.ru

Сибирские лиственничные леса признаны одними из наиболее уязвимых биомов в контексте изменения климата. Несмотря на это, а также на их широкое географическое распространение и доминирование в криолитозоне, в настоящее время имеется крайне незначительный объем данных о вкладе лиственницы в процессы депонирования углерода (С) атмосферы на уровне биогеоценозов. Недостаточно изучены ее сезонная фотосинтетическая активность, влияние на неё факторов окружающей среды, а также распределение и транспорт фотоассимилятов на уровне дерева. Поэтому, целью исследования является изучение механизмов фиксации CO_2 из атмосферы и транспорта фотоассимилятов внутри взрослых деревьев лиственницы (*Larix gmelinii* Rupr. Rupr.), произрастающей на мерзлотных почвах, с помощью метода внесения импульсной метки стабильного изотопа ^{13}C . Данный подход наиболее полно и корректно оценивает включение CO_2 в фитомассу, транспорт и распределение новообразованных ассимилятов (сахара, крахмал, липиды и т.д.) в тканях древесных растений.

Эксперименты по внесению стабильного изотопа ^{13}C в кроны взрослых деревьев лиственницы проводили в 2013-2014 гг. на базе Эвенкийского ОЭП ИЛ СО РАН (64.29° с.ш., 100.20° в.д., 148 м н.у.м., п. Тура, Красноярский край). В исследуемом коренном лиственничном древостое выполнено геоботаническое описание и инвентаризация с полным перечетом деревьев и их маркировкой; проведены измерения диаметра на высоте груди (DBH), высоты деревьев (Н) и их жизненного состояния. В каждом эксперименте по внесению стабильного изотопа ^{13}C в августе 2013г. (конец вегетации), в июне 2014г. (начало вегетации) и июле 2014г. (середина вегетации) использовали по 3 дерева, наиболее удовлетворяющих средним значениям Н и DBH для всего древостоя. Каждое дерево герметично накрывали прозрачной ПЭ камерой объемом 7 м³. Метку $^{13}\text{CO}_2$ (с 30% содержанием ^{13}C , НИЦ «Курчатовский институт») вносили в дневное время (с 11:00 местного времени) при благоприятных для фотосинтеза условиях (высокая освещенность и отсутствие осадков). Воздух внутри камеры постоянно перемешивался при помощи вентиляторов, а размещенные внутри и снаружи камеры термодатчики позволяли фиксировать разность температур. Концентрацию CO_2 внутри камеры отслеживали при помощи ИК газоанализатора Walz GFS-3000. Общая продолжительность эксперимента варьировала от 3 до 5-ти часов в зависимости от скорости поглощения введенного $^{13}\text{CO}_2$. В ходе эксперимента $^{13}\text{CO}_2$ поглощался хвоей, для чего проводили 2-3 последовательных импульсных введения CO_2 – каждое после снижения его концентрации в камере до 1000 ppm, и далее фотоассимилированный ^{13}C распределялся по тканям растения. Образцы тканей (хвоя, брахибласты, веточки, ауксибласты, высечки ствола с разделением на флоэму и ксилему и корни разного диаметра) отбирали до внесения ^{13}C -метки, непосредственно после (через 3-5 часов) и затем на 1-й, 4-й, 8-й, 18-й, 28-й, 40-й, 60-й, 75-й, и 90-й день после внесения метки. Последний отбор образцов тканей производился после пожелтения хвои. Отбор образцов продолжался ежегодно до 2018г., но с меньшей периодичностью. Содержание $\delta^{13}\text{C}$ в образцах тканей определяли на автоматизированном приборе HeliView в НИЦ «Курчатовский институт» (Москва), элементном анализаторе-изотопном масс-спектрометре (EA-IRMS фирмы SerCon) в Институте природных ресурсов Финляндии (Luke) и изотопном масс-спектрометре Isoprime 100 (фирмы Isoprime), сопряженном с элементным анализатором Vario Isotope Cube (фирмы Elementar) в ИЛ СО РАН. Все устройства были интеркалиброваны путем анализа одних и тех же образцов, чтобы гарантировать одинаковую точность устройств. Кроме того, в течение нескольких сезонов проводился отбор хвои меченных деревьев для CSIA-анализа неструктурных сахаров (сахароза, глюкоза, фруктоза и сахароспирт пинитол). В этом же древостое 6 контрольных деревьев того же габитуса, что и меченные деревья, использовали для сезонной и суточной оценки фотосинтеза, сезонных наблюдений за морфометрией хвои и отбором образцов хвои на содержание С, N, ^{13}C (природное содержание), а также фотосинтетических пигментов для оценки их сезонной динамики.

Таким образом, эксперименты по внесению ^{13}C -метки в 2013–2014 гг. показали, что перенос С внутри дерева имеет свои сезонные особенности и тесно связан с фенологией хвои лиственницы, о чем свидетельствует зафиксированная различная скорость оттока метки из хвои в течение вегетации. Подтверждено, что в начале вегетации (начало июня) появляющийся в молодой хвое ^{13}C является результатом ремобилизации веществ, запасенных в прошлые годы. Примерно к середине вегетационного периода (начиная с конца июня) происходит переключение направленности метаболических процессов, а именно, ростовые процессы формирования листового аппарата и прочих структур сменяются процессами накопления запасных веществ в конце вегетации для обеспечения роста в следующем году.

Работа проведена при поддержке РФФИ (проекты № 13-04-00659, № 14-04-10069, 19-29-05122) и Академии Финляндии (грант мобильности № 322679).

Индукция устойчивости проростков пшеницы донором монооксида углерода, опосредованное активными формами кислорода

Шкляревский М.А. *, Колупаев Ю.Е. **, Карпец Ю.В. *, Швиденко Н.В. *, Луговая А.А. *

* Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, п/о Докучаевское-2, Харьков, Украина.

** Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина.
plant_biology.ukr.net

Монооксид углерода (СО) является одним из газотрансмиттеров в растительных и животных клетках. Как сигнальная молекула, взаимодействующая с другими посредниками и фитогормонами, он участвует в регуляции роста и развития растений (Santa-Cruz et al., 2010; Lin et al., 2014; Xie et al., 2014). В последние годы накапливаются сведения о его важной роли в процессах адаптации растений к действию стрессоров. В ряде работ показано повышение устойчивости растений к осмотическому (Liu et al., 2010) и солевому (Ling et al., 2009) стрессам, действию тяжелых металлов (Meng et al., 2011) под влиянием газообразного монооксида углерода и его доноров.

Однако роль СО в адаптации растений к стрессовым температурам исследована очень слабо. Есть сведения о повышении выживаемости культуры клеток табака при обработке донором СО гематином (Li, Gu, 2016) и увеличении эндогенного содержания СО в клетках в условиях гипертермии (Cheng et al., 2018). В то же время данные о влиянии доноров монооксида углерода на теплоустойчивость интактных растений отсутствуют.

Открытым остается и вопрос об участии других молекул-посредников в реализации стресс-протекторного действия СО на растительные объекты. В то же время показано, что вызываемый СО или его донорами эффект закрытия устьиц в бобов зависит от активных форм кислорода (АФК), генерируемых с участием НАДФН-оксидазы (She, Song, 2008). АФК образуются растительными клетками не только с помощью НАДФН-оксидазы, но и других ферментов, в частности, пероксидаз. Последние также могут быть задействованы в реализации эффектов монооксида углерода. Так, установлено, что стимуляция развития корней при действии СО подавлялась в присутствии ингибитора пероксидазы салицилгидроксамовой кислоты (Xuan et al., 2007).

В то же время участие АФК как сигнальных посредников в реализации стресс-протекторного действия доноров СО оставалось неизученным. В связи с этим целью работы было установление возможной роли АФК и антиоксидантной системы в реализации стресс-протекторного действия СО на проростки пшеницы при гипертермии. В качестве донора СО использовали гемин, который разлагается растительной гемоксигеназой с образованием монооксида углерода.

В работе использовали 4-суточные этиолированные проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Досконала, выращенные при температуре 18–20°C на очищенной водопроводной воде. Проростки обрабатывали геминном, а также различными ингибиторами (скавенджером СО гемоглобином, скавенджером пероксида водорода диметилтиомочевинной (ДМТМ), ингибитором пероксидазы азидом натрия, ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом) в сочетании с геминном. Время инкубации на исследуемых растворах – 24–26 ч. По его окончании проростки подвергали повреждающему прогреву в водяном ультратермостате при температуре 45.0°C в течение 10 мин.

Установлено, что обработка проростков геминном в диапазоне концентраций 0.5–10 мкМ вызвала повышение их выживания после повреждающего прогрева. Наибольший эффект проявлялся под влиянием 5 мкМ гемина. При обработке геминном отмечалось транзитное увеличение в корнях активности внеклеточной пероксидазы, небольшое усиление генерации супероксидного анион-радикала и существенное повышение содержания пероксида водорода (с максимумом через 1.5–2 ч после начала обработки). Эффект повышения содержания H_2O_2 не проявлялся в присутствии его скавенджера диметилтиомочевинной (ДМТМ), а также при обработке корней проростков поглотителем СО гемоглобином и ингибитором пероксидазы азидом натрия, но не ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом.

Через 24 ч после начала обработки геминном в корнях увеличивалась активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы, каталазы и внутриклеточной пероксидазы. Вызываемые геминном эффекты повышения активности этих ферментов не проявлялись в присутствии ДМТМ. Под действием донора СО после повреждающего прогрева также повышалась стабильность клеточных мембран, которую определяли по выходу из корней проростков соединений, поглощающих в ультрафиолетовой области спектра. Данный эффект также устранялся антиоксидантом ДМТМ. По-видимому, усиление образования H_2O_2 в корнях проростков при обработке донором СО является процессом, важным для активации антиоксидантной системы и, возможно, других протекторных систем.

Таким образом, в работе показано, что стресс-протекторное действие донора СО гемина на проростки пшеницы при тепловом стрессе опосредовано АФК, образующимися преимущественно с участием внеклеточной пероксидазы. В дальнейших исследованиях целесообразно выяснить роль других посредников сигнальной сети (в первую очередь, кальция и оксида азота) в реализации защитного действия экзогенного монооксида углерода.

Использование пироксенитового продукта обогащения отходов добычи флогопита для фиторемедиации техногенной пустоши в Субарктике

Петрова А.Г., Слуковская М.В., Марковская Е.Ф., Корнейкова М.В., Кременецкая И.П.

Петрозаводский государственный университет. пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия.
petrova_anna93@mail.ru

Добыча и переработка многих полезных ископаемых неизбежно связана с образованием и складированием отходов производств, а также зачастую приводит к загрязнению ландшафтов вследствие атмосферных выбросов предприятий. Особенно острой эта проблема является для Субарктики и Арктики в связи с высокой уязвимостью экосистем высоких широт. Современным подходом к решению таких проблем является утилизация горнопромышленных отходов в качестве материалов природоохранного значения.

Проведен камеральный и полевой эксперименты по изучению влияния внесения материалов с преобладанием пироксенита, полученных из отходов добычи флогопита, на продуктивность злаковых растений (*Festuca rubra* L., *Lolium perenne* L.) и химические свойства высоко загрязненной торфяной почвы импактной зоны медно-никелевого комбината (Мурманская обл., г. Мончегорск).

В 21-дневном камеральном эксперименте была измерена продуктивность, фотосинтетическая активность и ФС пигменты в растениях при различных объемных соотношениях между органической (загрязненный торф) и минеральной частями почвосмесей. Наилучшие результаты по изученным показателям были получены в вариантах с добавлением 25-62% пироксенитов.

В полевом эксперименте была изучена продуктивность растений, а также численность микроорганизмов. Результаты первого вегетационного сезона показали, что в варианте с соотношением пироксенитового материала и торфяной почвы 1:1, растительный покров имел наибольшую продуктивность, а микробное сообщество – максимальную численность бактерий и микровицетов.

Таким образом, проведение работ по ремедиации наиболее токсичной торфяной почвы техногенной пустоши путем перемешивания минеральных материалов в пропорции 1:1 с последующим формированием растительного покрова из злаковых растений является реалистичным, экономически рентабельным и эффективным способом восстановления растительности на территориях с загрязненным и деградировавшим почвенным покровом.

Исследование проведено в рамках темы НИР 0186-2019-0011, полевые работы выполнены в рамках гранта РНФ 19-77-00077.

Исследование аккумулирующей способности галофитных растений при загрязнении почвы Cu и Cd

Нестеров В.Н. *, Розенцвиг О.А. *, Богданова Е.С. *, Макурина О.Н. **, Розина С.А.***

* Институт Экологии Волжского бассейна РАН – филиал СамНЦ РАН, ул. Комзина, 10, Тольятти, Россия.

** Самарский национальный государственный университет им Королева. Ботаническая ул., 35, Самара, Россия.

*** Медицинский университет Реавиз. Чапаевская ул., 227, Самара, Россия.

nesvikl@mail.ru

Галофиты признаны наиболее успешной группой растений, устойчивых не только к действию соли, но и к другим воздействиям окружающей среды, таким как высокие и низкие температуры, засуха и тяжелые металлы. Благодаря более эффективной работе нескольких основных механизмов адаптации по отношению к тяжелым металлам, галофиты имеют преимущество в сравнении с гликофитами, что предполагает возможность их использования в технологиях фиторемедиации почвы, загрязненной как солями (NaCl), так и тяжелыми металлами. Однако, число галофитов, протестированных на способность извлекать ионы тяжелых металлов из загрязненной почвы, в настоящее время составляет немногим более 20. В связи с этим оценка аккумулирующей способности галофитов, а также физиолого-биохимическая реакция на воздействие тяжелых металлов является актуальной задачей современной экофизиологии растений. Для экспериментов были отобраны галофитные растения, различающиеся по типу соленакопления – эугалофит *Salicornia perennans* Willd. (сем. Amaranthaceae), накапливающий соли в надземных органах и гликогалофит *Artemisia santonica* L. (сем. Asteraceae), относящийся к типу соленепроницаемых растений. Семена дикорастущих растений проращивали на дистиллированной воде и высевали в сосуды с песком. Растения выращивали на питательной среде Робинсона, не содержащей NaCl, при температуре воздуха 20–22°C, освещенности – 1200 мкмоль/м² с⁻¹, фотопериоде – 10 ч. При достижении растениями трехмесячного возраста (ювенильная стадия) их разделяли на две группы: контроль и опыт. В опытные варианты в почву вносили однократно 10 мМ (1,9 г) Cu(NO₃)₂ или 10 мМ (2,4 г) Cd(NO₃)₂. Время экспозиции составило 1 сутки. Затем надземную массу растений срезали и использовали для анализов. У *A. santonica* отбирались листья, а у *S. perennans* – стебли, т.к. листья у данного вида редуцированы. Из усредненной массы составляли три независимых биологических пробы по 0,5-2 г сырой массы. Одновременно отбирали пробы почвы для определения содержания Cu и Cd. В контроле содержание Cu и Cd в почве составило не более 0,020 и 0,0001 мг на г сухой массы почвы, соответственно, в надземных органах растений – не более 0,008 и 0,0001 мг на г сухой массы листа, соответственно. В опытных вариантах в почве содержание Cu составило – 0,7 мг/г сухой массы, Cd – 0,5. За время экспозиции эугалофит *S. perennans* аккумулировал Cu в количестве – 0,28 мг/г сухой массы растений, Cd – 0,22. Гликогалофит *A. santonica* при том же уровне металлов в почве накапливал в листьях Cu меньше, чем эугалофит *S. perennans* в 10 раз, Cd – в 7 раз. Степень накопления металлов в надземных органах *S. perennans* показывает, что данный вид растений способен аккумулировать не только ионы Na, что отмечено у дикорастущих особей вида, но и ионы тяжелых металлов. Характер накопления металлов в листьях *A. santonica* показывает предрасположенность вида к соленепроницаемости, относящуюся не только к Na, но и к Cu и Cd. Состояние растений оценивали по оводненности надземной части растений, содержанию мембранных липидов (МЛ), водорастворимых (ВБ) и мембрансвязанных белков (МБ), уровню зеленых (Хл а и б) и желтых (Кар) пигментов, перекисному окислению липидов (ПОЛ), активности антиоксидантных ферментов. При воздействии Cu у *S. perennans* значения таких характеристик как оводненность, содержание МЛ, ВБ, МБ, Хл а и Кар снижались. При этом возрастал в 2,8 раз уровень ПОЛ в сочетании с увеличением активности антиоксидантных ферментов – каталазы и полифенолоксидазы (в 3-4 раза). У растений *A. santonica* уровень ПОЛ в сравнении с контролем снижался в 1,7 раз, также как снижалась активность пероксидазы и полифенолоксидазы, но возрастала – каталазы (в 1,8 раз). В свою очередь все другие измеренные параметры либо остались на уровне контроля, либо их значения выросли. Общим для *S. perennans* и *A. santonica* были неизменный, как и в контроле, уровень фосфолипидов и Хл б. В отличие от Cu при аккумулировании Cd у растения *S. perennans* снижалось только содержание ВБ и МБ. Уровень ПОЛ в сравнении с контролем увеличивался в 1,5 раза. При этом активность каталазы и полифенолоксидазы, также как при действии Cu, увеличивалась (в 2-4 раза), но снижалась – пероксидазы. Содержание пигментов и гликолипидов оставалось на уровне контроля, но содержание МЛ увеличилось за счет фосфолипидов. Уровень ПОЛ у растений *A. santonica* был сопоставим с контролем. Среди структурных компонентов клетки у данного вида отмечено только снижение содержания МБ и Хл а. Изменение активности ферментов в случае действия Cd на *A. santonica* имело разнонаправленный характер: не менялась активность каталазы, снижалась активность пероксидазы (в 2 раза) и увеличивалась активность полифенолоксидазы (в 1,7 раз). Таким образом, тип стратегии соленакопления галофитов распространяется не только на природные соли (содержащие Na), но и на антропогенные (содержащие Cu и Cd). Эугалофитам свойственно аккумулирование ионов металлов независимо от их природы, а гликогалофитам – солеисключение. Экспозиция растений с солями металлов показала, что у исследованных галофитов существуют как общие физиолого-биохимические реакции, так и видоспецифичные.

**Качественный состав и биологическая активность представителей рода *Thymus* L.
Центральной и Северо-Восточной Якутии**

Сивцева С.В., Степанова М.А., Ноговицына П.А., Охлопкова Ж.М.

Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова. Белинского ул., 58, Якутск, Россия.
SV.Sivtseva@mail.ru

На данный момент в мире уделяется внимание к изучению дикорастущих растений с целью использования в качестве источников лекарственного растительного сырья для получения биологически активных веществ (БАВ). Флора Якутии богата своеобразным природным комплексом с возможными источниками БАВ, которые издавна используются народной медициной. С этой точки зрения интерес представляют растения рода *Thymus* L., произрастающие на территории региона повсеместно. В России продукты, разработанные на основе БАВ из тимьяна ползучего и тимьяна обыкновенного, используются в качестве отхаркивающего, противомикробного, анальгетического и седативного средства, их разработка основана на многочисленных исследованиях. Однако, в литературе показано, что качественный и количественный состав БАВ может варьировать внутри видов, от места произрастания, условий освещенности, а также сроков сбора растительного материала.

В данной работе изучали качественный состав и антибактериальную активность метанольных экстрактов *Thymus serpyllum* L., произрастающих на территории Центральной и Северо-Восточной Якутии. Сбор растительного материала произведен на территории Амгинского, Хангаласского и Оймяконского районов во время фазы полного цветения и начала плодоношения в соответствии с ГОСТ с геоботаническим описанием фитоценозов. Для получения сухих метанольных экстрактов надземной фитомассы тимьяна проводили 72-х часовую экстракцию на мультиротаторном шейкере, двойное фильтрование через стерильные фильтры. Экстракты до скрининга хранились в условиях низких температур. Скрининг биологической активности полученных экстрактов проводили диско-диффузионным методом на культурах *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* и *Bacillus cereus*. Состав биологически активных веществ изучали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) с помощью качественных реакций. Повторность опытов 3-кратная, получаемые результаты подвергались статистической обработке.

Метанольный экстракт *Thymus serpyllum* L. представляет с собой жидкость светло-зеленого цвета с приятным ароматом, напоминающим запах мяты пряной. Оценка компонентного состава экстракта показала наличие агликонов, флаванонов, флаванолов, халконов, флаваноловых гликозидов, сапонинов, алкалоидов, терпенов, коричных кислот и катехина. Скрининг антибактериальной активности экстрактов показал следующий ранжированный ряд (по убыванию активности воздействия): *Salmonella enterica* > *Klebsiella pneumoniae* > *Bacillus cereus*. Более активными оказались экстракты, полученные из растений, произрастающих на территории Оймяконского района.

Таким образом, в экстракте, выделенном из растений, произрастающих на территории Северо-Восточной Якутии, отмечается наибольшее содержание фенольных соединений, что, возможно, обусловлено условиями произрастания и отвечает за выраженную антибактериальную активность. Полученные результаты помогут создать базу для дальнейшего расширения и углубления исследований в этой области наряду с известными по настоящее время данными.

Количественная характеристика клеток первого листа ячменя как модели для изучения онтогенетических изменений фотосинтетического аппарата

Киселева И.С.

Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина.
Ленина пр., 51, Екатеринбург, Россия.
irina.kiseleva@urfu.ru

Известно, что листья злаков растут за счет меристемы, локализованной в их основании. Первый лист ячменя, пшеницы или других хлебных злаков неоднократно использовался как модель для изучения формирования и развития фотосинтетической функции. Исследователи при этом опирались на представление о том, что у самого основания листа находятся меристематические клетки, в первой трети от основания – клетки растягивающиеся, а у верхушки – вполне зрелые. Каждый автор самостоятельно определял границы зон, где клетки делятся, растягиваются и дифференцируются, не проводя точных количественных измерений клеток. В настоящем исследовании приведены количественные характеристики клеток и пластид в 7-дневном первом листе ячменя сорта Луч, имевшего длину 98-100 мм разделенного на 11 неравных по длине зон с целью более точного определения границ этапов онтогенеза автотрофной клетки. Длина зон с I по XI составила, соответственно, 2; 2; 2; 5; 5; 5; 15; 15; 15; 15; 17-19 мм от основания до верхушки листа. Структурные характеристики определяли не менее, чем у 50 растений. Биохимические и физиологические параметры - в трех биологических повторностях, каждая из которых представляла объединенную пробу из 100-120 растений.

Характер изменения объема клеток от 4,3- 4,5 тыс.мм³ в I и II зонах до 6-12 тыс.мм³ в зонах III-VII и 16- 18тыс. мм³ в VII-XI зонах соответствует типичной S-образной кривой роста. Увеличение числа пластид в клетке происходило от 12 в I и II зонах до 21 в III зоне, 37-40 в IV и VI зонах и до 46-49 в VII-XI зонах. Рост числа пластид завершался раньше, чем рост самой клетки. Объем пластид практически не менялся в зонах I-II и составлял 3-4мм³, мало изменялся в зонах IV- VII, зато быстро возрастал в зонах VIII-XI – от 27 до 120 мм³. Суммарная поверхность пластид в клетке возрастала от основания листа до верхушки в 64,4 раза (от 22,4 до 1443,2 мкм²).

Содержание ДНК в расчете на клетку составило 6,8- 7,0 пг, а зонах III-XI – от 3,2 до 4 пг. В зонах I-II суммарно белка содержалось 0,8-0,7 нг; в зонах III-IV – 1,2-1,3 нг, а в зонах VI-XI – 1,9-5,2 нг на клетку. Содержание растворимого белка в зонах I и II составило 0,2-0,3 нг и последовательно возрастало от зоны III (0,5 нг) к зоне XI (1,4 нг).

Полученные результаты позволяют считать, что зоны I и II образованы меристематическими клетками: они имеют самый маленький объем; простую, близкую к кубической форму; наибольшее количество ДНК в расчете на клетку; неокрашенные пластиды в наименьшем количестве. Начиная с III и до V зоны, клетки интенсивно растягиваются, о чем свидетельствует увеличение их объема, числа пластид, рост содержания белка, практически двукратное снижение содержания ДНК в расчете на клетку, что означает прекращение репликации в этих клетках и переход к растяжению и дифференцировке. В VI и последующих зонах уже не происходит увеличения объема клеток и числа хлоропластов, что свидетельствует об их зрелости и дифференцированности. При этом происходит рост объема хлоропластов. Вероятно, если бы проростки имели возраст более 10 дней, в верхней части листовой пластинки уже не наблюдался рост хлоропластов.

Таким образом, в первом листе ячменя 7-дневного возраста можно четко определить участки, соответствующие зоне деления клеток, их растяжения и дифференцированных клеток. В этих участках были определены скорость поглощения CO₂ (по включению ¹⁴C) на свету и в темноте, содержание хлорофиллов, активность RUBISCO и PEPC. Показано, что при переходе от деления к растяжению и дифференцированному состоянию гетеротрофная фиксация CO₂ (в темноте) возрастала к клеткам в 3,2 раза (от 0,7 до 2,23 мкМ CO₂/10⁹ клеток*мин), а поглощение CO₂ на свету увеличивалось более чем в 100 раз (от 1,15 до 5,22 и 125,1 мкМ CO₂/10⁹ клеток*мин в зонах деления, растяжения и дифференцированных клеток, соответственно). Доля гетеротрофной ассимиляции в общей фиксации CO₂ снижалась по мере развития клетки от 37,8% до 15,9% и 1,8 %. Содержание хлорофилла увеличивалось более чем в 40 раз в расчете на клетку по мере ее развития. Среди продуктов 20 минутной фиксации ¹⁴CO₂ в зоне делящихся клеток преобладали малат и аспартат (до 40% от суммы меченых соединений). В зоне растяжения клеток содержание этих кислот снижалось до 20%, тогда как сумма 3-ФГК, фосфорных эфиров сахаров и сахарозы увеличивалась до 30%. В дифференцированной части листа на долю 3-ФГК, ФЭС и сахарозы приходилось 48%, а на долю аспартата и малата только 4%. Тотальная активность PEPC снижалась по мере развития клетки в 1,7 раза, а RUBISCO увеличивалась в 48 раз в расчете на клетку. При этом количество RUBISCO в клетке (по данным электрофоретического разделения грубого экстракта белков) увеличивалось более чем в 20 раз.

Таким образом, первый лист ячменя, как и других злаков, имеет четкое пространственное разграничение разновозрастных клеток. Для растений ячменя сорта Луч точно определены размеры зон, соответствующих клеткам, находящимся на стадии деления, растяжения или в зрелом состоянии. Это позволяет использовать его как модель для изучения онтогенеза фотоавтотрофной клетки.

Колленхима – «темная лошадка» в царстве первичных клеточных стенок

Сауткина О.В., Микишина П.В., Горшкова Т.А.

КИББ – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН. Лобачевского, 2/31, Казань, Россия.
sautkina@kibb.knc.ru

Клеточные стенки – наиболее масштабная составляющая растительной биомассы; они во многом определяют особенности биологии роста и развития растений. Основными компонентами клеточных стенок служат полисахариды, являющиеся, фактически, конечными продуктами фотосинтеза. Понимание механизмов формирования, специфики архитектуры и функционирования клеточных стенок различного типа – залог последующего успеха молекулярно-генетических манипуляций с целью получения сырья необходимого качества, а также для эффективной биоконверсии немодифицированного растительного сырья и развития новых биотехнологий.

Каждая растительная клетка окружена тонкой первичной клеточной стенкой. На основании особенностей архитектуры и полисахаридного состава традиционно выделяют два типа первичной клеточной стенки. Первый тип присущ, преимущественно, представителям двудольных. Такая клеточная стенка состоит из целлюлозы, пектинов и ксиланов, присутствующих примерно в равных пропорциях. Второй тип – характерен для злаков и представлен целлюлозой, глюканом со смешанным типом связи и (глюкуроно)арабиноксиланами. Общими признаками обоих типов служат небольшая толщина (порядка 0.1 мкм), хаотичное расположение микрофибрилл целлюлозы, отсутствие лигнина и способность необратимо растягиваться в ходе роста клеток. Клетки колленхимы, выполняющей механическую функцию в молодых органах растений, формируют особый тип первичной клеточной стенки. Несмотря на почти двухсотлетнюю известность и хорошее описание анатомии этой клеточной стенки, механизмы ее функционирования и модификаций в ходе роста клеток долгое время оставались в тени и начали привлекать активный интерес лишь в последнее десятилетие. Ключевая интригующая специфика и уникальность таких клеточных стенок состоит в сочетании способности у формирующих их клеток к растяжению при наличии утолщений, представленных, главным образом, целлюлозой, пектиновыми веществами и ксиланом. Сочетание сходства состава с классическими первичными клеточными стенками и значительной толщины, достигающей местами до 10 мкм, делает клетки колленхимы привлекательным объектом как для понимания механизмов формирования первичных клеточных стенок двудольных в целом, так и для разработки новых технологий, направленных на индукцию образования такой клеточной стенки с целью упрощенной конверсии растительного сырья при отсутствии лигнина. Основой для развития обоих направлений, помимо молекулярно-биологических работ, служит формирование адекватного представления об устройстве клеточных стенок колленхимы и его последующих модификациях при растяжении клеток.

На сегодня ясно, что реализация механической функции клетками колленхимы определяется высокой степенью оводненности и особенностями взаимодействия полисахаридов в клеточной стенке. Высокую степень насыщенности водой связывают, в первую очередь, с необходимостью поддержания гелеподобной структуры пектинового матрикса клеточной стенки. При этом об особенностях «взаимоотношений» полисахаридов матрикса между собой и с микрофибриллами целлюлозы для клеточной стенки колленхимы до сих пор почти ничего не известно. В то же время установлено, что на механические нагрузки колленхима реагирует увеличением толщины стенки и изменениями в её полисахаридном составе.

В докладе на примере черешков листа сельдерея, в котором параллельно формируются ткани с классической тонкой (паренхима) и утолщенной (колленхима) первичной клеточной стенкой, будут охарактеризованы особенности локализации различных видов полисахаридов матрикса утолщенной первичной клеточной стенки на разных стадиях роста черешка, установлена специфика их состава, строения и характера удерживания в утолщенной клеточной стенке клеток колленхимы. Одним из ключевых подходов для выявления этих особенностей будет сопоставление всех параметров с характеристиками полимеров тонкой первичной клеточной стенки паренхимных клеток. Поскольку в ходе созревания клеточной стенки колленхимы наблюдается изменение ориентации микрофибрилл целлюлозы, и некоторые идеи о возможности роста клеток колленхимы с утолщенной клеточной стенкой базируются на этом факте, один из акцентов в работе будет сделан на особенности полимеров, прочно удерживаемых микрофибриллами целлюлозы и/или взаимодействующих с ними.

Работа частично поддержана проектом РНФ (20-14-00335).

Компоненты светового сигналинга регулируют биогенез и процессинг микроРНК у растений *A. thaliana* мутантных по генам фитохромов в условиях синего света

Пашковский П.П.* , Карташов А.В.* , Злобин И.Е.* , Худякова А.Ю. , Строкина В.В.** ,
Креславский В.Д.** , Кузнецов Вл.В.***

* Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.

** Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Институтская ул., 2, Пушкино, Россия.
pashkovskiy.pavel@gmail.com

Свет может влиять на транскрипцию генов MIR, биогенез miRNA и активность комплекса RISC, таким образом, контролируя не только накопление miRNA, но и их биологическую функцию. Было обнаружено, что miRNA регулируются факторами транскрипции (ФТ), участвующими в ответах растений на свет различного спектрального состава. Известно, что взаимодействие PIF4 (phytochrome-interacting factor 4) с фотоактивированной формой фитохрома В (PHYВ) регулирует подгруппу нижележащих ФТ путем связывания с промоторами этих генов. В то же время PIF4 регулирует биогенез микроРНК, связываясь непосредственно с промоторами генов Dicer-like1 (DCL1) и дцРНК-связывающего белка (HYL1), способствуя дестабилизации этих важных процессорных белков, способных регулировать уровень зрелых микроРНК в условиях красного света. PIF4 взаимодействуя с фоторецепторами PHY может регулировать экспрессию светозависимых miRNAs в условиях воздействия красного света, однако, до какой степени этот механизм реализован в условиях синего света, остается неизученным.

Мы показали, что в условиях синего света экспрессия miR160, miR165a-5p, miR319c, miR396a-3p, miR163-5p, miR402, miR168a-5p, miR172a и miR833a-5p значительно изменялась у мутантов *A. thaliana phyA*, *phyb*, но не у *phyab*. Мы исследовали, роль PHYВ и PHYА в световой регуляции процессинга микроРНК, и обнаружили, что фоторецепторы красного спектра способны интегрировать передачу сигнала синего света и биогенез miRNA, регулируя транскрипцию и процессинг miRNA как напрямую, так и, вероятно, воздействуя на DCL1. Кроме того, мы обнаружили, что в условиях белого света повышенная экспрессия ФТ *HY5* и *HFR1* сопровождалась пониженной экспрессией микроРНК, указывая на наличие координации между передачей сигналов синего и красного света. Следовательно, свет может влиять на уровни miRNA, посредством регуляции компонентов светового сигналинга и фоторецепторов, которые, в свою очередь способны взаимодействовать с элементами биогенеза и процессинга miRNA, причем это проявляется в наибольшей степени в условиях синего света. Вместе с тем, можно предположить взаимную заменяемость PHYА и PHYВ, т.к. двойная мутация снижала эффективность светозависимой регуляции экспрессии miRNA.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-70130 и № 20-04-00512А.

**Короткий пептид AEDL модифицирует состояние хроматина в ядрах клеток регенерантов
Nicotiana tabacum и регулирует экспрессию генов**

Баранова Е.Н.^{*}, Федорева Л.И.^{*,}, Ванюшин Б.Ф.^{*,**}**

^{*} Всероссийский научно исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАН.
Тимирязевская 42, Москва, Россия.

^{**} Институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского МГУ имени М.В.Ломоносова,
Ленинские горы 1 к.40, Москва, Россия.
greenpro2007@rambler.ru

Неподвижные растения адаптируются к неблагоприятным факторам внешней среды, часто проявляя поразительную фенотипичную пластичность. По своей природе эта пластичность – эпигенетическая, поскольку растение с одним и тем же генотипом в разных условиях может иметь разные фенотипы. Образование плотной упаковки генетического материала, известной как хроматин, является отличительной особенностью эукариотической ДНК. Хроматин - это динамическая ДНК-белковая структура, которая может существовать как транскрипционно пермиссивный эухроматин или репрессивный гетерохроматин. Посттрансляционная модификация гистонов играет ключевую роль в регуляции динамики хроматина. Транскрипционно активные хроматины обычно содержат триметилированный гистон H3K4 и высокоацетилованный гистон H3 и H4. Напротив, транскрипционно молчащие хроматины обогащены метилированием лизина 9 и / или 27 гистона H3. Структура хроматина в эукариотических организмах очень динамична и может изменяться в процессе роста и развития, а также в ответ на воздействия окружающей среды.

В последние годы интерес к изучению действия коротких пептидов резко увеличился. Короткие экзогенные пептиды увеличивают продолжительность жизни животных и заметно улучшают физиологический статус пожилых людей. У растений, как и у животных, короткие пептиды индуцируют экспрессию генов, кодирующих факторы транскрипции, клеточной дифференцировки, роста и развития.

Было установлено, что тетрапептид AEDL при концентрации 10^{-7} М в среде стимулируют каллусогенез, увеличение массы каллусов *Nicotiana tabacum* и формирование листьев. В присутствии пептида в среде увеличивалось общее число регенерантов на эксплант. На средах с тетрапептидом наблюдали образование крупных регенерантов с большой площадью листовых пластин.

Было обнаружено, что при выращивании *Nicotiana tabacum* в присутствии 10^{-7} М пептида AEDL, в регенерантах табака происходит превращение транскрипционно неактивного гетерохроматина (75%-содержание гетерохроматина) в транскрипционно активный эухроматин (75%-содержание эухроматина). Пептид AEDL незначительно влиял на относительный уровень экспрессии генов семейства SET-белков, катализирующих метилирование лизиновых остатков гистоновых белков. Методом тушения флуоресценции FITC-меченых гистонов и их комплексов с ДНК пептидом было найдено, что AEDL связывается с гистонами в соотношении 1 М:1М с линкерным гистоном H1 пептид связывается с остатком лизина, расположенным на N-конце. А с гистоном H3 связывается с остатком лизина в положении 36, расположенным на C-конце. Такая модификация гистонов H1 и H3 пептидом AEDL приводит к нарушению плотной упаковки хроматина и образованию значительной области транскрипционно активного эухроматина.

Превращение одного состояния хроматина в другое сопровождается увеличением экспрессии некоторых генов. Для адаптации растений в ответ на агрессивное окружение, метилирование ДНК приобретает особо важное значение. ДНК растений метилируется обширным арсеналом специфических цитозиновых ДНК-метилтрансфераз, некоторые из которых не имеют аналогов у животных. У растений существуют два типа поддерживающих ДМТ: ДНК метилтрансферазы (MET) и хромометилтрансферазы (CMT). Растительные геномы имеют сайты метилирование трех типов: CG, CNG и CNN. В присутствии тетрапептида AEDL в регенерантах табака относительный уровень экспрессии поддерживающих ДНК метилтрансфераз MET1 и, особенно, хромометилтрансферазы CMT3 увеличивается в 1,5-3 раза по сравнению с контрольным вариантом. Уровень экспрессии генов ДНК метилтрансфераз семейства DRM2, метилирующих ДНК *de novo*, метилирующих несимметричные сайты CNN остается без изменения.

Работа выполнена по госзаданию АААА-А17-117091460012-8 и при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (№14 50 00029) и РФФИ (грант 18-016-00150).

Корреляции между клеточными параметрами роста корня и гаплоидным содержанием ДНК

Иванов В.Б., Жуковская Н.В., Быстрова Е.И., Лунькова Н.Ф.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
ivanov_vb@mail.ru

До сих пор остаются малоизученными эндогенные механизмы, определяющие различия в скоростях роста и развития разных видов. Одни из них связаны с особенностями генов разных видов, их величине, ploидности, доли гетерохроматина и других. Различные значения ядерного генома (C_{val}) выявлены не только у видов из разных семейств, но и у видов одного семейства. Установлены корреляции между величиной C_{val} и различными показателями, характеризующими рост и развитие растений, такими как жизненная форма, минимальная продолжительность жизненного цикла, продолжительность митотических циклов, географическое распределение и др. Однако, как зависят различные процессы роста и деления клеток в корнях от C_{val} мало исследовано. В нашей работе было изучено, как отличаются основные процессы, определяющие скорость роста корней, у видов из разных семейств, отличающихся по размерам генома и ploидности.

Впервые проведен сравнительный анализ организации роста корней большого числа видов на клеточном уровне. Нами определены длины меристем (L_m), зон растяжения (L_e), меристематических (I_m) и закончивших рост (I_{mat}) клеток, скорости роста (V), относительные скорости образования меристематических клеток (K_m) и растяжения (K_e), длительности митотического цикла (T) и продолжительности роста растяжением (T_e) у корневых проростков 65 видов и придаточных корней 30 видов однодольных и у корневых проростков 80 видов двудольных.

Значения C_{val} для разных видов были взяты из базы данных «Plant DNA C-values Database of Kew Royal Botanical Gardens». Величины C_{val} широко варьировали между видами. У однодольных видов, у которых исследовали первичные корни проростков, среднее значение составляло 8,2 пг (от 0,50 до 29,30 пг). У однодольных, у которых исследовали придаточные корни (преимущественно это были лилиоиды), среднее значение C_{val} составляло 22,4 пг (от 3,75 до 60,10 пг). Среднее значение C_{val} для исследуемых в работе видов двудольных – 4,07 пг (от 0,30 до 16,5 пг).

Анализ данных показал, что значения C_{val} слабо коррелировали с L_m и L_e у корневых проростков однодольных (коэффициенты корреляции (r) были соответственно 0,31 и 0,32, $P \leq 0,05$) и не коррелировали у корневых проростков двудольных видов и придаточных корней. При этом значения C_{val} коррелировали с длиной клеток. Эта корреляция особенно четко проявлялась для меристематических клеток ($r = 0,70$ для проростков однодольных, 0,45 для придаточных корней и 0,40 для проростков двудольных), а у клеток, закончивших рост только для проростков однодольных видов ($r = 0,50$). Значения C_{val} коррелировали с длительностью митотического цикла (T) у корневых проростков двудольных. Ещё более чётко эта корреляция прослеживалась у придаточных корней лилиоидов, у которых значения C_{val} значительно больше. Однако у корневых проростков однодольных эта корреляция была недостоверной. Значения C_{val} коррелировали с продолжительностью роста растяжением (T_e), коэффициенты корреляции составили 0,39 для корневых проростков однодольных, 0,64 для придаточных корней, 0,38 для корневых проростков двудольных.

На основании полученных данных можно проанализировать зависимость скорости роста корня (V) от отдельных процессов роста и деления клеток. Для корней, растущих с постоянной скоростью, $V = N_m / T * I_{mat}$, где N_m – число меристематических клеток в ряду, T – продолжительность митотических циклов и I_{mat} – длина закончивших рост клеток. Было показано, что различия в скорости роста разных видов определяются в большей степени различиями в N_m и в меньшей степени разной T и I_{mat} . Эти результаты показывают, что именно механизмы, определяющие число клеток в меристеме, имеют ключевое значение.

Наши данные показали снижение скорости роста корней (V), относительной скорости роста (K_e) и относительной скорости образования клеток (K_m) с увеличением C_{val} . Коэффициенты корреляции составили 0,03 для корневых проростков однодольных, -0,24 для придаточных корней и -0,23 для двудольных для V , -0,12 для корневых проростков однодольных, -0,44 для придаточных корней и -0,30 для двудольных для K_e и -0,33 для корневых проростков однодольных, -0,57 для придаточных корней, -0,39 для корневых проростков двудольных для K_m . Чем выше K_e , тем короче зона растяжения, если не меняется I_{mat} . Рост растяжением напрямую не связан с синтезом ДНК, и поэтому изменение K_e с увеличением C_{val} представляет большой интерес. Механизмы этих корреляций требуют дальнейшего изучения.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания (тема №121040800153-1).

Кортикулярный фотосинтез: структурные основы и биологические функции

Савченко Т.В. *, Сундырева М.А. **, Яныкин Д.В. *, Хоробрых А.А. *, Семенова Г.А. ***,
Христин М.С. *, Смолова Т.Н. *, Найдов И.А. *, Ашихмин А.А. *

* Институт фундаментальных проблем биологии РАН. Институтская, 2, Пушкино, Россия.

** Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства и виноделия.
40-Летия Победы, 39, Краснодар, Россия.

*** Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Институтская, 3, Пушкино, Россия.
savchenko_t@rambler.ru

В ходе эволюции листья сформировались как основной фотосинтезирующий орган высших растений. Морфология, анатомия и молекулярная организация клеточных компонентов листьев созданы для эффективного поглощения световой энергии и газообмена с окружающей средой. Однако, фотосинтез характерен и для некоторых нелистовых органов (Aschan and Pfan, 2003; Hu et al., 2012). Способность поглощать энергию света и преобразовывать ее в энергию химических связей поддерживается не только в молодых зеленых побегах, но и в одревесневших ветвях и стволах в тканях под внешней корой (Pfan et al., 2002). Установлено, что фотосинтез, происходящий в тканях хлоренхимы внутренней коры, так называемый «кортикальный фотосинтез», вносит вклад в радиальный рост стебля, накопление биомассы почек и формирование молодых листьев (Aschan and Pfan, 2003; Saveyn et al., 2010). Молодые и однолетние одревесневшие побеги виноградной лозы представляют собой удобную модель для изучения кортикального фотосинтеза (Ivanov et al., 1990; Tikhonov et al., 2017). Сравнительный анализ структурно-функциональных характеристик фотосинтетического аппарата в листьях и в тканях внутренней коры однолетней одревесневшей лозы позволил выявить ряд особенностей работы кортикального фотосинтетического аппарата (КФА). По сравнению с листовым фотосинтетическим аппаратом (ЛФА) в КФА высока доля Q_B -невосстанавливающих центров фотосистемы 2 (ФС2) (примерно 2/3), что подтверждается повышенной О-*J*-фазой в кинетике флуоресценции, высоким содержанием комплексов ФС2, содержащих уменьшенные антенны и неспособных к восстановлению Q_B (ФС2 β комплексы), а также более низкими скоростями ре-окисления Q_A^- . КФА и ЛФА по-разному используют поглощенную энергию света и защищаются от избыточного освещения. В КФА значительная часть поглощенной световой энергии рассеивается в виде тепла (регулируемая и нерегулируемая тепловая диссипация), и лишь незначительная часть энергии возбуждения используется для темновых реакций фотосинтеза. Константа скорости фотоингибирования в КФА почти в три раза выше, чем в ЛФА, в то время как величина ΔpH -зависимого нефотохимического тушения флуоресценции – в два раза ниже. Электронно-микроскопический анализ подтвердил наличие интактных пластид в тканях хлоренхимы лозы. Внутреннее пространство пластид заполнено крупными крахмальными зернами, а тьяжи тилакоидных мембран, в основном, смещены к периферии. Анализы показали, что кортикальные пластиды являются специализированными органеллами, сочетающими в себе свойства хлоропластов, амилопластов и геронтопластов.

Сравнительный анализ активности КФА в сортах винограда, отличающихся по устойчивости, выявил положительную корреляцию между активностью КФА и морозостойкостью растений. Снижение устойчивости лозы к низкотемпературным повреждениям в результате подавления фотосинтетической активности с помощью затенения или применения ингибиторов переноса электронов в фотосинтетической электронно-транспортной цепи подтверждает роль кортикального фотосинтеза в формировании морозостойкости многолетних растений винограда.

Aschan G, Pfan H (2003) Non-foliar photosynthesis – a strategy of additional carbon acquisition. *Flora* 198:81–97.

Hu YY, Zhang YL, Luo HH, Li W, Oguchi R, Fan DY, Chow WS, Zhang WF (2012) Important photosynthetic contribution from the non-foliar green organs in cotton at the late growth stage. *Planta* 235(2): 325–336.

Pfan H, Aschan G, Langenfeld-Heysler R, Wittmann C, Loose M (2002) Ecology and ecophysiology of tree stems: cortical and wood photosynthesis. *Naturwissenschaften* 89:147–162.

Saveyn A, Steppe K, Ubierna N, Dawson TE (2010) Woody tissue photosynthesis and its contribution to trunk growth and bud development in young plants. *Plant Cell Environ* 11:1949–1958.

Ivanov A, Ignatova N, Christov A (1990) Comparative ultrastructural and fluorescence studies of grapevine (*Vitis vinifera* L.) chloroplasts isolated from stem and leaf tissues. *Plant Sci* 67:253–257.

Tikhonov KG, Khristin MS, Klimov VV, Sundireva MA, Kreslavski VD, Sidorov RA, Tsidendambayev VD, Savchenko TV (2017) Structural and functional characteristics of photosynthetic apparatus of chlorophyll-containing grape vine tissue. *Russian Journal of Plant Physiology* 64(1):73–82.

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований, грант №18-04-00079.

Малые сигнальные пептиды в регуляции механизмов быстрого ветвления корневых систем

Демченко К.Н., Кирюшкин А.С., Ильина Е.Л., Гусева Е.Д.

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН. Ул. Профессора Попова, 2, Санкт-Петербург, Россия.
demchenko@binran.ru

Корневая система растения выполняет такие важные функции, как поглощение воды и питательных веществ, необходимых для роста и развития, закрепление растения в почве, хранение запасных веществ. Помимо описанных выше функций, корневая система вступает в многочисленные взаимодействия с корнями других растений, микроорганизмами и грибами, находящимися в почве. Корневая система – это динамичное образование, которое подвержено влиянию факторов окружающей среды: влажности, кислотности и температуры почвы, наличию питательных веществ. Способность корня к адаптациям в ответ на изменение влажности почвы и количества питательных веществ в ней предоставляет возможность для изучения природной пластичности корня и выяснения тех его особенностей, которые могут повысить урожайность растений в рамках сельскохозяйственного производства. В докладе проведен сравнительный анализ роли малых сигнальных пептидов и их рецепторов как на классических модельных объектах (*Arabidopsis*, рис и др.) и с инициацией бокового корня выше зоны растяжения, так и на видах из семейств Тыквенные и Гречишные: огурец (*Cucumis sativus*) и гречиха (*Fagopyrum esculentum*), у которых инициация и формирование примордиев бокового корня происходят непосредственно в меристеме родительского корня, а корневая система характеризуется активным ветвлением в почве. Недавние исследования показали, что пептид RAPID ALKALINIZATION FACTOR LIKE 34 (RALFL34) у *Arabidopsis* действует на транскрипционный каскад, приводящий к инициации бокового корня, раньше, чем транскрипционный фактор GATA23, который до недавнего времени считался наиболее ранним молекулярным маркером клеток-основательниц будущего бокового корня. С целью выяснения роли малого сигнального пептида RALFL34 и его рецептора THESEUS1 на начальных этапах формирования бокового корня в меристеме родительского корня у огурца, нами изучен паттерн распределения экспрессии этих генов, а также локализация и транспорт сигнального пептида RALFL34. В геноме огурца были выявлены ортологи этих генов *Arabidopsis thaliana*. Локализация паттерна экспрессии RALFL34 проведена с использованием репортерных конструкций. Показано, что его экспрессия начинается в клетках рядов протоксилемы на удалении около 150 мкм от инициальных клеток. Далее она распространяется в ряды периферической метаксилемы, а также обнаружена в клетках-основательницах бокового корня до первых антиклинальных делений, формирующих примордий, и сохраняется в них до стадии развития V (разрушения наружных рядов коры материнского корня). Для определения клеточного и тканевого паттерна белка RALFL34 были созданы генетические конструкции, различающиеся типом слияния кодирующих последовательностей генов CsRALFL34 и mNeonGreen. При использовании конструкции слияния без линкерной последовательности был выявлен паттерн распределения пептида CsRALFL34 в кончике корня с секрецией белка в апопласт. Синтез белка CsRALFL34 начинался в клетках протоксилемы и сохранялся на всем протяжении ее развития до стадии терминальной дифференциации сосудов ксилемы. Также синтез белка запускался в отдельных клетках перицикла – клетках-основательницах примордия и сохранялся в примордии до стадии развития V. Зрелый пептид RALFL34 экскретировался клетками протоксилемы и накапливался в апопласте рядов коры корня на протяжении всей меристемы корня. Для определения тканевого паттерна активности промотора гена *THESEUS1* была создана генетическая репортерная конструкция с ядерной локализацией *CsTHESEUS1::mNeonGreen-H2B*. Выявлена конститутивная экспрессия гена *CsTHESEUS1* в кончике корня огурца.

Впервые показано, что у растений с инициацией и развитием примордия бокового корня в апикальной меристеме родительского корня задействованы схожие регуляционные системы малым сигнальным пептидом RALFL34 и его рецептором THESEUS1, как и при инициации бокового корня выше зоны растяжения. В докладе обсуждается роль RALFL34 в ростовых процессах, а также регуляции механизмов определения позиционной информации о дифференциации проводящих тканей корня и участию их на самых начальных этапах радиального и продольного позиционирования бокового корня. Рассмотрено участие этилена в регуляции локальной экспрессии RALFL34. Кроме того, обсуждается механизм влияния RALFL34 на сигналинг пролиферации клеток корня и их связь с регуляцией экспрессии транскрипционных факторов семейства LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN (LBD).

Полученные нами данные позволяют ответить на вопросы о существовании единых механизмов регуляции развития корневых систем Цветковых растений, а также направлениях эволюции ветвления корней. Кроме того, они вносят существенный вклад в знания о клеточных и молекулярно-генетических механизмах повышения адаптивных свойств и урожайности ценных сельскохозяйственных культур.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФ (20-16-00115) и РФФИ (19-04-01079).

Меланизация лишайников: генетические детерминанты и биохимические характеристики

Минибаяева Ф.В. *, Лексин И.Ю. **, Рассабина А.Е. *, Beckett R.P. ***

* Казанский институт биохимии и биофизики, Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Лобачевского ул. 2/31, Казань, 420111, Россия.

** Казанский (Приволжский) федеральный университет», Кремлевская ул. 18, Казань, 420008, Россия.

*** School of Life Sciences, University of KwaZulu-Natal, Private Bag X01, Pietermaritzburg, 3209, South Africa.
minibayeva@kibb.knc.ru

Лишайники – симбиотические фотосинтезирующие организмы, обладающие феноменальной устойчивостью к действию неблагоприятных условий окружающей среды. Среди факторов, которые могут вносить вклад в формирование стрессовой устойчивости лишайников, особое место занимают уникальные вторичные метаболиты, в частности, разнообразные по структуре терпены, фенолы, необычные жирные кислоты и пигменты, в том числе высокомолекулярные темные пигменты – меланины. Меланизация особенно распространена у лишайников, растущих в условиях повышенного стресса, поэтому можно предположить, что меланины играют роль в устойчивости к стрессовым воздействиям. Информация о типах, структуре, физико-химических свойствах и генной регуляции синтеза меланинов лишайников крайне ограничена. На основании элементного анализа нами обнаружено, что лишайники, содержащие азотфиксирующий фотобионт (цианобактерии), как правило, синтезируют эумеланин, в то время как лишайники, содержащие фотобионт, нефиксирующий азот (зеленые водоросли), продуцируют DHN-меланин, предшественник алломеланина. Синтез этих типов меланинов осуществляется разными метаболическими путями. Лишайник *Lobaria pulmonaria* относится к так называемым трипартитам, содержащим оба типа фотобионта - водоросль *Symbiochloris reticulata* из класса *Trebouxiophyceae* и цианобактерию рода *Nostoc*, находящуюся в цефалоподиях. В ходе УФ-индуцированной меланизации талломов с помощью транскриптомного анализа выявлено повышение экспрессии генов отдельных тирозиназ и мультимедных оксидаз, вовлеченных в синтез эумеланина, а также генов поликетидсинтаз, сциталондегидратаз и ТНН-редуктаз, вовлеченных в синтез DHN-меланина. Наличие активности генов синтеза обоих типов меланинов подтверждает роль обоих фотобионтов (водоросли и цианобактерии) в синтез меланинов в этом трипартите. Представляет интерес активность генов, вовлеченных в образование белковых комплексов и метаболизм азота, предположительно участвующих в азотном сигналинге. С помощью ИК-спектроскопии было определено наличие в меланинах ароматических и алифатических групп. Выявленные парамагнитные свойства меланинов и их активность по восстановлению радикалов DPPH свидетельствуют о проявлении антиоксидантных свойств. Интересно, что эумеланин из *L. pulmonaria* проявил более высокую антиоксидантную активность, чем алломеланин из *Cetraria islandica*. Меланизация лишайников способствовала защите талломов от УФ-облучения и действия света высокой интенсивности, что было подтверждено с помощью анализа интенсивности поглощения меланинов в УФ- и видимой части спектра, а также с помощью изучения фотосинтезирующей активности талломов. Таким образом, меланизация талломов лишайников – многоступенчатый процесс, детерминированный активностью разнообразных генов этого сложного симбиотического сообщества. Меланины лишайников играют важную роль в повышении устойчивости лишайников к стрессовым факторам.

Работа поддержана грантом РФФ № № 18-14-00198.

Мембранные антипортеры Na^+/H^+ в корневом клубеньке *Medicago truncatula*

Трифорова Н.А., Федорова Е.Э.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия
natali.flow@yandex.ru

Корневой клубенек – это новообразованный особый орган, возникающий в результате симбиотических отношений между бобовым растением и бактериями различных групп. В клетках клубенька бактерии способны к восстановлению азота воздуха до аммиака, процесс называемый азотфиксацией. Одной из особенностей клубенька является высокая чувствительность к содержанию в почве $NaCl$. В связи с низкой устойчивостью к солевому стрессу, мы предположили, что ткани клубенька имеют особенности в поддержания ионного баланса.

У растений, находящихся в условиях солевого стресса выведение ионов натрия является одним из важнейших способов адаптации. В связи с этим, мы исследовали катион/протонные антипортеры, участвующих в секвестрировании натрия: *NHX1* и *NHX7* (Blumwald E., 2014). Локализация мембранных антипортеров Na^+/H^+ у *Arabidopsis thaliana* обнаружена в разных мембранных компартментах: *AtNHX7* был локализован на цитоплазматической мембране, *AtNHX5-6* на эндосомах и *AtNHX1-4* на тонопласте.

Согласно результатам qPCR, после воздействия краткосрочного (5 дней) и долгосрочного (30 дней) солевого стресса на клубеньки *Medicago truncatula* в зависимости от длительности воздействия, отмечена динамика экспрессии антипортеров Na^+/H^+ *NHX1* и *NHX7*.

Мы исследовали локализацию Na^+/H^+ антипортера *NHX1* методами иммуноцитохимии и конфокальной микроскопии в клубеньках *Medicago truncatula*. Согласно результатам, белок Na^+/H^+ антипортера *NHX1* показал сигнал в неинфицированных и инфицированных клетках на тонопласте, также сигнал был частично связан со стареющими симбиосомами.

Bassil E., Blumwald E. The ins and outs of intracellular ion homeostasis: NHX-type cation/ H^+ transporters// Current Opinion in Plant Biology. – 2014. – Т. 22. – С. 1-6.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 19-04-00570А).

Метаанализ ауксин-индуцированных транскриптомов выявил путь трансдукции сигнала ауксина к его PIN транспортерам

Коврижных В.В.

Новосибирский государственный университет. Пирогова, 2, Новосибирск, Россия.
vasilinakovr@gmail.com

Ауксин – гормон растений, играющий ключевую роль в онтогенезе. Его влияние на процессы клеточной дифференцировки обусловлено дозозависимым механизмом действия. Апикальная меристема корня *Arabidopsis thaliana* является удобным объектом для изучения механизмов действия ауксина по причине наличия градиента концентрации этого гормона в данной части растения. Формирование этого градиента определяется функционированием транспортеров ауксина белков семейства PIN. При этом экспрессия генов, кодирующих PIN белки регулируется ауксином дозозависимо. Трансдукция сигнала ауксина происходит через транскрипционные факторы семейства ARF путем регуляции ауксином стабильности их репрессоров семейства Aux/IAA. Все три семейства (PIN, ARF и Aux/IAA) являются мультигенными, и конкретные участники трансдукции сигнала ауксина к каждому из белков PIN в настоящее время неизвестны. В связи со сложностью исследования этого вопроса экспериментальными методами, актуальной задачей является поиск участников трансдукции сигнального пути ауксина к его PIN транспортерам биоинформатическими методами. Для решения этой задачи мы разработали алгоритм метаанализа индуцированных ауксином транскриптомов. С его помощью были отобраны гены, дифференциально экспрессирующиеся в ответ на ауксин согласованно с *PIN1*, *PIN3*, *PIN4*, *PIN7*, и выявлены возможные участники сигнального пути ARF-Aux/IAA, регулирующие экспрессию каждого *PIN* гена. Применив сравнительный анализ, мы определили общие и специфичные аспекты в регуляторных контурах для исследуемых *PIN*. Реконструкция генных сетей и их анализ показали возможные взаимодействия между дифференциально экспрессирующимися генами, выявленными в результате метаанализа, и послужили дополнительным подтверждением большинства сигнальных путей, предсказанных нами. Используя данный комплексный подход, мы предположили, что регуляция ауксином экспрессии *PIN* происходит через несколько ARF-Aux/IAA регуляторных контуров, в которых комбинируются *ARF4*, *ARF10* и *IAA4*, *IAA12*, *IAA17*, *IAA18*, *IAA32*. Некоторые комбинации специфичны для регуляции транскрипции определенных генов *PIN* под действием ауксина, тогда как другие, напротив, являются общими для нескольких генов *PIN*. Разработанный алгоритм метаанализа можно использовать для решения других задач поиска регуляторов экспрессии генов с привлечением транскриптомных данных.

Работа выполнена при поддержке гранта президента МК-3470.2021.1.4

Метаболическая роль H₂O в репродуктивный период (от клетки до экосистемы)

Гончарова Э.А.

ВИР им. Н.И. Вавилова, ул. Б. Морская 44, Санкт-Петербург, Россия.
e.goncharova@vir.nw.ru

В изучении важнейшей репродуктивной функции всего растительного мира, используя в экспериментах физиолого-генетический подход, выявлены физиологические, метаболические и морфо-структурные механизмы, обуславливающие репродуктивный статус растений. Изучение механизмов эндогенной регуляции, координации функций различных органов и физиологических процессов в системе плодоносящего растения имеет определяющее значение. Однако физиологическая сущность и закономерности этих процессов у растений, как в оптимальных условиях произрастания, так и в стрессовых еще недостаточно изучены. Причины этих взаимодействий, вероятно, можно объяснить особой биологической значимостью генеративных органов (плодов) для растения в эволюционном аспекте. У культурных растений в процессе селекции человек гипертрофировал биомассу именно плодов, практически не изменив мощность фотосинтетического аппарата, что привело к напряженности функционирования донорноакцепторной системы у растений. Подчеркивая важную роль транспорта воды в осуществлении саморегуляции организмом своих функций путем взаимосвязи органов между собой, следует иметь в виду и другую важную сторону – эндогенную регуляцию самого транспортного процесса в растении. Поглощение, транспорт и перераспределение воды, ассимилятов и других веществ между органами, их фотосинтетическую деятельность, гормональный баланс и связанную с ними ростовую активность, а также некоторые физиолого-биохимические и анатомические изменения, приводящие к опадению генеративных органов. Опадение их связано с образованием у основания органа так называемой отделительной зоны (или слоя) клеток, трансформирующихся из обыкновенных паренхимных клеток данного участка. Изучение отделительного слоя плодоножки под световым и электронным микроскопами показало, что водный и температурный стрессы ускоряют деструктивные изменения, характерные для последующего разрушения и лизиса этих клеток. Одной из значимых сторон метаболического (включающего и водообмен) влияния плодов на функционирование других органов растений при стрессах служит обнаруженное нами достоверное воздействие генеративных органов (плодов) на общую устойчивость растений к экстремальным условиям. Экспериментально установлено, что образование плодовых органов, обладающих высокой аттрагирующей способностью, существенно повышает функциональную активность вегетативных органов и заметно увеличивает общую устойчивость растения к экстремальным воздействиям. Последнее имеет глубокий биологический смысл, так как образование генеративных органов мобилизует, очевидно, все потенциальные возможности организма, в том числе и его устойчивость к стрессам (повышая ее), но излишний «груз» плодов несколько ослабляет функциональную мощность, в том числе и сопротивляемость экстремальным воздействиям среды.

Методологические аспекты молекулярной диагностики в семеноводстве картофеля

Толоконцев Д.В.

Костромская государственная сельскохозяйственная академия. Кострома, Россия.
tolokontsew@mail.ru

В РФ лаборатории по диагностике фитопатогенов, в качестве основного метода используют иммуноферментный анализ (ИФА). Постепенно в дополнение к ИФА приходит более чувствительный метод полимеразной цепной реакции в разных форматах детекции результатов. Он превосходит ИФА по чувствительности и возможности проводить количественную оценку фитопатогенов, однако уступает ИФА по производительности и требует значительно более сложной и дорогостоящей организации и подготовки. Однако, в настоящее время в практику оригинального семеноводства картофеля широко внедряется молекулярная диагностика. Вступивший в силу с 1-го января 2018 года межгосударственный стандарт ГОСТ 33996-2016 регламентирует полимеразно-цепную реакцию (ПЦР), наряду с методами иммуноферментным анализом (ИФА) и иммунохроматографическим анализом (ИХА) для диагностики вирусных болезней картофеля. Пока преимущественно молекулярная диагностика используется для идентификации карантинных фитопатогенов вирусной, виroidной, бактериальной и грибной природы, а также фитогельминтов - картофельных цистообразующих нематод. Согласно методическим указаниям ВНИИКР, ИБХ РАН и фирмы ООО «АгроДиагностика» в настоящее время имеется возможность диагностировать методом ПЦР следующие патогены картофеля: кольцевую гниль картофеля (*Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*), бурую бактериальную гниль картофеля (*Ralstonia solanacearum*), виroid веретеновидности клубней картофеля (*Potato Spindle Tuber Viroid*), вирус скручивания листьев картофеля (*Potato Leafroll Virus*), М вирус картофеля (*Potato Virus M*), S вирус картофеля (*Potato Virus S*), X вирус картофеля (*Potato Virus X*), Y вирус картофеля (*Potato Virus Y*), A вирус картофеля (*Potato Virus A*), T вирус картофеля (*Potato Virus T*), вирус пожелтения картофеля (*Potato yellowing virus*), вирус метельчатости верхушки картофеля (*Potato mop-top virus*), андийский вирус крапчатости картофеля (*Andean potato mottle virus*), андийский латентный вирус картофеля (*Andean potato latent virus*), бледную картофельную цистообразующую нематоду (*Globodera pallida*), золотистую картофельную цистообразующую нематоду (*Globodera rostochiensis*), рак картофеля (*Synchytrium endobioticum*), вирус черной кольцевой пятнистости картофеля (*Potato black ringspot virus*).

При проведении ПЦР необходимо руководствоваться общепринятыми протоколами и/или протоколами ООО «Агродиагностика». Для выделения суммарной РНК из растительных проб можно использовать набор «ПРОБА-НК». Для проведения обратной транскрипции требуется обратная транскриптаза (MMLV ревертаза), сумма праймеров (Random (dN)10 праймер Oligo (dT)15 праймер), буфер для обратной транскриптазы. Для проведения реакции проще использовать аликвотированные наборы ООО «Агродиагностика» (или аналогичные) с добавлением 5мкл кДНК исследуемой пробы и 10 мкл Таq-полимеразы. Реакцию амплификации можно ставить используя недорогой отечественный программируемый термостат ТП4-ПЦР-01 «Терцик» (или на аналогичном классическом амплификаторе) по указанной программе. Режим амплификации для амплификатора «Терцик» алгоритм регулирования: «точный»

Этап ПЦР	Температура	Время	Количество циклов
Денатурация ДНК	94°C	1 мин 30 с	1
Отжиг праймеров	94°C	20 с	5
	64°C	5 с	
	67°C	5 с	
Элонгация ДНК	94°C	1 с	40
	64°C	5 с	
	67°C	5 с	
Окончание реакции	10°C	хранение	

Электрофорез продуктов реакции проводится в 2,5% агарозном геле с концентрацией бромистого этидия (3,8-Диамино-5-этил-6-фенилфенантридиум бромид $C_{21}H_{20}BrN_3$) 1 мМ с использованием трис-ацетатного буфера (ТАЕ) в камере для горизонтального электрофореза SE-2 с источником питания ИП-1000. Для детекции результатов подходит трансиллюминатор «УВТ-1» или аналогичный. Длина детектируемых продуктов амплификации для вирусов X – 167 п.н., Y – 241 п.н., S -278 п.н., M – 160 п.н., L -260 п.н., длина внутреннего контроля составляет 560 п.н. (для тест-систем фирмы «Агродиагностика»). При наличии дорогостоящего детектирующего амплификатора (в реальном времени) детекция результатов проводится без электрофореза.

Выводы. В целом, метод ПЦР имеет ряд преимуществ по сравнению с ИФА методом. В первую очередь он позволяет выявлять патогены не доступные для ИФА метода. Из важных для семеноводства патогенов, недоступных для ИФА – можно отметить кольцевую гниль и виroid веретеновидности клубней. Для остальных 5-ти регулируемых не карантинных вирусов картофеля имеются в наличии ИФА-диагностикумы отечественного производства (ВНИИКХ им А.Г. Лорха). Таким образом, предварительное тестирование методом ИФА, в принципе, позволяет решать семеноводческие задачи – выявлять 90 % основных 5-ти регулируемых не карантинных вирусов картофеля. Однако, для более точного фитосанитарного контроля растений *in vitro* перед масс-клональным размножением в лаборатории комплексно с ИФА можно и нужно рекомендовать использовать ПЦР, как более чувствительный метод.

Механизмы защитного действия оксида азота на растения пшеницы

Масленникова Д.Р., Безрукова М.В., Шакирова Ф.М.

ФГБНУ Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Пр. Октября 71, Лит. 1Е, Уфа, Россия.
dishaoil@mail.ru

Интерес физиологов растений к такой молекуле, как оксид азота (NO) не ослабевает уже более двух десятков лет. NO является внутриклеточной сигнальной молекулой, вовлекаемой в регуляцию основных физиологических процессов на всех этапах жизненного цикла растений, участвуя в регуляции прорастания семян, корнеобразования, гравитропизма, закрывания устьиц, цветения, созревания плодов, процессов старения. Имеются сведения о способности NO повышать устойчивость растений к широкому спектру стрессовых воздействий биотической и абиотической природы. Исследование физиологического и защитного влияния оксида азота на растительные объекты актуально и по сей день, поскольку механизмы реагирования и ответ растительных организмов на его воздействие в полной мере не исследованы. Для изучения механизмов действия оксида азота на растительные организмы применяют различные доноры NO, такие как диэтиламин- NONO, S-нитрозоглутатион, N- ацетилпеницилламин, в своих исследованиях мы использовали нитропруссид натрия (SNP). В ходе работы была подобрана концентрация 200 мкМ SNP оказывающая защитное действие при предобработке в течение 24 ч растений пшеницы *Triticum aestivum L.* сорта Салават Юлаев в условиях кратковременного (5 ч) дефицита влаги моделируемой 12% ПЭГ, о чем судили по линейным размерам, сырой и сухой массе корней проростков. Антиоксидантной системе отводят важную роль в контроле и регуляции роста и развития растений на протяжении всего онтогенеза, в стрессовых условиях именно от её работы зависит насколько быстро и адекватно растение сможет не только адаптироваться к неблагоприятным условиям, но и выжить. Выявлено, что дефицит влаги вызывал значительное накопление супероксид аниона, истощение пула глутатиона восстановленного (GSH) и повышение активности супероксид дисмутазы (СОД), пероксидазы, глутатионредуктазы (ГР), глутатион -S-трансферазы (ГСТ), что вполне ожидаемо, поскольку воздействие 12 % ПЭГ вызывает развитие окислительного стресса, что в свою очередь приводит к нарушению целостности мембранных структур и накоплению МДА. Предобработанные SNP растения характеризовались значительно меньшим уровнем генерации супероксид аниона, активации СОД и пероксидазы, а так же повышенным на 25-30% относительно контроля содержанием GSH на протяжении всего опыта. Поддержание и дополнительное накопление восстановленной формы глутатиона по всей вероятности, связано со способностью оксида азота дополнительно на 30-35% активировать ГР, что выражается в дополнительном накоплении GSH, это свидетельствует о снижении степени повреждающего действия 12% ПЭГ на эти проростки, что доказывают данные по активности ГСТ и содержанию МДА. Полученные результаты свидетельствуют, о том, что важный вклад в реализацию защитного действия оксида азота вносит его способность регулировать редокс - статус растений пшеницы.

Ранее, в том числе нами, было показано, что стрессовые факторы разной природы вызывают в растениях пшеницы обратимое накопление такого лектина как агглютинин зародыша пшеницы (АЗП), который является активным участником АБК-контролируемых реакций в ответ на стрессовые воздействия, при этом часть лектина экскретируется в область апикальной меристемы корней, становясь, по-видимому, экзогенным агентом для растения. Проведенные исследования выявили способность экзогенного АЗП активировать деление клеток апикальной меристемы корней злаков в норме и снижать уровень стресс-индуцированного торможения роста, поддерживая митотический индекс клеток на более высоком уровне при стрессе. Анализ полученных данных показал, что предобработка растений SNP в условиях способствовала не только значительному снижению стресс-индуцированного накопления эндогенного АЗП, но и поддержанию его на уровне контрольных значений на протяжении всего опыта. Эти результаты свидетельствуют о том, что АЗП может вовлекаться в реализацию защитного действия оксида азота на растения пшеницы при дефиците влаги, что находит свое отражение в нормализации деления клеток и в целом ростовых параметров этих растений. Наряду с этим, ранее нами были получены данные, свидетельствующие о способности АЗП предотвращать стресс-индуцированное нарушение гомеостаза АФК и регулировать редокс-метаболизм пшеницы при обезвоживании.

Полученные результаты указывают на то что, весомый вклад в реализацию анитрессового действия оксида азота вносит его способность регулировать уровень АЗП и состояние основных компонентов антиоксидантной системы в корнях проростков пшеницы, что существенно расширяет спектр наших знаний о действии оксида азота на растения пшеницы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-00904 а), частично в рамках госзадания (№ темы АААА-А21-121011990120-7).

Механизмы потери устойчивости к обезвоживанию в растениях *Pisum sativum* L. при переходе от стадии семени к стадии проростка

Смоликова Г.Н. *, Билова Т.Е. *, Черевацкая М.А. *, Крылова Е.А. **, Стрыгина К.В. **, Хлесткина Е.К. **, Фролов А.А. *, Медведев С.С. *

* Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, Россия.

** Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия.
g.smolikova@spbu.ru

Устойчивость к обезвоживанию сформировалась как ключевое приспособление для выживания на суше у предков наземных растений [1]. В ходе эволюции высших растений по мере усложнения их анатомии, появления механизмов, позволяющих удерживать воду и поддерживать эффективную фиксацию двуокиси углерода, происходило снижение способности выживать при потере воды. Гены, которые на ранних этапах эволюции отвечали за адаптацию к высушиванию всего растительного организма, стали специализироваться на защите только семян и пыльцы. В результате сложилась парадоксальная ситуация: растения, которые страдают от засухи и снижают продуктивность даже при небольшом дисбалансе влагосодержания тканей, на стадии семени способны переносить без повреждения практически полную потерю воды. Потеря этой способности происходит при переходе от этапа прорастания семени к этапу формирования проростка [2]. Несмотря на то, что выявление механизмов устойчивости растений к засухе является актуальной фундаментальной и прикладной проблемой, механизмы, ответственные за переключение программы устойчивости к обезвоживанию при прорастании семян, остаются в значительной степени не исследованными. Целью нашей работы является выявление механизмов, лежащих в основе потери устойчивости к обезвоживанию, наблюдающейся в онтогенезе растений при переходе от стадии семени к стадии проростка. Задача первого этапа работы заключалась в создании экспериментальной модели, позволяющей проводить сравнительный анализ механизмов устойчивости к обезвоживанию у семян *Pisum sativum* L. и формирующихся из них проростков. Семена инкубировали в течение 24, 48 и 72 ч между слоями влажной фильтровальной бумаги, а затем высушивали до исходного уровня влажности. Высушивание семян на разных этапах прорастания, вплоть до видимого проклевывания зародышевого корешка, не приводило к их повреждению. Однако, как только в клетках зародышевого корешка инициировались ростовые процессы (т.н. проклевывание) семена необратимо теряли устойчивость к обезвоживанию. В этот период влагосодержание семядолей достигало 65%, а их водный потенциал увеличивался до -1.12 МПа. Влагосодержание в зародышевых осях до начала проклевывания было равно 83%, а после проклевывания – 87%. На следующем этапе работы мы провели сравнительный анализ биохимических маркеров стресса в зародышевых осях. Инициация роста клеток зародышевого корешка, приводящая к их видимому проклевыванию, приводила в резкому скачку уровня накопленных ТБК-реактивных продуктов (в 2 раза), пероксида водорода (в 1.5 раза) и аскорбиновой кислоты (в 8 раз). Разработанная экспериментальная модель легла в основу выявления генов, белков и метаболитов, экспрессия и содержание которых в тканях проростков меняется при потере устойчивости к обезвоживанию, с использованием транскриптомного, протеомного и метаболомного анализов. Транскриптомный анализ, проведенный с использованием системы высокопроизводительного полногеномного секвенирования Illumina NovaSeq 6000 SP, позволил выявить 24789 генов с ненулевой экспрессией. Анализ дифференциальной экспрессии генов в зародышевых осях после проклевывания по сравнению с зародышевыми осями до проклевывания показал понижение экспрессии 6415 генов (26%) и повышение экспрессии 7465 генов (30%) при пороге р-значения 0.1. Метаболомный анализ продемонстрировал существенные метаболические сдвиги в содержании первичных и вторичных метаболитов.

[1] Smolikova G., Leonova T., Vashurina N., Frolov A., Medvedev S. Desiccation tolerance as the basis of long-term seed viability. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. 22: 101.

[2] Смоликова Г.Н. Потеря устойчивости к обезвоживанию у прорастающих семян *Brassica oleracea* L. с разным содержанием остаточных хлорофиллов. *Труды Карельского научного центра РАН.* 2011. 3: 105.

Работа выполняется за счет средств гранта Российского научного фонда № 20-16-00086 с использованием оборудования РЦ Научного парка СПбГУ «Развитие клеточных и молекулярных технологий», «Вычислительный центр» и «Криогенный отдел».

Механизмы участия триплетного хлорофилла в фотоингибировании фотосистемы 2 высших растений

Неверов К.В.

Институт биохимии им А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия.
neverovk@mail.ru

Фотосинтетический комплекс фотосистемы 2 (ФС 2) высших растений – важнейший пигмент-белковый комплекс тилакоидных мембран, адаптация которого к действию интенсивной солнечной радиации является ключевым механизмом повышения фотосинтетической продуктивности. Фотоингибирование ФС 2 снижает эффективность фотосинтетического электронного транспорта и может приводить к необратимому повреждению ФСА. Считается, что фотоингибирование ФС 2 индуцируется синглетным кислородом ($^1\text{O}_2$), который образуется при переносе энергии с триплетного хлорофилла ($^3\text{Хл}$), возникающего в реакционном центре (РЦ) при рекомбинации ион-радикальной пары $\text{P680}^+\text{Фео}^-$, на молекулярный кислород.

В данной работе исследовались механизмы участия триплетно-возбужденных молекул хлорофилла ($^3\text{Хл}$) в фотоингибировании ФС 2. Фотогенерацию $^3\text{Хл}$ изучали в препаратах ФС 2 люминесцентным методом (регистрация низкотемпературной фосфоресценции и флуоресценции), а также инфракрасной спектроскопии с Фурье-преобразованием (FTIR). В качестве объектов были использованы изолированные РЦ ФС 2 (частицы D1D1-cytb559), способные к фотохимическому разделению зарядов между P680 и феофитином ($\text{P680Фео} \rightarrow \text{P680}^+\text{Фео}^-$), а также более крупные фрагменты - кор-комплексы (комплексы «ядер») ФС 2, содержащие хинонные акцепторы и способные к фотосинтетическому выделению кислорода.

В результате были получены спектры фосфоресценции и флуоресценции Хл «а» при 77 К как в препаратах РЦ, так и в изолированных кор-комплексах ФС 2 с дважды восстановленным хинонным акцептором $\text{Q}_\text{А}$. Фосфоресценция триплетного Хл в обоих типах препаратов имела сходные параметры: максимум при 952-955 нм, полуширину 21,5 нм и время жизни 1.5-1.6 мс. Было установлено, что квантовый выход фосфоресценции Хл в препаратах кор-комплексов ФС 2 с восстановленным $\text{Q}_\text{А}$ в 10 раз ниже, чем в препаратах, изолированных РЦ и в растворах мономерного Хл «а».

Редокс-состояние кофакторов цепи переноса электрона в РЦ ФС 2 сильно влияло на интенсивность фосфоресценции и флуоресценции Хл. Сильное падение как фосфоресценции, так и флуоресценции наблюдалось в препаратах РЦ при добавлении искусственного акцептора электрона силикомолибдата (вызывающим фотонакопление состояния $\text{P680}^+\text{Фео}$), а также в присутствии дитионита (вызывающего фотонакопление восстановленного состояния P680Фео^-). Фосфоресценция $^3\text{Хл}$ не регистрировалась в препаратах кор-комплексов ФС 2 с окисленным $\text{Q}_\text{А}$. Эти данные, вместе с обнаруженным изменением соотношения полос Хл и Фео в спектрах возбуждения флуоресценции препаратов РЦ в окисленном ($\text{P680}^+\text{Фео}$) и восстановленном (P680Фео^-) состояниях указывают на рекомбинационный характер как фосфоресценции, так и флуоресценции. Структура спектров излучения указывает на то, что эмиттером как фосфоресценции, так и флуоресценции является не P680, а мономерный вспомогательный Хл_{D1} в активной ветви кофакторов РЦ. Методом инфракрасной спектроскопии с Фурье-преобразованием были получены фотоиндуцированные разностные спектры в РЦ и кор-комплексах ФС 2, подтверждающие, что триплетное состояние Хл заселяется в результате рекомбинации зарядов в ион-радикальной паре $\text{P680}^+\text{Фео}_{\text{D1}}^-$.

Таким образом, нами впервые показана общность механизма образования $^3\text{Хл}$ в комплексах ФС 2 разного уровня организации. При этом, в результате анализа спектров фосфоресценции и FTIR, в препаратах кор-комплексов ФС 2 была обнаружена фотогенерация триплета Хл другого, конверсионного типа, что указывает на возможность участия этой формы $^3\text{Хл}$, наряду с рекомбинационным триплетом, в индукции фотоингибирования ФС 2.

[1] K.V. Neverov, A.A. Krasnovsky, Jr., A.A. Zabelin, V.A. Shuvalov, A.Ya. Shkuropatov (2015) Photosynth. Research, 125:43–49.

[2] A.A. Zabelin, K.V. Neverov, A.A. Krasnovsky, Jr., V.A. Shkuropatova, V.A. Shuvalov, A.Ya. Shkuropatov (2016) BBA – Bioenergetics 1857: 782–788.

Микроморфологические и биохимические особенности перикарпиев *Malus domestica* Borkh. и его родительского вида *Malus orientalis* Uglitzk.

Кумахова Т.Х.* , Иванова Т.В.** , Воронков А.С.**

* Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева.
Тимирязевская ул., 49, Москва, Россия.

** Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.
Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
tkumachova@yandex.ru

Исследованы некоторые морфологические и биохимические параметры перикарпия близкородственных видов яблони *Malus orientalis* Uglitzk. и *Malus domestica* Borkh. Согласно последним молекулярно-генетическим исследованиям *M. orientalis* сыграла важную роль в формировании генома *M. domestica* в результате ее распространения по “Шелковому пути” из Среднеазиатского региона в Европейский. По данным А.М. Скибинской *M. orientalis* является важнейшим родоначальником большинства европейских опушенных сортов яблони, к которым относится исследованный нами сорт *M. domestica* Ренет Симиренко.

Растения произрастали в горах Северного Кавказа в условиях комбинированного стресса, который характеризуется комплексом разнообразных сочетаний абиотических и биотических факторов. Такие сложные условия произрастания позволили выявить широкую палитру как схожих, так и различных приспособлений у близкородственных видов. Установлено, что перикарпий *M. orientalis* покрыт сплошным слоем кутикулы (18.96 ± 2.76 мкм) достоверно большей толщины относительно *M. domestica* (11.72 ± 1.44 мкм), поэтому плод первой более защищен от потери влаги. При этом сколь либо заметных отличий в размерах клеток и накоплении ими фенольных соединений (протекторных веществ от UV излучения) обнаружено не было. Можно предположить, что эти параметры остались константными и не были затронуты селекцией, так как они крайне важны для адаптации *Malus* к условиям комбинированного стресса в горах.

Значительные отличия между исследованными видами были установлены в композиции жирных кислот (ЖК) суммарных липидов наружных тканей и паренхимы перикарпия. Липиды наружной части перикарпия *M. domestica* и *M. orientalis* представлены 19 и 15 (соответственно) видами индивидуальных C_{12-24} ЖК. В обоих объектах главными были пальмитиновая ($C_{16:0}$), стеариновая ($C_{18:0}$), олеиновая ($C_{18:1\Delta 9}$), линолевая ($C_{18:2\Delta 9,12}$) и α -линоленовая ($C_{18:3\Delta 9,12,15}$), а в липидах *M. orientalis* также и арахидоновая ($C_{20:0}$) кислоты. При этом относительное содержание $C_{16:0}$ было приблизительно одинаковым в липидах *M. domestica* и *M. orientalis*, содержание $C_{18:0}$ и $C_{18:1\Delta 9}$ в липидах *M. domestica* ~ в 2 раза было ниже, чем в липидах *M. orientalis*, а содержание $C_{18:2\Delta 9,12}$ и $C_{18:3\Delta 9,12,15}$ почти в 2 раза выше. Более высокое содержание диеновых и триеновых ЖК в липидах наружной части перикарпия *M. domestica*, чем у *M. orientalis*, влечет за собой более высокое значение индекса ненасыщенности (ИН) (1.432 и 0.902 соответственно). Липиды наружной части перикарпия *M. orientalis* отличались достаточно высоким содержанием ЖК с очень длинной цепью (ЖКОДЦ). Их суммарное содержание достигало 15.6% от всех ЖК, тогда как в липидах *M. domestica* ЖКОДЦ составляли только 1.7% от общего количества. В липидах паренхимы перикарпия *M. domestica* нами было идентифицировано 13 видов C_{12-20} ЖК, а в липидах *M. orientalis* 18 видов C_{14-24} ЖК. Нужно отметить, что относительное содержание $C_{18:2\Delta 9,12}$ и $C_{18:3\Delta 9,12,15}$ в паренхиме перикарпия *M. orientalis*, так же, как и в наружной части, было почти в 2 раза ниже этого показателя у *M. domestica*. По содержанию $C_{18:0}$ и $C_{18:1\Delta 9}$ можно говорить об их многократном превышении у *M. orientalis*. ЖКОДЦ в липидах паренхимы *M. orientalis* составляли 4.4% от суммы всех ЖК, среди которых доминировали $C_{20:0}$ и $C_{22:0}$. Такое распределение ЖК в липидах паренхимы перикарпия приводит к более высокому значению ИН у *M. domestica* относительно *M. orientalis* (1.73 и 1.115 соответственно). Особенно контрастными выглядят показатели ИН и содержание ЖКОДЦ. У *M. orientalis* в околоплоднике обнаружено более низкое содержание полиненасыщенных ЖК относительно *M. domestica*. И напротив, доля ЖКОДЦ у *M. orientalis* в наружных тканях (эпидерма + гиподерма) выше, чем у *M. domestica*. При всем отличии в составе ЖК, обуславливающих разительное отличие в ИН *Malus*, нельзя не отметить очень высокую его корреляцию (коэффициент корреляции, $r \approx 1$) значений в наружных слоях и паренхиме между двумя видами. Из данного факта можно заключить, что перераспределение в количестве насыщенных и ненасыщенных ЖК липидов в тканях и между ними носит закономерный, физиологически обусловленный для *Malus* характер.

Таким образом, вследствие специфики состава ЖК, обуславливающего высокий ИН, *M. domestica* более устойчива к комбинированному стрессу (вариативность температуры и водного режима) на биохимическом уровне. Однако *M. orientalis*, имеющая более толстую кутикулу, лучше приспособлена к подобным стрессовым воздействиям в анатомическом плане. С другой стороны, в липидах *M. orientalis* содержится высокое количество ЖКОДЦ, которое, вероятно, препятствует разрастанию перикарпия за счёт увеличения количества клеток, регулируя их пролиферацию, но при этом способствует большей устойчивости к грибным болезням – свойству, которое снизилось селекцией у *M. domestica*. Выявленный комплекс отличительных признаков мы связываем с селекционным процессом: *M. domestica* приобрела особенности липидного состава, обеспечивающие её большую холодо- и засухоустойчивость, однако потеряла резистентность к грибным болезням по сравнению с *M. orientalis*.

Моделирование пространственной структуры белков цитокининового метаболизма картофеля

Архипов Д.В., Ломин С.Н., Романов Г.А.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
hotdogue@yandex.ru

Биосинтез, трансформация и распад цитокининов – гормонов, участвующих в регуляции целого спектра важнейших функций растительного организма, катализируются несколькими группами ферментов. Изопентенилтрансферазы (ИПТ) являются ферментами, катализирующими первую в цепи биосинтеза цитокининов реакцию. Аденилат-изопентенилтрансферазы катализируют присоединение диметилаллил пирофосфата (DMAPP) к АТФ, АДФ или АМФ с образованием изопентенил-5'-аденозинфосфатов (iPRTP, iPRDP и iPRMP). тРНК-изопентенилтрансферазы катализируют реакцию образования пренил-тРНК, субстратами в этой реакции являются DMAPP и транспортная РНК. Пренил-тРНК служит субстратом для дальнейших реакций, в результате которых образуется *цис*-зеатин. Цитокинин *транс*-гидролазы CYP735A катализируют реакции превращения изопентенил-5'-аденозинфосфатов в *транс*-зеатин-5'-аденозинфосфаты. Цитокинин рибозид 5'-монофосфат фосфорибогидролазы (LOG) катализируют реакции превращения цитокинин-рибозидов в свободные (активные) формы цитокининов. Цитокинин оксидазы/дегидрогеназы (СКХ) катализируют распад цитокининов на аденин и боковую цепь.

Молекулярные структуры ферментов биосинтеза и метаболизма цитокининов активно исследуются, в том числе с применением рентгеноструктурного анализа кристаллов этих белков. Однако к настоящему моменту удалось получить кристаллы далеко не всех вышеуказанных ферментов. В таком случае для изучения структуры белка можно применить современные методы молекулярного моделирования.

Методом молекулярного моделирования по гомологии мы определили пространственные структуры следующих белков цитокининового метаболизма: аденилат-изопентенилтрансферазы картофеля StIPT1a (апоформы и формы, связанной с двумя субстратами – АТФ и DMSPP – структурным аналогом DMAPP), тРНК-изопентенилтрансферазы картофеля StIPT2 (в комплексе с т-РНК, DMSPP и кофакторами Mg^{2+} и Zn^{2+}), *транс*-гидролазы картофеля StCYP735A (в связанном с молекулой Гема состоянии и в апо-форме), гомодимера цитокинин рибозид 5'-монофосфат фосфорибогидролазы картофеля StLOG1a и цитокинин оксидазы/дегидрогеназы картофеля StCKX1a (в комплексах с кофактором (ФАД) и различными цитокининами: iP, tZ, и BA).

Подробно описаны особенности структуры полученных моделей белков, расположение активных сайтов и олигомеризационных интерфейсов, в частности показано ключевое отличие структуры StIPT1a от StIPT2, позволяющее последней связываться с молекулой тРНК. Так, в структуре StIPT2, в середине белка и на С-конце, обнаружены две вставки, образованные несколькими α -спиралями (а также небольшой β -структурой в С-концевой вставке) и отсутствующие у StIPT1a. По всей видимости, именно эти вставки служат для взаимодействия с тРНК. Определены ключевые аминокислоты взаимодействия белков с субстратами, аминокислоты, являющиеся «горячими точками» межбелковых интерфейсов (для StLOG1a), элементы структуры и входящие в них аминокислоты, отвечающие за связывание с тРНК (для StIPT2). Показаны ключевые отличия в связывании StCKX1a с различными цитокининами: iP, tZ, и BA. В связывании iP и tZ принимают участие четыре аминокислотных остатка, BA взаимодействует помимо этих остатков еще с четырьмя. Asp181 StCKX1a образует водородную связь с лигандом, остальные аминокислоты образуют гидрофобные контакты, также все три лиганда имеют контакты с ФАД. Получены расчетные данные об энергиях взаимодействия моделируемых белков с лигандами, нуклеиновыми кислотами и белками-партнерами (при гомодимеризации). Проведен белок-лигандный докинг StLOG1a и iPRMP. Для гомодимера StLOG1a также описаны свойства поверхности димеризационного интерфейса. Центр интерфейса взаимодействия составляет гидрофобное ядро, окруженное гидрофильными периферическими участками. Профили гидрофобности и электростатического потенциала интерфейса взаимодействия субъединиц (при pH = 7.5) в основном комплементарны. Зона интерфейса является наиболее консервативной частью поверхности StLOG1a.

Молекулярное моделирование позволило получить базовые представления о структурных особенностях функционирования белков цитокининового метаболизма картофеля на всех ключевых этапах и о структурных детерминантах межмолекулярных взаимодействий в ходе биосинтеза, трансформации и распада цитокининов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-74-20181.

Морфологические и функциональные изменения у растений при нарушении кальциевого гомеостаза

Будаговская Н.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. Ленинские горы, 1, Москва, Россия.
postnabu@mail.ru

Растения могут испытывать дефицит кальция при выращивании на кислых почвах. В этих условиях происходит усиление поглощения растениями алюминия, который блокирует кальциевые каналы. Снижение проводимости кальциевых каналов вызывает нарушение кальциевого гомеостаза, а также нарушения в процессах сигнализации, что может приводить к дестабилизации функциональной активности растений. Так как токсическое действие алюминия на растения не ограничивается лишь блокированием кальциевых каналов, то для вычленения этой составляющей его негативного влияния на функциональную активность растений были проведены модельные эксперименты с использованием блокатора кальциевых каналов верапамила. Исследовалось влияние блокирования кальциевых каналов на морфологические и функциональные изменения у растений пшеницы, кукурузы, риса, гречихи и гороха. Показано, что при выращивании растений в присутствии блокатора кальциевых каналов, внесенного в корневую зону, происходит формирование морфотипа растений, отличного от морфотипа растений контрольного варианта. У растений варианта с верапамилом затормаживается развитие побегов и корневой системы. В присутствии верапамила у растений формируются укороченные побеги с мелкими листьями и меньшим их количеством по сравнению с растениями контрольного варианта. Корневая система растений опытного варианта развита слабее, чем у контрольных растений. При длительном выращивании растений в присутствии верапамила отмечается пожелтение и позже подсыхание концов листьев, появление некрозов на листовых пластинках, желтеют и в дальнейшем ослизируются корни. При продолжительном действии верапамила на растения снижается тургор листьев и стеблей, что указывает на нарушение водного обмена. Верапамил вызывает снижение водонагнетающей активности корней. При увеличении времени действия блокатора кальциевых каналов или при повышении его концентрации водонагнетающая активность корней прекращается вследствие нарушения их структурной целостности, вызванной дефицитом кальция. Растения варианта с верапамилом имеют более низкую скорость роста, чем растения контрольного варианта. Скорость роста растений обратнопропорциональна концентрации верапамила: с увеличением концентрации верапамила скорость роста растений снижается, при высокой концентрации блокатора кальциевых каналов рост растений прекращается. Таким образом, вызванное блокированием кальциевых каналов снижение скорости роста растений, а также специфические морфологические изменения побегов и корней могут быть обусловлены нарушениями в функционировании кальций-зависимой сигнальной сети, дефицитом кальция, снижением водонагнетающей активности корней.

Накопление и распределение цинка у исключателей и гипераккумуляторов семейства Brassicaceae

Серегин И.В.* , Кожевникова А.Д.* , Схат Х.**

* Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.

** Свободный Университет, Амстердам, Нидерланды.
ecolab-ipp@yandex.ru

Растения могут накапливать металлы, причем их содержание в тканях и органах растений может во много раз превышать их содержание в окружающей среде. Решение проблемы избирательного накопления металлов в отдельных клетках, тканях и органах растений важно как для понимания механизмов токсического действия металлов и путей их детоксикации, так и для изучения феномена гипераккумуляции, исследование которых является насущной задачей экологической физиологии растений. По способности к аккумуляции металлов выделяют две контрастные группы растений: исключатели, у которых тяжелые металлы накапливаются главным образом в корневой системе, и (гипер)аккумуляторы, у которых они накапливаются в больших количествах в надземных органах. В работе проведены комплексные исследования по анализу способности гипераккумуляторов (*Arabidopsis halleri*, *Noccaea japonicum*, а также 28 экотипов *Noccaea caerulescens*) и исключателей (*Capsella bursa-pastoris*, *Lepidium ruderae*, *Microthlaspi perfoliatum*, *Thlaspi arvense*) из семейства Brassicaceae накапливать цинк (Zn). Семена, собранные с растений, произрастающих на ультраосновных (серпентиновых), каламиновых или неметаллоносных почвах, а также в лабораторных условиях, проращивали в климатической камере (20°C/15°C день/ночь, 14-часовой световой день, влажность – 75%). Растения выращивали в тех же условиях в гидропонике на 0.5 N раствора Хогланда в течение 6-8 недель в присутствии соли Zn в разных концентрациях [2 – 2750 мкМ (*A. halleri*); 2 – 5750 мкМ (*N. caerulescens*); 2 – 2250 мкМ (*N. japonicum*); 2 – 250 мкМ (*M. perfoliatum* и *T. arvense*); 2 – 80 мкМ (*L. ruderae* и *C. bursa-pastoris*)]. Содержание Zn определяли методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии, а его распределение по тканям корней и побегов растений некоторых экотипов *N. caerulescens*, а также у *T. arvense*, *L. ruderae* и *C. bursa-pastoris* – гистохимическими методами с использованием индикаторов Zincon и Zinpyr-1 (Zn). Содержание Zn в побегах *N. caerulescens*, *N. japonicum* и *A. halleri* было выше, чем у других видов. Вариация по способности накапливать Zn между экотипами *N. caerulescens* с каламиновых почв была значительно выше, чем между экотипами с ультраосновных почв и между экотипами с неметаллоносных почв, что является отражением генетических различий, которые позволили, в конечном счете, растениям, изначально произрастающим на неметаллоносных почвах, освоить металлоносные почвы *de novo*. У всех изученных видов Zn был найден во всех тканях корня и накапливался в растущем участке корня, примордиях боковых корней и в корневых волосках. В клетках коры Zn выявлялся преимущественно в апопласте, а в перидерме, эндодерме, флоэме и ксилемной паренхиме – также в протопластах клеток. В побегах Zn выявлялся во всех тканях, преимущественно в проводящих пучках, а также в клеточных оболочках и протопластах клеток эпидермы, включая трихомы у *C. bursa-pastoris* и *L. ruderae*. Содержание Zn в замыкающих и основных клетках эпидермы *N. caerulescens* было значительно выше, чем в побочных клетках устьичного комплекса, что, вероятно, может быть связано с гетерогенностью локализации соответствующих транспортеров. В верхней эпидерме указанные различия были выражены в меньшей степени, чем в нижней эпидерме, что отчасти может быть связано с разной интенсивностью транспирации. Даже при очень высоком содержании Zn в эпидермальных клетках *N. caerulescens*, его содержание в мезофилле было существенно ниже и признаков хлороза не наблюдалось, что позволяет рассматривать накопление Zn в эпидерме гипераккумуляторов как очень эффективный механизм его детоксикации. Высокая эффективность механизмов детоксикации Zn в побегах гипераккумуляторов является одной из причин их высокой конститутивной устойчивости к этому металлу. Содержание Zn в побегах растений *N. caerulescens* экотипа St-Laurent-le-Minier (Южная Франция) из природной популяции и выращенных на гидропонике при 200-1600 мкМ Zn было сходным и составляло около 12-15 г/кг сухой массы. Распределение Zn по тканям листа растений, собранных в природной популяции и выращенных на гидропонике, также было сходным, что свидетельствует как о применимости этих гистохимических методов для оценки распределения Zn в растениях из природных популяций, так и о возможности экстраполяции полученных в лаборатории данных о закономерностях распределения Zn на растения природных популяций.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 21-14-00028 (анализ накопления Zn у *Arabidopsis halleri*, *Noccaea caerulescens* и *Microthlaspi perfoliatum*), при частичной поддержке РФФИ № 19-04-00369 (анализ накопления и распределения Zn у *Capsella bursa-pastoris*, *Lepidium ruderae* и *Thlaspi arvense*) и Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания (тема №121040800153-1) (анализ накопления Zn у *Noccaea japonicum*).

Некоторые аспекты организации занятий малого практикума по физиологии растений при дистанционном обучении

Коробко В.В., Касаткин М.Ю., Хачатуров Э.Г.

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г.Чернышевского, ул. Астраханская, 83, Саратов, Россия.
v.v.korobko@mail.ru, kasatkin.my@mail.ru

Для формирования необходимых компетенций у студентов большую значимость имеют лабораторные работы, выполняющиеся при очном обучении на практических занятиях, во время которых обучающиеся совершенствуют свои умения и навыки проведения экспериментальных исследований, закрепляют теоретические знания, полученные на лекциях и при самостоятельной работе. Одна из проблем, с которой мы столкнулись при переходе на дистанционную форму обучения, – это невозможность выполнения студентами лабораторных работ. Поскольку, по нашему мнению, этот вид учебной деятельности является значимой частью изучения физиологии растений и не может быть равноценно заменен на письменные работы, тестовые задания и т.п., мы приняли решение создания виртуальных лабораторных работ по ряду тем.

Организация лабораторных работ, как правило, осуществляется с применением следующих методик: удаленных лабораторий; виртуальных лабораторий и тренажеров; удаленных виртуально-физических лабораторий; лабораторного комплекта для дома. Наиболее оптимальным является использование специальной программной среды, реализующей функции виртуальной лаборатории, позволяющей проводить виртуальные эксперименты удаленно или на компьютерах обучающихся. Основной проблемой применения данного типа организации учебного процесса является поиск или разработка специального оборудования и программного обеспечения, его апробация, запуск и внедрение, что требует существенных финансовых и временных затрат.

Нами был проведен подбор комплекса лабораторных работ для реализации курса физиологии растений с возможностью использования для удаленных лабораторий, лабораторного комплекта для дома или онлайн семинарских занятий. Разработанные нами методические рекомендации проведения лабораторных работ состоят из вводной статьи, в которой изложена в краткой форме информация, необходимая для выполнения работы; описания методики проведения работы (необходимое оборудование, соблюдение требований по технике безопасности, ход работы), снабженной фотографиями, рисунками, схемами; фотографий результатов проведенного исследования; заданий, которые необходимо выполнить на основании результатов. Дополнительно предоставлены справочные материалы, необходимые для выполнения работы.

Основная идея заключается в предоставлении студентам наглядных результатов экспериментов для самостоятельного анализа. Тем самым, жертвуя методическим этапом проведения физиологического эксперимента, мы позволяем проводить анализ полученных данных, практически не отличающихся по наглядности от оценки результатов опыта при физическом присутствии в лаборатории.

Изучение водного режима растений начинается с изучения явления плазмолиза. В качестве результатов эксперимента при определении осмотического давления клеточного сока плазмолитическим методом студентам были предложены фотографии препаратов, представляющих собой фрагменты эпидермиса лука репчатого (*Allium cepa*), помещенные в растворы различных концентраций осмотически активного вещества. Для того чтобы сделать работу более интересной и максимально приближенной к реальности, а также исключить возможность списывания ответов, студентам были предложены различные варианты результатов работы, которые отличались по используемому осмотику (например, сахарозы и NaCl), по температуре окружающей среды. Студенты определяли состояние клеток на фотографиях, рассчитав осмотическое давление в клетках согласно заданным условиям. Оформление хода лабораторной работы предполагает краткий конспект, вычисления, рисунок плазмолизованных клеток, снабженный пояснительными надписями, вывод о зависимости состояния клетки от концентрации внешнего раствора.

Закрепление полученных знаний может быть осуществлено посредством решения физиологических задач, решение которых в дистанционном режиме было организовано следующим образом: студенты начинали решать задачу одновременно, после решения присылали ответ в чат или на почту преподавателю. Если студенты испытывали затруднения, им был предложен поэтапный алгоритм решения с правильным ответом. Если и этого было недостаточно, задачу разбирали все вместе и публиковали поэтапное решение в чате.

Данная методика, безусловно, не может полностью заменить лабораторные работы, значение которых нельзя недооценивать. Тем не менее, в определенных ситуациях такая форма реализации практических занятий позволяет полноценно осуществлять учебный процесс, ориентироваться на технические возможности студента, применять дифференцированный подход при выборе заданий.

**Неоднородность изменений pH цитозоля клеток различных зон корня трансгенных растений
Nicotiana tabacum L. в условиях засоления и засухи**

Агеева М.Н., Косарева А.В., Брилкина А.А., Веселов А.П.

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
пр. Гагарина, 23 к. 1, Нижний Новгород, Россия.
ageyevamaria@gmail.com

Засоление и засуха являются неблагоприятными факторами, существенно снижающими урожайность культурных растений. Одним из компонентов генерации ответа на эти стрессоры является уровень pH цитозоля. Ввиду разницы функций и особенностей метаболизма различных клеток растений изменение уровня pH цитозоля или их отсутствие в условиях стресса может проявляться у одних типов тканей и не проявляться у других. В литературе мы не встретили систематизированных данных об изменениях pH или их отсутствии в разных органах и тканях растений в условиях засоления и засухи.

Целью работы стало определение изменений pH цитозоля в разных зонах корня трансгенных растений табака обыкновенного при засолении и засухе.

Табак (*Nicotiana tabacum* L.), экспрессирующий в цитозоле чувствительный к pH флуоресцентный белок Pt-GFP, был трансформирован в Университете Лобачевского при участии Института физиологии растений РАН. Растения выращивали на среде Мурасиге-Скуга (МС) в течение 14 дней на свету (фотопериод 16/8, интенсивность освещения 55,5 мкМ м-2 с-1) при температуре 25 °С. Условия засоления создавали путём внесения в питательную среду МС 75 мМ NaCl. При изучении pH цитозоля в ответ на засуху 13-дневные растения табака, выращенные на среде МС *in vitro*, на 16 часов оставляли без крышки. В качестве контроля использовались 14-дневные растения, выращенные на МС *in vitro* с закрытой крышкой. Для всех растений получали LSM-изображения при возбуждении 405 нм и 488 нм на конфокальном микроскопе Carl Zeiss LSM 710 на базе инвертированного микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия) и обрабатывали в программе ZEN 2011 SP4 (black) 11.0. Для проведения LSM-микроскопии вырезали тонкие пластинки МС-агара с 14-дневными проростками, которые зажимали между стекол, оставляя побег на поверхности стекла. У всех растений определяли pH цитозоля в клетках чехлика, зоны растяжения, ризодермы и коры зоны всасывания. Для установления значения pH в клетках проводили получение зависимости флуоресценции Pt-GFP в растении от pH. Для этого готовили буферные растворы с pH 4,5-8,5 (с шагом 0,5), в которых замачивали трансгенные растения на ночь перед проведением LSM-микроскопии.

В клетках корневого чехлика при засолении произошло защелачивание по сравнению с контролем, а в условиях засухи – закисление. В клетках зоны растяжения, в обоих случаях уровень pH увеличился. В клетках ризодермы зоны всасывания произошло защелачивание, в то время как при засухе изменений уровня pH цитозоля мы не обнаружили. В клетках коры зоны всасывания корня в условиях засухи и засоления значения pH не изменился.

В условиях засоления и засухи клетки растений могут испытывать недостаток воды, который может оказывать влияние на уровень pH цитозоля. Но, согласно, полученным нами данным, у клеток чехлика и клеток ризодермы, эффект, оказанный на pH цитозоля, оказался противоположным, что может быть связано с дополнительным влиянием повышенной концентрации натрия в среде при засолении.

Таким образом, различные клетки корня изменяли уровень pH неоднородно и в условиях засухи, и в условиях засоления.

Исследование выполнено при частичной поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-00614 А.

О возможности применения экспресс-анализатора SPAD 502 Plus для определения содержания хлорофилла в листьях с признаками межжилкового хлороза

Мамаев А.В., Шибалева Т.Г., Шерудило Е.Г.

Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр РАН». Пушкинская, 11, Петрозаводск, Россия.
adgsn@yandex.ru

Измерение содержания хлорофилла, как основного фотосинтетического пигмента, используется для оценки физиологического состояния листьев, на которое влияют различные природные и антропогенные факторы. Распространенные методы спектрофотометрического определения содержания хлорофилла в экстрактах из листьев предполагают деструкцию листьев, что не позволяет оценить изменения в содержании хлорофилла в одних и тех же листьях с течением времени. С недавнего времени появились оптические приборы, позволяющие быстро и без повреждения листьев определять в них содержание хлорофилла. Одним из широко применяемых в науке и практике растениеводства экспресс-анализаторов хлорофилла (chlorophyll meter) является SPAD 502 Plus (Konica Minolta, Япония). Принцип измерения основан на определении разности спектрального поглощения хлорофиллом в двух диапазонах спектра – красном (650 нм), который совпадает со спектральной областью, связанной с максимальной активностью хлорофилла, и инфракрасном (940 нм), который используется в качестве компенсации двух факторов – содержания влаги и толщины листа. Прибор также широко используется в качестве N-тестера, так как исследования показали высокую корреляцию между измерениями и содержанием азота в листьях. Несмотря на все преимущества применения недеструктивных способов определения содержания хлорофилла в листьях, существует и ряд ограничений. Известно, что различия в морфологии и структуре листьев, а также неравномерное распределение хлорофилла в листовой пластинке могут накладывать ограничения на использование тех или иных индексов содержания хлорофилла, измеренных с помощью оптических приборов. В таких случаях требуется проверка уравнений калибровки, используемых для перевода показаний приборов в значения содержания хлорофилла.

В нашей работе мы провели проверку применимости экспресс-анализатора хлорофилла SPAD 502 Plus для определения содержания хлорофилла в листьях с признаками межжилкового хлороза. Межжилковый хлороз возникает у растений в результате дефицита железа, цинка, магния или азота, а также как результат фотоповреждения листьев в условиях избыточного освещения. В последнем случае хлоротичные (пятнистые) листья характеризуются очень неравномерным распределением хлорофилла в листовой пластинке.

С помощью экспресс-анализатора хлорофилла SPAD 502 Plus определяли индекс содержания хлорофилла (chlorophyll content index, CCI). В этих же листьях содержание хлорофиллов *a* и *b* в экстракте 96%-ным этиловым спиртом определяли с помощью спектрофотометра СФ-2000 (Спектр, Россия).

В качестве объектов исследования использовали листья томата (*Lycopersicon esculentum* L.) с двумя типами хлороза. В первом случае листья характеризовались разной степенью равномерного хлороза в результате азотного голодания. Значения CCI (показания SPAD 502 Plus) у них варьировали от 18.7 до 57.8, а реальное содержание хлорофиллов от 0,010 до 0,043 мг/см². Во втором случае листья имели разную степень фотоповреждения в виде межжилкового пятнистого хлороза в результате выращивания растений в условиях круглосуточного освещения. Значения CCI у них варьировали от 5.6 до 50, а реальное содержание хлорофиллов от 0,001 до 0,034 мг/см².

В обоих случаях регрессионные уравнения связи между значениями CCI и реальным содержанием (мг/г и мг/см²) хлорофилла *a*, хлорофилла *b* и суммарным содержанием хлорофиллов *a* и *b* имели высокие коэффициенты детерминации. То, что оценка содержания хлорофилла с помощью SPAD 502 Plus в листьях с разной степенью азотного голодания имела хороший результат, неудивительно и было неоднократно подтверждено другими авторами. А вот достаточно точная оценка содержания хлорофилла в фотоповрежденных листьях с пятнистым хлорозом скорее неожиданна, так как многие авторы отмечали менее точную оценку содержания хлорофилла ручными приборами – измерителями абсорбции в случае неравномерного распределения хлорофилла из-за «эффекта сита» (“sieve effect”).

Регрессионный анализ показал, что нелинейная модель лучше описывала взаимосвязь между значениями CCI и содержанием хлорофилла на единицу площади (мг/см²), чем между значениями CCI и содержанием хлорофилла на единицу массы (мг/г). Хотя в обоих случаях коэффициенты детерминации (R^2) для листьев, подверженных азотному голоданию и круглосуточному освещению, были высоки: $R^2 = 0,87$ и $0,90$ для содержания хлорофилла на единицу площади; $R^2 = 0,82$ и $0,89$ для содержания хлорофилла на единицу массы листа.

Таким образом, экспресс-анализатор хлорофилла SPAD 502 Plus может быть эффективным инструментом для относительной оценки содержания хлорофилла в листьях с пятнистым межжилковым хлорозом. Однако, точность измерения хлорофилла с помощью SPAD 502 Plus выше для оценки содержания хлорофилла на единицу площади листа, чем на единицу массы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-016-00033а и из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0218-2019-0074).

О роли интеграла дневного освещения в реакциях растений на круглосуточное освещение

Шибаета Т.Г., Мамаев А.В., Шерудило Е.Г., Титов А.Ф.

Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр РАН». Пушкинская, 11, Петрозаводск, Россия.
shibaeva@krc.karelia.ru

Выращивание растений в условиях интенсивной светокультуры, на так называемых «фабриках растений», позволяет производить свежую продукцию в непосредственной близости от потребителей в мегаполисах и выращивать лекарственные растения с «заданными свойствами» для нужд фармацевтической промышленности. Развитие этого направления во многом связано с появлением новых энергосберегающих технологий, используемых для освещения растений (например, применение светодиодных источников света с разным спектральным составом). Одна из таких технологий подразумевает управление ростом и развитием растений с помощью оптимального распределения в суточном цикле интеграла дневного освещения (ИДО, «суммарного освещения»). Выращивание растений в условиях круглосуточного освещения (КО) при относительно невысокой плотности потока фотонов потенциально считается одним из способов экономии ресурсов, повышает продуктивность растений и позволяет избежать лишнего воздействия на растения экологически вредных химических препаратов (ретардантов и фунгицидов). Тем не менее, использование КО в исследованиях и на практике имеет свои сложности. У ряда видов КО вызывает фотоповреждения листьев и приводит к снижению фотосинтетической активности и продуктивности. До сих пор нет однозначного мнения о причинах этих явлений. Одни авторы считают, что в противоположность обычному фотопериоду, КО обеспечивает непрерывное поступление световой энергии для фотосинтеза, постоянное фотоокислительное воздействие, сигнальное воздействие на фоторецепторы и возникает несоответствие между частотой внутренних (циркадных) биоритмов и внешним циклом свет/темнота (циркадная асинхрония). Другие же авторы полагают, что энергетический компонент более важен, чем сигнальный, и приводят доводы в пользу того, что причиной повреждения является избыточная суммарная световая энергия в результате увеличения фотопериода. Целью нашей работы было выявить роль ИДО в реакциях растений на КО. Для этого провели эксперименты на разных видах растений, отличающихся по устойчивости к КО с применением разных по длительности фотопериодов и уровней освещенности, обеспечивающих одинаковые или разные значения ИДО.

Объектами исследования служили чувствительные к КО растения томата (*Solanum lycopersicum* L.) и огурца (*Cucumis sativus* L.) и более устойчивые растения сладкого перца (*Capsicum annuum* L.). Растения выращивали методом песчаной проливной культуры в камерах искусственного климата при температуре 23°C, влажности воздуха 70% при поливе полным питательным раствором. В первой серии экспериментов одну группу растений выращивали при фотопериоде 14 ч и освещенности 286 мкмоль/(м²·с) ФАР, другую группу – при фотопериоде 24 ч и освещенности 167 мкмоль/(м²·с) ФАР. В обоих случаях интеграл дневного освещения (ИДО) составлял 14,4 моль/(м²·сут). Во второй серии опытов интенсивность освещения была уменьшена до 178 и 104 мкмоль/(м²·с) ФАР, соответственно, так что ИДО при фотопериодах 14 ч и 24 ч составлял 9 моль/(м²·сут). В третьей серии опытов растения выращивали при одинаковой интенсивности света 150 мкмоль/(м²·с) ФАР и фотопериодах 16 и 24 ч. ИДО, соответственно, составлял 8.6 и 13 моль/(м²·сут).

Результаты опытов с разным ИДО показали, что в условиях КО у растений томата и огурца наблюдается эпинастия листьев и происходят изменения в пигментном комплексе (уменьшение содержания хлорофиллов, увеличение соотношения хлорофиллов *a/b*, редукция ССК), направленные на снижение поглощения света фотосинтетическим аппаратом. Происходящие при этом фотоповреждения проявляются в форме межжилкового хлороза у листьев томата и огурца. У перца снижения содержания хлорофиллов не происходило, наоборот, отмечено даже некоторое его увеличение, однако листья имели деформации в виде морщинистости. У всех трех видов круглосуточное освещение приводило к снижению значений потенциального (F_v/F_m) и реального (Φ) квантового выхода фотохимической активности ФС II. В результате увеличения ИДО при 24 ч фотопериоде наблюдалось ускорение развития растений.

В опытах с одинаковым ИДО растения, подвергавшиеся действию 24 ч фотопериода, выращивались при более низкой освещенности, чем растения при 14 ч фотопериоде. Тем не менее, они демонстрировали схожие признаки повреждения листьев и окислительного стресса, хотя они и были менее выражены. Растения, выращиваемые при 14 ч фотопериоде, фотоповреждений или снижения фотосинтетической активности не имели, несмотря на такую же полученную «дозу световой энергии». Учитывая, что величина ИДО в условиях КО составляла 9 или 14.4 моль/(м²·сут), что намного ниже уровня, рекомендуемого для коммерческого выращивания изучаемых культур – 20-30 моль/(м²·сут), логично полагать, что деградация хлорофилла и другие нарушения являются реакцией на длительный фотопериод, а не на поступление избыточной световой энергии. Полученные результаты показывают, что у чувствительных видов КО вызывает негативные реакции даже в отсутствие избыточности поступающей световой энергии, при низких значениях ИДО. Эти данные служат доказательством того, что сигнальный компонент (циркадная асинхрония) играет важную роль в механизмах реакции растений на круглосуточное освещение.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-016-00033а и из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦРАН (0218-2019-0074).

Окислительный гомеостаз и антиоксидантный статус прорастающих семян гороха (*Pisum sativum* L.) и пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в зависимости от дозы органического удобрения

Тарасов С.С.* , Веселов А.П. , Крутова Е.К.* , Шестеркина И.А.* , Михалёв Е.В.* , Малишевский М.Р.***

* Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия. Гагарина пр., 97, Нижний Новгород, Россия.

** Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Гагарина пр., 23, Нижний Новгород, Россия.
tarasov_ss@mail.ru

Применения органических удобрений становится наиболее важным и актуальным в связи с вступлением в силу в 2020 году Федерального закона №280 «Об органической продукции и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации» Во взаимосвязи с распоряжением Правительства РФ от 25.01.2018 № 84-р "Об утверждении Стратегии развития промышленности по обработке, утилизации и обезвреживанию отходов производства и потребления на период до 2030 года" важной задачей современной науки является разработка, создание и исследования технологий эффективной утилизации отходов АПК. Одним из стратегических отраслей сельского хозяйства можно считать грибоводство. Несмотря на то, что сырье для производства грибов является отходом растениеводства и лесной промышленности, сама по себе отрасль так же имеет отходы. Отходы грибоводства можно использовать для получения органических удобрений. Влияние органики на растения до конца не исследовано, особенно остаётся открытым вопрос о действии дозы органических удобрений на уровень содержания окисленных метаболитов, активность антиоксидантных ферментов и экспрессии их генов в начальный период онтогенеза растений. Особый интерес представляют растения, считающиеся «органофилами», в том числе пшеница и «органофобами», например горох. На основании изложенного целью нашей работы явилось исследовать влияние разных доз органического удобрения на основе отработанного соломенного субстрата вешенки на уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ), окислительной модификации белков (ОМБ) активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, пероксидазы и экспрессию их генов прорастающих семян гороха (*Pisum sativum* L.) и пшеницы (*Triticum aestivum* L.).

Удобрение готовили путем экстракции сухого вещества в воде на шейкер инкубаторе, с последующим разделением твёрдой и жидкой фазы. Сухое вещество получали путём просушивания в течении 24 часов в сушильном шкафу при температуре 105 °С.

Исследования проводили на 3х группах гороха и пшеницы: одна контрольная – культивируемые на водопроводной воде и две опытные выращенные на 10% и 100% растворе органического удобрения. В суточных прорастающих семенах и недельных проростках определяли содержание малонового диальдегида (МДА); уровень окислительной модификации белков с помощью 2,4-динитрофенилгидрозина; активность СОД, каталазы, пероксидазы и экспрессию генов: Cu/Zn SOD, Mn SOD, Fe SOD, CAT и POX. Подбор праймеров для определения количества транскриптов по кодирующему участку гена осуществляли в программе Primer-BLAST Эксперимент проводился в 3-х биологических и 3-х биохимических повторностях. Результаты обработаны статистически, с расчётом среднее арифметическое (M) и стандартные отклонения (σ) с использованием программы Microsoft Excel 2010.

Семена гороха, культивируемые в течение суток на 10 и 100% органическом удобрении наблюдалось увеличение содержания продуктов ПОЛ и ОМБ, через 7 суток проростки выращенные на 10% органическом удобрении показали снижение содержания окисленных метаболитов, а на 100% удобрении остались выше контроля. У пшеницы зафиксировано снижение уровня ПОЛ и ОМБ в семенах и проростках, культивируемых на 10% растворе органического удобрения и увеличение содержания окисленных метаболитов в образцах, выращенных на 100% растворе.

В прорастающих семенах пшеницы культивируемых на 100% органическом удобрении зафиксировано падение активности СОД, каталазы и пероксидазы, которое сохранилось и через 6 суток культивирования, т.е. у 7 суточных проростков. Активность ферментов суточных семян гороха, культивируемых как на 10, так и 100% растворе органического удобрения была ниже контроля. Однако у 7 суточных проростков, культивируемых на 10% растворе зафиксировано усиление активности данных ферментов, а у проростков, выращенных на 100% растворе активность ферментов, сохранялась ниже контроля.

У суточных семян и недельных проростков как гороха, так и пшеницы культивируемых на 100% растворе органического удобрения наблюдается отставание в экспрессии генов Cu/Zn SOD, Mn SOD, Fe SOD, CAT и POX. Уровень транскрипции исследуемых нами генов пшеницы как у суточных прорастающих семян, так и у недельных проростков выращенных на 10% органическом удобрении, оказался выше контрольных образцов, а у гороха, в отличии от пшеницы, экспрессия генов в начале (у суточных семян) была заторможена, а после (у недельных проростков) оказалась выше контрольных образцов. Количество транскриптов иРНК Fe SOD фактически было минимальным и статистически значимо не отличалось во всех исследуемых образцах прорастающих семян на фоне воздействия разными дозами органического удобрения.

Определение оптимальной по урожайности зерна риса дозы NPK с использованием макрокинетической модели по материалам микрополевого опыта

Евдокимова М.В. , Шестакова М.В.* , Глазунов Г.П.* , Скаженник М.А.** , Чижиков В.Н.***

* Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. Ленинские горы, 1, Москва, Россия.

** Всероссийский научно-исследовательский институт риса, Краснодар, посёлок Белозёрный, 3.
mawkae@gmail.com* , sma_49@mail.ru**

Возрастание потребности в высококачественном продовольствии в условиях роста населения Земли и нарастающего дефицита земельных и водных ресурсов требует разработки новых, более продуктивных и технологичных сортов и технологий их возделывания. Новые сорта должны отвечать ряду требований, включая высокую урожайность и сохранение качества окружающей природной среды при возделывании риса. Одним из негативных последствий возделывания риса является загрязнение почв и вод в результате избыточного удобрения, среди причин которого - отсутствие единого подхода к нахождению оптимальной дозы удобрения. Наиболее надёжный, но не единственный, способ её определения по результатам опытов сводится к построению и анализу дозовой зависимости, аппроксимации её подходящим уравнением и последующему анализу особых точек этого уравнения с целью определения оптимальной концентрации действующего вещества в почве, соответствующей максимуму урожая. Поскольку опытным путём установлено, что и азот, и фосфор, и калий в больших дозах оказывают угнетающее действие на целевые культуры, оптимальная доза удобрения оказывается привязанной к точке максимума дозовой зависимости. В отсутствие общепринятого теоретического уравнения дозовой зависимости при нахождении точки максимума эмпирической кривой принято подбирать эмпирические уравнения, чаще всего в форме полиномов, наилучшим образом описывающие конкретный набор опытных данных доза-ответ. Точность определения оптимальной дозы при таком чисто эмпирическом подходе сильно зависит от величины шага опробования: чем меньше шаг опробования, то есть, чем больше число опытных делянок, тем выше вероятность точного определения оптимальной дозы. Возрастание потребного числа делянок при данном подходе является ограничивающим фактором, который трудно исключить. Решение проблемы видится в опоре на теоретическую зависимость с небольшим числом коэффициентов.

Указанные трудности поиска оптимальной дозы относятся к опытам с одним компонентом, тогда как на практике приходится иметь дело с их комплексом. Поэтому возникает ещё одно требование к искомой теоретической дозовой зависимости, её аргумент должен учитывать все вносимые компоненты. В связи с этим целью исследования стало экспериментальное обоснование применимости к посевам риса в микрополевым опыте теоретической модели, полученной ранее (Гендуглов, Глазунов, 2014) в рамках законов сохранения механики, макроскопической химической и биохимической кинетики и представлений сплошной среды с использованием теории подобия и анализа размерности. Уравнение решения этой модели в фазовой плоскости доза-ответ имеет вид $y = a \cdot x^{(-b)} \cdot \exp(-k/x)$, где y – зависимая переменная (масса урожая, кг/м²), характеризующая ответ посева на концентрацию в почве элементов минерального питания, a – эмпирический коэффициент масштаба, x – независимая переменная – результирующая концентрация в почве учитываемых химических элементов в результате внесения удобрения, кг/кг, b – коэффициент, характеризующий интенсивность негативной составляющей отклика посева на возрастание дозы удобрения, k – коэффициент, характеризующий интенсивность позитивной составляющей отклика посева на возрастание дозы удобрения, в предположении, что позитивный и негативный отклики реализуются одновременно.

Для достижения поставленной цели были проведены микрополевые опыты по возделыванию шести сортов риса (Рапан, Визит, Флагман, Станичный, Соната, Атлант) на лугово-чернозёмной почве в Краснодарском крае РФ, на территории ФГБНУ «ВНИИ риса» по общепринятой методике. Аргументом теоретической модели «доза-ответ» является среднее геометрическое из начальных концентраций в почве химических элементов Si, Al, Fe, Ca, Mg, K, Na, P, S, N и элементов, внесённых в виде удобрения, N, P, K. В качестве зависимой переменной были 1) значения урожайности зерна риса и 2) вегетационного индекса NDVI, характеризующего зелёную фитомассу, в фазе 6 листочков. Подгонку теоретической модели к опытным данным проводили с использованием нелинейного регрессионного анализа по способу наименьших квадратов. В результате показана адекватность теоретической модели сезонной динамике биофизических показателей посевов риса и отклика (урожая) в фазовой плоскости «доза-ответ» на удобрение, что открывает возможность прогнозирования урожайности с использованием предикторов и точного определения оптимального удобрения по результатам полевых опытов, в том числе при использовании комплекса удобрений.

Оптические характеристики сортов пшеницы при почвенной засухе и дефиците азота

Канаши Е.В., Русаков Д.В.

Агрофизический научно-исследовательский институт, Гражданский проспект, 14, Санкт-Петербург, Россия.
ykanash@yandex.ru

Растения на протяжении вегетации в любой климатической зоне испытывают действие неблагоприятных факторов среды, которые вызывают неспецифическую ответную реакцию – окислительный стресс и активизацию вторичного метаболизма. В ответ на действие различных стрессоров спектральные характеристики радиации, отраженной от поверхности листьев, меняются до появления внешних симптомов угнетения и/или повреждения растений. Цель работы – исследовать изменения спектров отраженной от листьев радиации, происходящие под действием почвенной засухи у отличающихся по засухоустойчивости сортов яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), вегетирующих при различных уровнях азотного питания и оценить степень выраженности симптомов водного дефицита в зависимости от уровня азотного питания.

Растения пшеницы засухоустойчивых и незасухоустойчивых сортов выращивали в 3 л сосудах с дерново-подзолистой почвой, при искусственном освещении (лампы ДНаТ 400, освещенность 20-22 клк, фотопериод 16 часов). Почвенная засуха (7 суток) действовала в период от завершения трубкования до начала колошения. Влажность почвы опытных растений в этот период поддерживали равной 30% ППВ. В контроле в течение всей вегетации влажность почвы была равна 80% от ППВ. Спектры отраженной от листьев радиации регистрировали по завершении действия почвенной засухи *in situ* с помощью оптоволоконной спектрорадиометрической системы фирмы Ocean Optics (США). Для записи спектров отражения в каждом варианте отбирали по 15 растений (повторность опыта 2-кратная). После записи спектров рассчитывали индексы отражения, позволяющие оценить содержание хлорофиллов – ChlRI, коэффициент диффузного рассеяния – R_{800} , флавоноидов – FRI_{mod} , антоцианов – ARI_{mod} , и активность фотохимических процессов фотосинтеза – PRI_{mod} , которая определяется в основном интенсивностью тепловой диссипации. Расчетные формулы индексов отражения приведены ранее (Kanash et al. 2013; Чесноков и др., 2019). Статистическая обработка результатов выполнена с помощью программ MS Excel 2010 и Statistica 8. Сила факторного эффекта η^2 (азотного питания и почвенной засухи) определена по результатам дисперсионного анализа в процентах как отношение соответствующей суммы квадратов отклонений величины изучаемых оптических и показателей от их средних значений к общей сумме квадратов. Сравнивая η^2 дефицита азота и воды на индексы отражения можно сделать вывод, что засуха оказала более сильное влияние, чем пониженный уровень азотного питания. Наиболее значительно при дефиците воды изменился показатель рассеяния света R_{800} ($\eta^2=67\%$), величина которого зависит от структурных особенностей листьев. Изменение отражения радиации ближнего инфракрасного диапазона является характерной ответной реакцией растений на дефицит воды. Коэффициент корреляции (r) между содержанием воды в листьях и их отражающей способностью наиболее высок в диапазоне 380-400 нм и 760-1000 нм. Связь между содержанием азота в почве и отражающей способностью листьев наиболее выражена для радиации диапазонов радиации 405-445, 510-645 и 695-730 нм. В расчетные формулы индексов отражения, которые были применены в данной работе, входят коэффициенты отражения для длин волн с наиболее высоким r (исключение составляет диапазон 380-400 нм, который не использован ни в одном из индексов). Отражающая способность листьев в диапазоне 760-1000 нм, в частности использованный нами показатель рассеяния света R_{800} , зависит от внутренней структуры листа, размеров клеток и органелл и, прежде всего, от величины межклеточного воздушного пространства и отношения площади поверхности мезофилла к площади листа. Потеря воды листьями при дефиците воды обычно сопровождается снижением тургора и является защитной реакцией растений, предохраняющей их от обезвоживания. Такая реакция на засуху особенно выражена у устойчивых к засухе сортов. Скручивание листьев является адаптивным морфологическим признаком, обеспечивающим снижение интенсивности транспирации и сохранение воды в тканях листа. Упомянутые особенности ответной реакции растений на недостаток воды в почве могут стать причиной неточной оценки азотного статуса растений при проведении мониторинга в засушливых регионах или в засушливый вегетационный сезон. При дистанционном изучении состояния посевов участки, страдающие от дефицита воды из-за скручивания листьев и потери ими тургора будут восприниматься как имеющие меньший индекс листовой поверхности, что является характерным симптомом азотного голодания. Засуха влияла по-разному на сорта, отличающиеся по засухоустойчивости. Если у незасухоустойчивых сортов диффузное отражение возрастает по всему спектру (особенно в зеленой, оранжевой и ближней инфракрасной области), увеличиваясь до 30-38%, то у засухоустойчивых сортов изменения происходят в основном в ближнем инфракрасном диапазоне в связи с увеличением диффузного рассеяния, связанного со структурными изменениями тканей листа. Существенные различия оптических характеристик у отличающихся по засухоустойчивости сортов пшеницы и их изменение при дефиците азота и воды свидетельствуют о хороших перспективах для создания технологий диагностики физиологического состояния растений, оценки взаимодействия генотип-среда и фенотипирования растений на толерантность к действию различных абиотических и биотических факторов среды.

Особенности азотного обмена *Abies sibirica* Ledeb.

Бажина Е.В.

Институт леса им. В.Н. Сукачева, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/28, Россия.
genetics@ksc.krasn.ru

В последние десятилетия в связи с усыханием темнохвойных лесов в горах Южной Сибири интенсивно проводятся исследования пихты сибирской. У усыхающих деревьев пихты наблюдаются нарушения морфоструктуры кроны, ростовых и репродуктивных процессы, снижается интенсивность ксилогенеза, изменяется элементный состав хвои, в ксилеме наблюдаются структурные изменения.

Настоящие исследования показали изменение содержания общего азота в хвое в зависимости от возраста и состояния деревьев. В оптимальных условиях произрастания у здоровых деревьев без признаков усыхания отмечается максимальное содержание азота в женском генеративном ярусе и резкое падение в мужском. Такое распределение, очевидно, обусловлено морфоструктурными особенностями строения кроны и является видоспецифичным для деревьев пихты сибирской. У деревьев старшего возраста (170-250 лет) различия по содержанию азота заметно сглаживаются. Выявлено некоторое увеличение его содержания в вегетативном ярусе, что может быть обусловлено преобладанием процессов старения над процессами роста и развития, и замедлением корнелистовых взаимодействий. Иные закономерности распределения азота по кроне наблюдаются в горных экосистемах. У деревьев, не имеющих признаков усыхания, содержание азота закономерно возрастало от верхнего, женского яруса к вегетативному. В тоже время, у усыхающих деревьев (170-180 лет), напротив, наблюдается накопление общего азота в женском генеративном и вегетативном ярусах, при резком падении в мужском генеративном ярусе. Различия по содержанию азота между отдельными деревьями составляли 15,2-22,9%. Наблюдаются различия и по соотношению фондов белкового и небелкового азота, которое является важным показателем направленности обменных процессов у растений.

У морфологически здоровых 120-130-летних деревьев отношение белкового азота к небелковому довольно высокое, максимальных значений (92/8) достигает в женском генеративном ярусе. В горной популяции в хвое женского и вегетативного ярусов, увеличивалась фракция, представленная белками, а в мужском ярусе, напротив, небелковая. Учитывая увеличение содержания общего азота, можно предположить, что в мужском генеративном ярусе вследствие нарушения обменных процессов происходит накопление азота в минеральной форме. Необходимо отметить, что у деревьев, старшего возраста не имеющих признаков усыхания различий по содержанию азота в генеративных и вегетативных побегах не выявлено. В тоже время у усыхающих деревьев в мужском генеративном ярусе наблюдается резкое снижение соотношения белковой фракции по отношению к небелковой, что, вероятно, обусловлено перераспределением азотных метаболитов и ослаблением синтеза белков.

Регрессионный анализ выявил, что при увеличении размеров хвои наблюдается увеличение содержания в хвое белкового ($F = 0.61, p \geq 0,05$) и уменьшение содержания общего азота (значимость $F = 0.05, p \geq 0,05$).

Таким образом, особенности азотного обмена, нарушения соотношений фондов белкового и небелкового азота в побегах различной сексуализации свидетельствуют о нарушении обменных процессов при нарушении гомеостаза деревьев пихты сибирской. Особенности азотного метаболизма позволяют объяснить специфический характер усыхания пихты сибирской.

Особенности влияния эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* на содержание малонового диальдегида, как показателя окислительного стресса у растений горчицы белой под воздействием УФ-света

Смирнова Ю.В. *, Хайруллин Р.М. **, Ишембитова К.Р. *

* Стерлитамакский филиал ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет».

Пр. Ленина, 47, Стерлитамак, Россия.

** Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра РАН.

Пр. Октября, 71, лит. Е, Уфа, Россия.

bh84@mail.ru

В последние десятилетия в связи с загрязнением атмосферного воздуха и уменьшением озонового слоя планеты ультрафиолетовое излучение, достигающее поверхности Земли, значительно увеличивается. В первую очередь, это оказывает значительное влияние на растительные организмы, использующие солнечный свет для фотосинтеза. Под действием УФ-радиации происходит уменьшение массы растений, площади листовой поверхности, появляются некрозы на листьях, нарушается корреляция между ростом побегов и корней. Эти повреждающие эффекты УФ-света связаны с развитием в тканях растений окислительного стресса, перекисным окислением липидов и инактивацией антиоксидантных ферментов.

В настоящее время в научной литературе имеются данные, свидетельствующие о том, что некоторые представители эндофитных бактерий способны снижать в растительных тканях интенсивность процессов окислительного стресса в условиях воздействия различных неблагоприятных факторов среды (засоление, засуха, действие тяжелых металлов и др.). В ряде исследований такая способность была выявлена у эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* 26Д и 11ВМ. В то же время, учитывая повреждающее действие УФ-радиации на растения, исследования по выявлению эффективности штаммов эндофитных бактерий в защите растений от воздействия такого стресс-фактора не проводились.

Целью работы явилось изучение влияния инокуляции семян клетками *B. subtilis* 26Д на некоторые биохимические показатели окислительного стресса у растений горчицы белой (*Sinapis alba* L., сорт Рапсодия), вызванного действием коротковолнового УФ-света. Для этого калиброванные семена промывали в мыльной и дистиллированной воде, затем обрабатывали клетками *B. subtilis* 26Д (ВНИИСХМ, №128) из расчета на 1 г семян 20 мкл суспензии бактерий в концентрации 10^6 кл./мл. Семена контрольных растений обрабатывали дистиллированной водой. Растения выращивали в почве (чернозем выщелоченный) 30 дней при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$ на дневном свете в пластиковых вегетационных сосудах. Затем проростки 30 мин освещали коротким ультрафиолетовым светом с пиком 253,7 нм (облучатель ОБН-35 «Азов»). Пробы отбирали одновременно во всех вариантах опыта в трёх биологических повторах через 2, 4, 6, 12 и 24 ч после воздействия УФ-света. Об интенсивности окислительного стресса судили по концентрации в тканях растений продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ) – малонового диальдегида (МДА) согласно методу Costa с соавторами (2002). Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Microsoft Office Excel 2007. Для выявления значимых различий между вариантами опыта использовали t-критерий Стьюдента.

Выявлено, что содержание МДА в надземной части обработанных бактериями растений, не подвергшихся воздействию УФ-света, было в среднем на 18,5% меньше, чем у необработанных проростков. В тканях растений, не обработанных бактериями, подвергшихся воздействию УФ-света, наблюдали накопление продукта перекисного окисления липидов. Содержание МДА в тканях растений этого варианта опыта было больше в сравнении с контрольными (без воздействия УФ) на 51%, 92% и 68%, соответственно через 6, 12 и 24 ч после облучения.

В тканях обработанных бактериями растений через 2 часа после воздействия ультрафиолетового света происходило резкое повышение уровня МДА (в 2,1 раза по сравнению с собственным контролем (без облучения) и на 38% в сравнении с необработанными растениями, подвергшимися воздействию УФ). Затем, к 6 ч эксперимента отмечали снижение уровня МДА ниже значения собственного контроля. Через 24 ч после облучения уровень МДА у облученных обработанных и необработанных бактериями растений был одинаковым.

Таким образом, в тканях горчицы белой окислительный стресс, вызванный действием УФ-света, проявлялся в повышенном в течение 24 ч после действия стресс-фактора уровне МДА в побегах растений, не обработанных клетками эндофита, что свидетельствует о нарушении и/или неэффективной работе ферментной системы антиоксидантной защиты. Инокуляция растений горчицы клетками эндофита *B. subtilis* 26Д приводила к резкому, но кратковременному повышению содержания МДА в тканях. Не исключено, что антиоксидантная система инокулированных бактериями проростков быстрее приходила в исходное, «дострессовое» состояние, что может свидетельствовать о большей устойчивости обработанных растений к данному стрессовому фактору.

Работа частично выполнена в рамках выполнения Государственного задания РФ №АААА-А16-116020350027-7.

Особенности выбора референсных генов при оценке влияния на рапс *Brassica napus* L. действия стрессовых факторов

Шеин М.А., Алексеев В.Ю., Никоноров Ю.М., Михайлова Е.В.

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Проспект октября 71, Уфа, Россия.
mikhele@list.ru

Рапс *Brassica napus* L. – ценное сельскохозяйственное растение, тетраплоид (ААСС, 2n=38), который был получен при скрещивании репы *Brassica rapa* (2n = 20, геном АА) с капустой *Brassica oleracea* (2n = 18, геном СС). В России культивируются преимущественно отечественные сорта селекции ВНИИ масличных культур и ВНИИ рапса. Был секвенирован геном рапса озимых сортов Dargog и Taridor, и полуозимого сорта ZS11, но ни одного ярового сорта. Было показано, что гомологичная рекомбинация, а также обратное скрещивание с *B. rapa* играет важную роль в генетическом разнообразии сортов рапса. В целом можно сказать, что исследование генома *B. napus* только начинается.

Эта сельскохозяйственная культура, хотя и является высокомаржинальной, нуждается в регулярных обработках от сорняков, насекомых-вредителей и различных заболеваний. Актуальным является повышение стрессоустойчивости рапса методами геномной селекции и геномной инженерии. Для этого необходимо проводить исследования роли отдельных генов в обеспечении устойчивости рапса к воздействию различных неблагоприятных факторов как биотической, так и абиотической природы. Ключевым условием успешного проведения таких исследований является правильный подбор референсных генов, экспрессия которых в наименьшей степени подвержена влиянию стресса.

Традиционно в качестве референсных генов при проведении ОТ-ПЦР используются гены актинов (например, *VnActin*), к тому же для сорта рапса DH12075 было показано, что при нормальных условиях гены *UPI*, *UBC9*, *UBC21* и *TIP41* являются более подходящими для исследования вегетативных тканей, тогда как ген *ACT7* был более стабилен в эмбриональных тканях. Однако сравнительные исследования реакции этих генов на воздействие стресса никогда не проводились. Недостаточная стабильность используемых генов может существенно исказить результаты количественной ПЦР.

Проведенное нами секвенирование некоторых участков генома рапса сорта Ратник отечественной селекции показало, что он имеет большее сходство с *B. oleracea* (96% сходство) и *B. rapa* (90%), нежели сортом рапса ZS11 (89% сходство). Это может говорить об уникальном происхождении отечественных сортов, но также и создает сложности в подборе праймеров для референсных генов.

Нами были опробованы описанные в источниках литературы праймеры для генов *UPI*, *UBC9*, *UBC21*, *TIP41*, *VnAct2*, *VnAct7*, *EsAct7*, *AtAct2* на растениях рапса сорта Ратник в нормальных условиях, а также при холодовом стрессе (-1°C и -8°C). Последние два праймера подходят для обширного списка растений семейства Капустных. При температуре -8°C в различной степени снижалась экспрессия всех исследуемых референсных генов. При использовании для количественной ПЦР праймеров к генам *UPI*, *UBC21*, *TIP41* и *AtAct2* образовывались неспецифические продукты, тогда как с праймерами к генам *UBC9*, *VnAct2* и *EsAct7* экспрессия продукта отличалась наибольшей стабильностью. Данные гены и праймеры могут быть рекомендованы для использования в качестве референсных для отечественных сортов рапса. Также, в связи со сложностью генома исследуемого объекта, стоит использовать одновременно не один, а несколько референсных генов при постановке ПЦР.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента РФ МК-1146.2020.11 и госзадания № АААА-А16-116020350028-4.

Особенности дистанционного обучения в Teams

Назаренко Л.В.

Московский городской педагогический университет, Институт естествознания
и спортивных технологий, Чечулина д.1, Москва, Россия.
nlv.mgpu@mail.ru

Дистанционное обучение – это одна из разновидностей профессионального образования. Сам термин «дистанционное обучение» (distance education) по-разному интерпретируется в русской и в английской педагогической литературе. Обычно встречаются следующие варианты: «дистанционное образование» (distant education) и «дистанционное обучение» (distant learning).

Главнейшие принципы дистанционного обучения – это установление интерактивного взаимодействия между преподавателем и студентами, а также самостоятельное изучение обучающимися определенного массива знаний по конкретному предмету.

Однако надо помнить, что дистанционное обучение имеет свои плюсы и минусы. К плюсам дистанционного обучения можно отнести то, что студент сам определяет удобное для него время учебы; не нужно тратить два часа в день на то, чтобы добраться до ВУЗа; дистанционное образование обычно значительно дешевле очного или очно-заочного; для обучения достаточно компьютера, планшета, смартфона с выходом в интернет.

Из минусов дистанционного обучения – это несовершенная техническая составляющая подобных курсов: не у всех студентов имеется компьютер и/или ноутбук или отсутствует доступ в Интернет, также отдельные студенты не владеют современными компьютерными технологиями. Кроме того, в некоторых случаях нельзя обойтись без практических (лабораторных) занятий под руководством преподавателя, а дистанционное образование не может дать учащемуся практические навыки работы по выбранной специальности. И самое главное – это сложности организации самостоятельной работы обучающимися по освоению материала курса, т.е. отсутствие жесткой самодисциплины и сильной мотивации.

В настоящее время, в связи с пандемией и вынужденной самоизоляцией населения, дистанционные образовательные технологии в России и в мире получили дополнительный стимул к интенсивному развитию.

Руководство нашего Университета во исполнение Указа Президента и Приказа Министерства науки и высшего образования в целях обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия обучающихся и преподавателей выпустило приказ, в соответствии с которым реализация образовательных программ в Университете осуществлялась в электронной информационно-образовательной среде с применением дистанционных образовательных технологий Microsoft Teams.

Использование технологии Microsoft Teams позволило:

1. Каждой группе студентов иметь свою рабочую область на каждую отдельную дисциплину;
2. Проверять расписание в календаре. Для любого занятия создавалось свое собрание, на которое приглашались студенты;
3. В рабочей области команды, созданной по принципу «группа–дисциплина», студентам предоставлялась вся информация по предмету: были размещены учебные материалы, видеофайлы, презентации, задания и тесты;
4. Проводить согласно расписанию все занятия (лекции и семинары) со студентами в режиме вебинаров с возможностью записи занятия;
5. Предоставлять преподавателям возможность оценивать ответы студентов и размещать комментарии к ним.
6. Экзамен также можно проводить в онлайн режиме, но это займет много времени. А можно предложить письменные работы, которые будут состоять из тестовых заданий и развернутых ответов на отдельные вопросы по пройденному курсу. Время на ответ строго регламентировано – 1 час.

Таким образом, несмотря на тяжелую обстановку и карантин на смену привычной модели обучения приходит новая модель – дистанционное образование. Эта модель следует определенным принципам: в центре технологии обучения – студент; сущность технологии – развитие способности к самообучению; студенты принимают активное участие в обучении; а в основе учебной деятельности – сотрудничество между преподавателем и студентами.

Особенности организации учебной практики по физиологии растений в дистанционном режиме в РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева

Яковлева О.С., Анисимов А.А., Тараканов И.Г.

Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева.
Ул. Тимирязевская, 49, Москва, Россия.
anisimov_a@grau-msha.ru

В современном мире учебный процесс в ВУЗе находится под влиянием самых разнообразных факторов, которые зачастую не зависят ни от преподавателей, ни от руководства учебного заведения. В 2020 году ВУЗы Москвы столкнулись с таким явлением, как массовый переход на дистанционный режим работы, связанный с эпидемией коронавируса. Дистанционное обучение затронуло как базовый курс физиологии и биохимии растений, который преподаётся на кафедре физиологии растений РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, так и учебную практику по физиологии растений.

Вопрос об организации проведения учебной практики в дистанционном варианте вставал достаточно остро и ранее. Так, в конце 90-х годов, не хватало контактных часов для проведения полноценной учебной практики для студентов специалитета заочной и вечерней формы обучения. Именно в то время были разработаны методические указания под названием «Сезонная ритмика физиологических процессов жизнедеятельности растений в природе (эколого-физиологические экскурсии в природу)». Данный раздел был включен в состав «Практикума по физиологии растений» под редакцией Н.Н. Третьякова, вышедшего в 2003 году. Раздел включал в себя 3 экскурсии: весеннюю, летнюю и осенне-зимнюю.

В рамках весенней экскурсии обучающиеся должны были ознакомиться с процессами выхода растений из покоя: возобновлением сокодвижения, переходом от гетеротрофного к автотрофному питанию. На летней экскурсии необходимо было рассмотреть различные адаптационные процессы: циркадные ритмы, аллелопатические взаимодействия, устойчивость растений к антропогенным факторам. В данной экскурсии большое внимание уделялось минеральному питанию, а именно, влиянию на ростовые процессы растений таких показателей, как кислотность почвы и недостаток элементов минерального питания. По результатам визуальной диагностики необходимо было собрать гербарий растений с выявленными признаками минеральной недостаточности. Для этой цели использовались культурные растения, сорняки и дикоросы. На осенне-зимней экскурсии студенты рассматривали энергетику растений в изучаемый период, подготовку растений к покою, сам покой, а также, по возможности, состояние озимых культур. Данный раздел практикума использовался не только для обучения студентов-заочников, но и для студентов очной формы обучения как способ отработки пропущенных занятий в рамках учебной практики.

К сожалению, полный переход на дистанционное обучение сделал возможным взаимодействие между преподавателем и студентами только в виртуальном режиме – при помощи специальных программ для проведения онлайн-занятий, а также различных мессенджеров, в том числе электронной информационно-образовательной среды университета (ЭИОС). Подобный тип дистанционного взаимодействия в рамках учебной практики ограничен также тем, что студенты, находясь дома по всей стране и ближнему зарубежью, не имеют специальных условий для проведения тех анализов и наблюдений, которые традиционно проводятся в рамках учебной практики по физиологии растений.

В условиях дистанционного обучения основой для проведения учебной практики по физиологии растений в РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева стали учебные фильмы. Кафедра располагает коллекцией учебных фильмов, посвященных как отдельным разделам дисциплины (например, водный обмен, фотосинтез), так и отдельным вопросам физиологии (например, визуальная диагностика недостатка элементов питания, движения у растений, раздражимость растений). В зависимости от продолжительности учебной практики по физиологии растений (у студентов РГАУ-МСХА она может длиться, в зависимости от направления, от двух дней до 1 недели) мы подбирали для каждого дня практики свой набор фильмов, посвященных отдельным вопросам физиологии растений. При этом фильмы подбирались с таким расчётом, чтобы познакомить студентов с теми вопросами, которые должны были быть рассмотрены на практике. Это, к примеру, определение чистой продуктивности фотосинтеза, рассмотрению которой предшествовали фильмы, рассказывающие о продукционном процессе растений и фотосинтетической продуктивности. Кроме того, к каждому комплекту фильмов прилагался список вопросов, на которые студенты должны были ответить после просмотра. Вопросы ориентированы не на простое перечисление отдельных фактов, озвученных в фильме, а на творческое мышление студента. Так, например, после просмотра фильма, посвященного жизни и научным трудам К.А. Тимирязева, студентам предлагалось описать причины, по которым, по их мнению, работы учёного до сих пор служат источником вдохновения для физиологов растений.

Ряд заданий предусматривает с одной стороны более длительное выполнение, а с другой – более творческое. Так, например, студентам предлагается найти на окружающей их территории несколько растений с симптомами недостатка элементов питания, описать внешние признаки и сделать предположение о том, какого элемента данному растению не хватает. Такой подход позволил минимизировать негативные эффекты дистанционного обучения и провести успешную подготовку студентов в рамках учебной практики по физиологии растений.

Особенности синтеза, транспорта и инактивации ауксина при формировании узорчатой древесины карельской березы

Новицкая Л.Л., Тарелкина Т.В., Галибина Н.А., Мощенская Ю.Л., Никерова К.М.

Институт леса - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра "Карельский научный центр Российской академии наук".

Пушкинская ул., 11, Петрозаводск, Россия.

ludnovits@rambler.ru

Объектами исследования были две формы березы повислой (*Betula pendula* Roth) – обычная береза повислая (*B. pendula* var. *pendula*) с типичной для вида прямослойной древесиной и карельская береза (*B. pendula* var. *carelica*) с узорчатой и безузорчатой древесиной ствола.

Карельская береза представляет собой уникальный объект для изучения механизмов формирования древесины. Данный тип структурных аномалий связан с массовой дифференцировкой паренхимных клеток вместо сосудов и волокнистых трахеид. Имеющиеся сосуды и волокна характеризуются аномальным строением и нарушенной пространственной ориентацией. Поскольку ключевую роль в их образовании играют гормоны, в первую очередь ауксин, можно предположить, что причиной аномального морфогенеза у карельской березы служит изменение гормонального статуса ткани. Влияние ауксина во многом определяется его концентрацией и распределением в органах и тканях. Уровень свободного ауксина является результатом сложного взаимодействия процессов его транспорта и метаболизма, который в свою очередь включает биосинтез, деградацию и конъюгацию гормона.

Методами биоинформатики в геноме березы повислой мы идентифицировали гены, участвующие в регуляции содержания ауксина в тканях и принадлежащие к семействам *Yucca* (биосинтез ауксина), *PIN* (полярный транспорт ауксина), *GH3* и *UGT* (инактивация ауксина в результате образования конъюгатов с аминокислотами и простыми сахарами). Экспрессию генов интереса при различных сценариях ксилогенеза исследовали методом ПЦР в режиме реального времени. Отбор образцов тканей ствола и листьев проводили в период активной деятельности камбия (25 июня).

Всего у березы повислой было выявлено 8 генов *Yucca*, 6 генов *PIN*, 12 генов *GH3*. В многочисленном семействе *UGT* мы рассматривали только гены, кодирующие фермент ИУК-глюкоза синтазу, который катализирует реакцию инактивации ауксина с образованием конъюгата ИУК-глюкоза; таких генов оказалось 2. Установлено, что все идентифицированные гены экспрессируются в тканях ствола деревьев обычной березы повислой и карельской березы, за исключением одного из двух генов *UGT*. Была исследована тканеспецифичность генов, в частности, выявлены гены, для которых характерно накопление наибольшего количества транскриптов в зонах формирования ксилемы и флоэмы (семейство *Yucca* - *Yucca5*, *Yucca6*, *Yucca11*; семейство *PIN* - *PIN3*; семейство *GH3* - *GH3.5*, *GH3.9*). На основании сравнения активности генов интереса при различных сценариях ксилогенеза, были выявлены гены, экспрессия которых в наибольшей степени различалась при развитии нормальных и аномальных по строению тканей.

Обобщение экспериментального материала показало, что большое количество генов интереса продемонстрировало сверхэкспрессию при развитии структурных аномалий по типу карельской березы, из чего следует вывод о важной роли ауксина в этом процессе. Более того, различия в уровне экспрессии генов *Yucca* в узорчатых и безузорчатых участках одного и того же ствола подтверждают возможность локального биосинтеза ауксина *de novo* в ходе камбиального роста, что согласуется с современными представлениями по этому вопросу.

Анализ литературы свидетельствует о том, что сверхэкспрессия некоторых из изученных генов индуцируется повышенным уровнем гексоз в тканях. Ранее мы установили, что в стволе карельской березы избыток гексоз появляется в результате интенсивного расщепления сахарозы с участием апопластной инвертазы.

Интенсивное поступление в клетку гексоз может приводить к образованию больших количеств активных форм кислорода (АФК) и активизации ферментов антиоксидантной системы (АОС). Высокий уровень АФК влияет на все процессы, участвующие в регуляции уровня ауксина в клетке, включая биосинтез, транспорт, метаболизм и катаболизм гормона. В данной связи в сфере наших интересов находятся ключевые ферменты АОС (супероксиддисмутаза, пероксидаза, каталаза, полифенолоксидаза). Установлено повышение активности указанных ферментов по мере усиления степени узорчатости древесины карельской березы, высказано предположение о возможном участии пероксидазы в окислении ауксина.

Финансовое обеспечение исследования осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (Институт леса КарНЦ РАН) и при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-04-00622_a).

Особенности функционирования антиоксидантной системы защиты яблони при высокотемпературном стрессе

Киселева Г.К., Ненько Н.И., Ульяновская Е.В., Караваяева А.В., Схаляхо Т.В.

ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия»,
ул. им. 40-летия Победы, 39, Краснодар, Россия.
galina-kiseleva-1960@mail.ru

В настоящее время изучение механизмов адаптации растений к действию абиотических стрессоров, в частности, к высокотемпературному стрессу проводят на однолетних растениях, являющихся в отличие от многолетних более чувствительными, и индукция защитного ответа у них более выражена. Формирование защитного ответа в условиях стресса у многолетних плодовых растений, в частности яблони изучены недостаточно, в то время как такие знания важны для разработки стратегии повышения устойчивости яблони. Общим интегральным процессом, характеризующим негативное действие стрессоров различной природы, является усиление генерации активных форм кислорода (АФК) в ответ на которое, как правило, наблюдается активация антиоксидантной защитной системы.

Целью работы являлось исследование характера отношений между компонентами антиоксидантной системы защиты в листовых тканях яблони в условиях высокотемпературного стресса.

Объектами исследования служили сорта яблони различного эколого-географического происхождения: Айдаред, Эрли Мак, Дейтон (США), Лигол (Польша), Пирос (Германия), Прикубанское, Рассвет, Фортуна, Союз, Родничок, Орфей (Россия, СКЗНИИСиВ). Устойчивость растений изучалась в контрольных условиях и при моделировании высокотемпературного стресса при температуре + 55 °С в течение 2 часов. Содержание малонового диальдегида, прелина, аскорбиновой, фенолкарбоновых кислот, определяли методом капиллярного электрофореза на приборе «Капель» 104 Р, активность пероксидазы, содержание каротиноидов спектрофотометрическим методом.

Степень повреждающего действия высокотемпературного стресса оценивали по количеству образующегося малонового диальдегида (МДА). После стрессового воздействия у всех сортов уровень содержания МДА повышался в среднем в 5-8 раз. У сортов Прикубанское, Орфей отмечено наименьшее количество МДА (0,005-0,011 мкмоль/г сырого веса), свидетельствующее об их повышенной устойчивости в отличие от сортов Эрли Мак, Дейтон, Пирос (0,330-0,340 мкмоль/г сырого веса). Остальные сорта занимали промежуточное положение.

Показано, что исследованные сорта яблони отвечают на действие стрессора стимуляцией функционирования антиоксидантной системы, защитный эффект которой определяется как активацией пероксидазы, так и накоплением различных низкомолекулярных метаболитов (пролина, аскорбиновой, фенолкарбоновых кислот, каротиноидов). Проведен сравнительный анализ активностей пероксидазы, содержания низкомолекулярных соединений до и после стрессового воздействия. Механизм антиоксидантной защиты от высокотемпературного воздействия у изучаемых сортов яблони был разный.

Выявлены различия в конститутивном уровне активности антиоксидантной системы, связанных с сортовой принадлежностью. Так, сорта различались по содержанию пролина, каротиноидов, аскорбиновой и фенолкарбоновых кислот, уровню активности пероксидазы. У сортов Прикубанское, Орфей конститутивная активность пероксидазы выше на 8-10 %, чем у сортов Рассвет, Союз. Показано, что активность пероксидазы в стрессорных условиях у изучаемых сортов изменялась разнонаправленно. У сортов Прикубанское, Орфей повышалась в 3-4 раза, в то время как у сортов Лигол, Родничок падала в 1,4-2,0 раза, у сортов Фортуна, Айдаред отмечены незначительные колебания активности этого фермента.

Вклад остальных компонентов антиоксидантной системы защиты в подавление окислительного стресса тоже не равнозначен. У сортов Фортуна, Айдаред активность пероксидазы изменялась в меньшей степени, но возрастало содержание суммы фенолкарбоновых кислот и каротиноидов. В этом случае низкомолекулярные антиоксиданты оказались более эффективными, чем ферментативная система защиты (активность пероксидазы). У сортов Лигол, Родничок повышение синтеза аскорбиновой кислоты в условиях высокотемпературного стресса становится более эффективным защитным механизмом, чем синтез фенолкарбоновых кислот. Поскольку повышение содержания пролина при стрессе наблюдались у всех изучаемых сортов яблони, то его можно рассматривать как обязательного участника защитного ответа. Максимальное повышение содержания пролина в условиях окислительного стресса отмечено у сортов Рассвет, Союз (с 0,118 до 1,382 мг/г сырого веса).

Показано, что в процессе подавления развития окислительного стресса компоненты антиоксидантной защитной системы различных сортов яблони функционируют координированно. У сортов яблони, различающихся по устойчивости к высоким температурам, наблюдается сходство и в функционировании антиоксидантной системы.

Полученные данные о функционировании антиоксидантных реакций показали, что у исследованных сортов яблони существует избирательность в активации тех или иных метаболических путей при действии высокотемпературного стресса.

Особенности экспрессии генов системы передачи сигнала цитокинина у *Picea abies*

Пашковский П.П., Ломин С.Н.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.
Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
losn1@yandex.ru

Несмотря на гигантский прогресс в изучении гормональных систем у растений, полученные данные до сих пор ограничиваются только небольшим количеством исследованных видов. Наиболее подробно цитокининовые системы изучены у представителей покрытосеменных растений. Базовая модель была построена при исследовании модельного (цветкового) растения арабидопсиса. Несмотря на то, что отсекарованы геномы нескольких видов сосудистых растений за пределами цветковых, информация о механизмах функционирования цитокининовых систем у этих видов растений на данный момент отсутствует. Важно отметить, что хозяйственная ценность многих видов голосеменных растений группы хвойных очевидна. Если ориентироваться на модель, созданную для цветковых растений, то цитокинины потенциально могут играть очень важную роль во вторичном утолщении стеблей, что может иметь прямое отношение к продуктивности. Голосеменные и цветковые значительно различаются, несмотря на их принадлежность к одной группе семенных растений и значительное сходство метаболических процессов. Поэтому специальное глубокое исследование цитокининовых систем голосеменных является актуальным как для фундаментальной науки, так и хозяйственной практики.

В ходе проведенных экспериментов с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени была изучена экспрессия генов рецепторов СНК, фосфотрансмиттеров НРТ и регуляторов ответа RR типа В (транскрипционных факторов) и типа А (ингибиторов сигналинга) в различных органах семян растений ели *P. abies*. Конститутивный уровень экспрессии генов *CHK1* (MA_47453p0010) и *HPT1* (MA_870718p0010) был значительно выше в хвое, чем в корнях. При осмотическом стрессе наблюдалось снижение уровня экспрессии в хвое. При этом, несмотря на низкую экспрессию генов в корнях, при стрессе наблюдалось незначительное увеличение для *CHK1*. Экспрессия *HPT1* была самая низкая в корнях, при этом стресс вызывал увеличение экспрессии. С другой стороны, конститутивный уровень экспрессии гена *CHK2* (MA_101803p0010) был заметно выше в корнях растения ели, чем в хвое, а стресс вызывал еще большее увеличение экспрессии в корнях до уровня, сопоставимого с таковым гена *CHK1* в хвое. Уровень экспрессии гена *HPT3* (MA_8815334p0010) был наибольшим среди изученных в хвое, однако стресс вызывал снижение экспрессии, при этом в корне ген конститутивно экспрессировался слабее, чем в хвое, однако, стресс, напротив, вызывал увеличение экспрессии гена *HPT3*. Гены *pseudoHPT2* (MA_130008p0010) и *HPT4* (MA_2904p0010) практически не экспрессировались в корнях растений ели. *PseudoHPT2* сильно экспрессировался в хвое, но не реагировал на стресс, тогда как *HPT4* отвечал на стресс повышением экспрессии на 50%. Гены семейства *RR* больше всего экспрессировались в корнях ели, однако стресс вызывал сильное снижение (более чем в 3 раза) уровня экспрессии генов *RR1* (MA_73095g0010) и *RRB* (MA_92689p0020). В хвое *RRB(D81E)* (MA_83273p0010, псевдорегулятор ответа типа В) обладал высокой экспрессией в контрольных условиях, и его экспрессия увеличивалась при стрессе (на 20%). В корнях экспрессия *RRB(D81E)* была тоже на значительном уровне, но не изменялась при стрессе. Другими изученными генами были *HPT5* (MA_10427616p0010), *pseudoHPT6* (MA_11846p0010) и *RRB(D112E)* (псевдорегулятор ответа типа В, MA_114951p0010). Несмотря на успешную амплификацию указанных генов и соответствие секвенированных участков искомым ПЦР продуктам, данные для них не приведены, т.к. Cq (пороговый цикл в ПЦР) этих генов соответствовал 38-40, что не помещалось в рамки имеющейся калибровки по гену *TUB*. Можно предположить, что данные гены начинают работать в определенную онтогенетическую стадию развития растения и у семян ели не активны.

В итоге можно прийти к выводу, что наибольшее значение в передаче цитокининового сигналинга в хвое семян ели имеют гены *CHK1*, *HPT1*, *pseudoHPT2*, *HPT4*, *HPT3*, при этом в корнях наибольшую роль играют гены *CHK2*, *RR1*, *RRB*, *RRB(D81E)*. Наибольшей экспрессией в хвое обладал ген *HPT3*, а в корнях наибольшая экспрессия была у генов *RR1* и *RRB*. Интересно, что наряду с типичными генами наблюдается также заметная экспрессия генов псевдофосфотрансмиттера *HPT2* и мембранного фосфотрансмиттера *HPT3* в хвое и псевдорегулятора ответа типа В *RRB(D81E)* в корнях, что может свидетельствовать об участии их в передаче цитокининового сигнала у ели.

Работа поддержана грантом РФФИ №19-04-01106.

**От дизайна до научного анализа результатов эксперимента: выбор пути на основе
Стандартов Лабораторных Исследований (Good Laboratory Practice, GLP)**

Козлова Т.А.

Институт Физиологии Растений им. К.А. Тимирязева РАН.
Ботаническая ул., 35, Москва, Россия
kozlova@ifr.moscow

Стандарты Лабораторных Исследований, или Надлежащая Лабораторная Практика (Good Laboratory Practice, GLP) как система менеджмента первоначально была создана для обеспечения качества и безопасности лабораторных исследований (в отличие от Техники Безопасности на Рабочем Месте) в областях применения или производства токсичных, фармацевтических и других веществ, представляющих опасность для человека, животных и окружающей среды. Однако, уже более десятилетия, принципы и основы GLP применяются в практике любых исследовательских работ для обеспечения согласованности, стандартизации, достоверности, качества и воспроизводимости результатов любых научных исследований. GLP достаточно сложная система, включающая в себя такие основополагающие понятия, как контроль и гарантии качества (QC and QA), требования к реактивам, аналитическим инструментам и сопутствующей экспериментальной документации (методы, протоколы, пособия, ГОСТы и т.д.), фактическому проведению экспериментальных работ, отчетности и публикациям. В презентации будут рассмотрены основные цели, задачи и методы GLP, позволяющие обеспечить высокое качество и хорошую воспроизводимость полученных научных результатов. Существуют различия в системе GLP между странами, касающиеся в основном документации по госрегулированию системы. В данной презентации будет представлена GLP на основе The Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD: ENV/MC/CHM(98)17 part one and part two.

Если научный эксперимент начинается с идеи и последующих гипотез, то качество проведенной научной работы начинается с хорошо продуманного, стандартизированного дизайна эксперимента или цепи экспериментов. В презентации будут рассмотрены основные принципы дизайна научного эксперимента, пути реализации дизайна, принципы качества сбора результатов экспериментов и последующего анализа полученных данных на основе осуществимости и эффективности поставленных задач с учетом методов GLP. Также будет представлен список ключевой литературы для более детального изучения вопроса.

Лаборатория Управляемого Фотобиосинтеза, ИФР РАН: РНФ №19-14-00118.

Открытие процессов нефотохимического тушения в фотосинтезе отечественными учеными

Стадничук И.Н.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.
Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
stadnichuk@mail.ru

В 1957 г. Д.И. Сапожников с соавт. (Докл. АН СССР, 1957) обнаружили в листьях растений светоиндуцированные превращения ксантофиллов в составе пигментного аппарата фотосинтеза. На ярком свете активируется фермент дезэпоксидаза, что приводит к восстановлению эпоксидных групп каротиноида виолаксантина до антраксантина и затем до зеаксантина и падение уровня фотосинтеза. На слабом свете или в темноте протекает обратная реакция, катализируемая эпоксидазой. Открытие получило название виолаксантинового, или ксантофиллового цикла. Позже в ряде водорослевых таксонов были найдены еще две разновидности превращений ксантофиллов, названные диадиноксантиновым и лютеин-5,6-эпоксидным циклами.

Ряд лет ушел на выяснение биохимического механизма реакций и на установление локализации ксантофиллов в антенном хлорофилл *a/b*-протеине. Наконец, в работе Деммиг-Адамс (Demmig-Adams, Biochim. Biophys. Acta, 1990) был сделан важный шаг к пониманию биологической роли процесса, который служит для защиты пигментного аппарата от избыточно яркого света. Поглощенная световая энергия передается к реакционным центрам, растрачивается в тепло и излучается в виде флуоресценции. При реализации цикла падает уровень фотосинтеза и снижается уровень флуоресценции хлорофилла *a*. Процесс в целом назван нефотохимическим тушением, или NPQ (Non-Photochemical Quenching). В молекуле зеаксантина, в сравнении с виолаксантином, увеличивается число конъюгированных двойных связей, что обеспечивает эффективный перехват энергии от хлорофилльных молекул в хлорофилл *a/b*-протеине. В зеаксантине реализуется возможность растрачивания энергии в тепло без повреждения пигментного аппарата. На свету малой интенсивности уровень возбуждения реакционных центров фотосинтеза вновь соответствует возможностям утилизации энергии в пигментном аппарате, и в обратной реакции зеаксантин исчезает.

Хлоропласты растений и водорослей произошли в ходе эволюции от цианобактерий в результате эндосимбиоза. Несмотря на прямое родство, считалось, что, в отличие от высших растений, нефотохимическое тушение у цианобактерий отсутствует, не успев сформироваться как процесс ко времени их эволюционного появления. Кроме того, антенные комплексы цианобактерий состоят из фикобилипротеинов, которые вместо хлорофилла несут в качестве хромофоров фикобилины и собраны в гигантские белковые макрокомплексы, называемые фикобилисомами. В отличие от хлорофилл *a/b*-протеинов, фикобилипротеины являются водорастворимыми белками и не содержат ни ксантофиллов, ни иных каротиноидов, которые, судя по растениям, могли бы вызвать эффект тушения. Как в таком случае цианобактерии могут защитить себя от избыточно яркого света, оставалось неясным. Нам в 2004 г. впервые удалось обнаружить нефотохимическое тушение на модельном виде цианобактерий *Synechocystis* sp. (Rakhimberdieva et al. FEBS Lett. 2004). Оказалось, что только на сильном свете, превышающем на порядок обычный свет и поглощаемом именно каротиноидами, флуоресценция фикобилисом и хлорофилла *a* в клетке в течение нескольких минут уменьшается вдвое, что доказывает эффект тушения. Процесс полностью обратим на слабом свете или в темноте. Поскольку нефотохимическое тушение у растений к этому времени уже было известно, выполненное исследование было сразу подхвачено в ряде зарубежных лабораторий США и Европы. Был идентифицирован водорастворимый белок, несущий специфический каротиноид 3'-гидроксиэхиненон и получивший название оранжевого каротиноид-протеина, или ОСР, Orange carotenoid protein. (Wilson et al., Plant cell, 2006). Яркий свет активирует и меняет конформацию ОСР, что позволяет этому белку присоединиться к фикобилисоме и вызвать эффект тушения флуоресценции. Наши дальнейшие и зарубежные исследования показали прямую аналогию с нефотохимическим тушением, связанным с виолаксантиновым циклом. Кроме того, так как ОСР и фикобилисомы водорастворимы, удастся выделить оба компонента в раствор и проводить эксперименты *in vitro*, что значительно продвинуло наше понимание молекулярно-биологических основ теории тушения в пигментном аппарате фотосинтеза. В нашей последней работе (Stadnichuk et al., FEBS Lett., 2020) детально разработана теория тушения за счет перехвата энергии от возбужденных фикобилиновых молекул в составе фикобилисомы с помощью 3'-гидроксиэхиненона, принадлежащего ОСР. Открытие нефотохимического тушения у цианобактерий означает, что потребность в тушителях возникла на самых ранних стадиях появления кислородного фотосинтеза, так как на сильном свете в фотосинтезирующей клетке наряду с O₂ появляются активные формы кислорода, токсичные для клеточных структур и прежде всего фотосистемы II, и тушение позволяет уменьшить этот отрицательный эффект.

Оценка уровня генетического разнообразия растений *Pinus sylvestris* на лесосеменной плантации (ЛСП) с использованием микросателлитных локусов.

Чирва О.В., Ильинов А.А., Галибина Н.А.

Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук».
Пушкинская ул., 11, Петрозаводск, Россия.
tchirva.olga@yandex.ru

Генетические исследования заключались в изучении полиморфизма микросателлитных локусов и проводились при помощи микросателлитных маркеров (SSR маркеров). Этот тип генетических маркеров приобрел в последнее десятилетие большую значимость благодаря комплексу свойств: гипервариабельность, мультиаллельная природа, кодоминантное наследование, высокая воспроизводимость, относительное обилие. Для микросателлитного анализа использовали 25 маркеров, разработанных Pan Fang с соавторами и относящихся к типу EST-SSR (ESTs, expressed sequence tag, микросателлитные локусы в экспрессируемых последовательностях ДНК).

Объектами исследования явились 7 элитных клонов сосны обыкновенной и 10 клонов с обнаруженными дефектами, такими как многоствольность и толстые ветви, произрастающие на ЛСП I порядка. EST-SSR маркеры позволяют выявлять полиморфизм в транскрибируемой области ядерной ДНК. Они могут маркировать гены, ответственные за фенотипические признаки, в связи с чем полезны для использования в селекции. Пригодность маркера зависит от числа аллелей, которые имеет этот маркер, и их соответствующих относительных частот. Исследование показало, что число аллелей на локус варьировало от 2 до 6 и в среднем составило 3.7 на локус. На основе полученных данных можно отметить наличие различий по встречаемости аллелей для элитных клонов и клонов с выявленными нарушениями, что может впоследствии стать признаком различий между особями.

Основные показатели генетической изменчивости (наблюдаемая (H_o) и ожидаемая (H_e) гетерозиготность), а также показатель F -статистики Райта (F) определяли с помощью программы GenAIEх 6.5. У клонов с дефектами почти во всех локусах показатель наблюдаемой гетерозиготности превышал или был близок по значению к ожидаемой гетерозиготности, за исключением локуса lw-isotig21953, в котором, наоборот, H_o был ниже H_e (0.10 и 0.62 соответственно). Наибольшим уровнем H_o и H_e характеризовались локусы lw-isotig04195 и lw-isotig04306. Анализ показателя F -статистики индекса фиксации Райта показал, что локусы lw-isotig11166, lw-isotig20215 и lw-isotig21953 отличаются смещением равновесия в сторону недостатка гетерозигот (0.316, 0.273 и 0.837, соответственно), в то время как все остальные локусы характеризовались избытком гетерозигот. У элитных клонов в трех локусах (lw-isotig20215, lw-isotig21953 и lw-isotig00080) показатель H_o был существенно ниже H_e . Как и у клонов с дефектами наибольшим уровнем H_o и H_e характеризовались локусы lw-isotig04195 и lw-isotig04306. У четырех локусов индекс фиксации Райта был выше нуля, достигая у локусов lw-isotig21953 и lw-isotig00080 значения 1.000, что свидетельствует об отсутствии по этому признаку среди элитных клонов гетерозигот.

Количественно степень полиморфизма была оценена по показателю PIC (величина информационного полиморфизма). Значение PIC приближается к единице, если локус имеет множество аллелей с примерно равной частотой встречаемости, и равно нулю, если локус мономорфный. Значения PIC были самые высокие для локусов lw-isotig11166, lw-isotig20215, lw-isotig04195, lw-isotig04306 (0.77 и 0.59; 0.81 и 0.55; 0.60 и 0.57; 0.70 и 0.67 для элитных и клонов с дефектами соответственно). При этом для элитных клонов у локусов lw-isotig11166 и lw-isotig20215 этот показатель превосходил такой у клонов с дефектами. По результатам скрининга из дальнейший исследований можно исключить малоинформативный локус lw-isotig05123, у которого $PIC < 0.3$, а также низкие значения H_o и H_e .

Таким образом, согласно полученным результатам, элитные клоны можно считать более устойчивыми, так как у них наблюдается большее аллельное разнообразие. Но в тоже время отрицательным фактором является то, что у элитных клонов преобладают гомозиготные аллели. Учитывая эти предварительные результаты, можно предположить, что большое количество аллелей в гомозиготном состоянии связано с недостатком на данный момент полученных данных. Высокоэффективными оказались микросателлитные маркеры lw-isotig11166 и lw-isotig20215, позволяющие выявить до 6 аллелей в локусе. Эти маркеры обладали высоким уровнем полиморфизма (PIC от 0.55 до 0.81). В дальнейшем эти результаты лягут в основу изучения соматклональной изменчивости у растений-регенерантов сосны обыкновенной.

Исследование выполнено за счет средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН.

Оценка устойчивости растений семейства *Fabaceae* к условиям нефтяного загрязнения

Сотникова Ю.М., Гризориади А.С., Фархутдинов Р.Г.

Башкирский государственный университет, ул. Заки Валиди 32, г. Уфа, Россия.
sotnikova-bashedu@mail.ru

В настоящее время проведено множество исследований по изучению адаптационного потенциала растений в условиях нефтяного загрязнения. Установлены положительное и отрицательное влияние нефти и нефтепродуктов на растения. Морфометрические показатели растений, произрастающих на нефтезагрязненных почвах, зависят от концентрации и типа нефтепродуктов, продолжительности влияния загрязнителя, вида растений и почвенно-климатических условий. Целью данного исследования являлось определение видов растений наиболее устойчивых к нефтяному стрессу.

В качестве объектов исследования были выбраны растения семейства *Fabaceae*: *Medicago sativa*, *Vicia sativa*, *Melilotus officinalis*, *Trifolium pratense*. В ходе опыта фиксировали всхожесть семян исследуемых растений в условиях загрязнения нефтяными углеводородами и морфометрические показатели (длина наземной части проростков и корней). Производилась обработка почвы загрязнителями разных концентраций (4, 6, 8%): нефть, моторное масло и дизельное топливо.

По результатам оценки различий всхожести растений среднее значение у люцерны в условиях загрязнения 4% нефтью было больше, чем у клевера и донника примерно в 0,22 и 1,37 раза соответственно, и в 2 раза больше, чем у вики. В контроле же среднее значение люцерны по сравнению с донником отличается в 1,14 раза; с клевером в 1,11 раза; с викой в 1,01 раза. Оценка различий длины побега растений показала, что среднее значение у люцерны в условиях загрязнения 4% нефтью незначительно превышает средние значения клевера и донника, но в 2,58 раза больше, чем у вики. В контроле среднее значение люцерны по сравнению с клевером отличается на 0,65; с донником на 0,45; с викой на 0,95.

Полученные результаты показали, что наиболее устойчивым объектом исследования явилась люцерна посевная (*Medicago sativa*). Наибольшее негативное влияние из загрязнителей оказывали дизельное топливо 8% и моторное масло 8%. Наименьшее влияние на морфометрические показатели оказывала нефть в концентрации 4%.

Важным параметром оценки влияния внешних факторов на развитие растений являются изменения в содержании пигментов в листьях растений. Исследование показало, что загрязнение нефтью не оказало значимого влияния на содержание хлорофилла а в листьях растений люцерны посевной, но приводило к уменьшению содержания хлорофилла b в листьях растений люцерны, а обработка препаратом не влияла на содержание данного пигмента.

Определение активности каталазы показало, что при загрязнении почвы 4 % нефтью происходило увеличение активности каталазы в побегах растения *Medicago sativa* L. Однако в условиях загрязнения почвы нефтью 6 и 8%, данный показатель был значительно ниже.

При определении активности каталазы в корнях растения *Medicago sativa* L. были получены иные результаты. Так, в загрязненной 4%-ой нефтью почве активность каталазы была ниже, чем в контрольном варианте, но при загрязнении 6 и 8 %-ой нефтью, наблюдалось незначительное снижение активности каталазы.

Результаты исследования показали, что в активность фермента в ответ на загрязнение была выше в побегах и ниже в корнях. Также можно наблюдать отличие в ферментативной активности при разных концентрациях загрязнения почвы. Учитывая, что активность ферментов зависит от продолжительности воздействия стресс-факторов и сопровождается изменением активности других сопряженных ферментов, можно предположить, что активность фермента могла увеличиваться в ответ на загрязнение почвы нефтью на ранних этапах роста растений, а к концу эксперимента (спустя 2 месяца) снизиться на фоне повышения активности других антиоксидантных ферментов. При более высоких концентрациях нефти активность фермента ингибировалась. Данные изменения также свидетельствуют о способности *Medicago sativa* L. противостоять токсическому воздействию на ранних этапах исследуемых концентраций нефтяного загрязнения почвы.

Пигментный комплекс растений, произрастающих на побережье Белого моря в окрестностях поселков Кереть и Растьнаволок

Успенская А.В., Стародубцева А.А., Марковская Е.Ф.

Петрозаводский государственный университет, пр. Ленина 33, Петрозаводск, Россия.
korzunina84@mail.ru

Приливно-отливная зона Северных Голарктических морей является особым местообитанием прибрежно-водных растений. Растения, произрастающие на этих территориях, вырабатывают ряд приспособлений к нестабильным условиям: ежесуточное заливание водой, смена режима освещенности и смена солености. Условия произрастания, в первую очередь, сказываются на функционально значимых показателях пигментного аппарата (доле хлорофиллов в светособирающем комплексе (ССК), соотношении хлорофиллов *a* и *b*, сумме зеленых и желтых пигментов). Целью исследования было определить характеристики пигментного аппарата у растений, произрастающих на побережье Белого моря, и выявить перспективные для фитоиндикации виды.

Исследование содержания фотосинтетических пигментов проведено спектрофотометрически по общепринятым методикам (методикам (Сапожников и др., 1978; Lichtenthaler, 1987; Maslova, 1993). Материал для исследования был собран в 2017 г. в окрестностях пос. Растьнаволок (Беломорский район) и в 2018 г. в окрестностях пос. Кереть (Лоухский район). Содержание хлорофиллов (*a+b*) и доля пигментов в светособирающем комплексе (ССК) определены в 3 биологических повторностях в каждой точке исследования. Исследовано 9 видов, произрастающих в обеих точках исследования: *Lathyrus aleuticus*, *Chamaepericlymenum suecicum*, *Ligusticum scoticum*, *Leymus arenarius*, *Triglochin maritima*, *Glaux maritima*, *Plantago maritima*, *Plantago schrenkii*, *Tripolium vulgare*.

Содержание хлорофиллов было выше у растений супралиторали, эти растения в меньшей степени подвержены влиянию моря и только обрызгиваются соленой водой во время штормов, произрастают в условиях хорошей освещенности. У четырех видов супралиторали (*Ligusticum scoticum*, *Leymus arenarius*, *Lathyrus aleuticus*, *Chamaepericlymenum suecicum*) среднее содержание суммы хлорофиллов составляет – $1,18 \pm 0,19$ мг/г сыр. м. На литорали растения дважды в сутки во время прилива полностью затапливаются водой, при этом резко изменяются условия их существования. Уровень освещенности под водой падает. У исследованных литоральных видов (*Triglochin maritima*, *Glaux maritima*, *Plantago maritima*, *Plantago schrenkii*, *Tripolium vulgare*) содержание суммы хлорофиллов ниже в 1,4 раза, чем у супралиторальных видов и в среднем составляет $0,84 \pm 0,40$ мг/г сыр. м. Низкое содержание пигментов в расчете на сырую массу можно также объяснить анатомическими особенностями строения листьев, у *Triglochin maritima*, *Plantago maritima*, *Pl. schrenkii*, *Tripolium vulgare* листья толстые, имеют внутри значительный слой паренхимы или аэренхимы. Среди литоральных видов по содержанию хлорофиллов отличается от остальных видов *Glaux maritima*, в листьях этого растения содержание хлорофиллов сравнимо с супралиторальными видами. При сравнении данных из двух точек исследования отмечено, что некоторые виды имеют довольно близкие значения содержания хлорофиллов (*a+b*) (*Lathyrus aleuticus*, *Chamaepericlymenum suecicum*, *Leymus arenarius*, *Plantago schrenkii* и *Tripolium vulgare*). Наибольшая разница по этому показателю зафиксирована у *Ligusticum scoticum* – в Керети содержание хлорофилла составило $1,19 \pm 0,19$ мг/г сыр. м., а в Растьнаволоке $0,94 \pm 0,06$ мг/г сыр. м.

Доля пигментов в светособирающем комплексе (ССК) у исследованных видов была 29-62%. Значение ССК для литоральных видов в среднем составило $41,5 \pm 10,3\%$, для супралиторальных $41,3 \pm 8,5\%$. У четырех видов значения ССК в разных точках исследования не отличались (*Lathyrus aleuticus*, *Leymus arenarius*, *Plantago schrenkii* и *Glaux maritima*). При этом у *Glaux maritima* в отличие от остальных перечисленных видов при одинаковых значениях ССК, содержание хлорофиллов в листьях отличается. У *Chamaepericlymenum suecicum* значения ССК различаются в 2 раза $29,6 \pm 0,7\%$ (Кереть) и $58 \pm 2,8\%$ (Растьнаволок), однако значения содержания хлорофиллов были схожими, это свидетельствует о том, что вид приспособляется к изменяющимся условиям произрастания: реагирует изменением доли пигментов в светособирающем комплексе, а не изменением абсолютного содержания пигментов. Такая же реакция наблюдается у *Tripolium vulgare* (ССК в Керети – $48,3 \pm 2,1\%$, а в Растьнаволоке – $29 \pm 4,2\%$).

Наиболее чувствительными видами из исследованных к условиям произрастания на литорали оказались *Ligusticum scoticum*, *Triglochin maritima* и *Plantago maritima*, в двух точках исследования у них изменялось и содержание хлорофиллов, и доля хлорофиллов в ССК. У двух видов *Tripolium vulgare* и *Chamaepericlymenum suecicum* варьировали только значения ССК, а у *Glaux maritima* только содержание пигментов. Два вида имели одинаковые значения и содержания пигментов и ССК *Lathyrus aleuticus* и *Plantago schrenkii*.

В работе получены данные о содержании фотосинтетических пигментов и значения ССК у 9 видов приливно-отливной зоны. Перспективными для биоиндикации видами являются *Ligusticum scoticum*, *Triglochin maritima* и *Plantago maritima*, так как они имеют варьирующие значения исследованных показателей и широко распространены на побережье Белого моря. Кроме того, в качестве видов биоиндикаторов могут быть рассмотрены *Tripolium vulgare* и *Glaux maritima*, также широко распространенные на побережье, однако оказавшиеся менее чувствительными по результатам исследования.

Потенциальная роль эндофитных бактерий как адаптогенов растений к действию ультрафиолетового света

Смирнова Ю.В. *, Сарварова Е.Р. **, Хайруллин Р.М. **

* Стерлитамакский филиал ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет».

Пр. Ленина, 47, Стерлитамак, Россия.

** Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра РАН.

Пр. Октября, 71, лит. Е, Уфа, Россия.

bh84@mail.ru

Фенольные соединения – один из наиболее распространенных и многочисленных классов природных веществ, выполняющих в растительном организме разнообразные физиологические функции, участвующих в регуляции роста клеток, в формировании клеточных стенок, в процессах дыхания и фотосинтеза и др. Известно, что ультрафиолетовое излучение (УФ-свет) оказывает значительное влияние на содержание в растениях фенольных соединений, которые способны играть роль в фотозащите растений благодаря УФ-экранированию и антиоксидантным свойствам. В ряде работ показана протекторная роль фенольных соединений от коротковолновых УФ-лучей в отношении фотосинтетического и генетического аппарата растительных клеток.

В настоящее время в научной литературе имеются свидетельства, что на содержание фенольных соединений в растительных тканях способны влиять некоторые представители эндофитных бактерий. Одной из них является ростстимулирующая бактерия *Bacillus subtilis* штамм 26Д. Известно, что эндофитные бациллы способны повышать устойчивость растений к действию засухи, переувлажнения, тяжелых металлов. Крайне мало сведений о влиянии эндофитных штаммов *B. subtilis* на устойчивость растений к ультрафиолетовому излучению.

Поэтому целью работы явилось изучение влияния предобработки семян клетками бактерий *B. subtilis* 26Д на содержание фенольных соединений в тканях побегов *Sinapis alba* L. (сорт Рапсодия) при действии коротковолнового УФ-света. Для этого калиброванные семена промывали в мыльной и дистиллированной воде, затем обрабатывали клетками *B. subtilis* 26Д (ВНИИСХМ, №128) из расчета на 1 г семян 20 мкл суспензии бактерий в концентрации 10^6 кл./мл. Семена контрольных растений обрабатывали дистиллированной водой. Растения выращивали в почве (чернозем выщелоченный) 30 дней при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$ на дневном свете в пластиковых вегетационных сосудах. Затем проростки 30 мин освещали коротким ультрафиолетовым светом с пиком 253,7 нм (облучатель ОБН-35 «Азов»). Пробы отбирали одновременно во всех вариантах опыта в трёх биологических повторах через 2, 4, 6, 12 и 24 ч после воздействия УФ-света. Содержание растворимых фенольных соединений определяли согласно методу Фолина-Чокальтеу (1927) в модификации Синглетона и Росси (1965). Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Microsoft Office Excel 2007. Для выявления значимых различий между вариантами опыта использовали t-критерий Стьюдента.

У проростков горчицы, обработанных клетками *B. subtilis* 26Д и не испытывавших воздействия УФ-излучения, уровень фенольных соединений в побегах растений был ниже, в среднем на 10% в сравнении с необработанными бактериями и не подвергшихся фотострессу. В тканях растений, не инокулированных клетками эндофита и подвергшихся воздействию УФ-света, уровень фенольных соединений на всем протяжении эксперимента был повышенным в среднем на 65% по отношению к облученным необработанными бактериями растениям. Наибольшее увеличение содержания фенольных соединений происходило при этом через 2 ч и 6 ч после воздействия, на 71 и 89%, соответственно.

После воздействия УФ-света в тканях обработанных бактериями растений также наблюдали повышение уровня фенольных соединений, еще более значительное в сравнении с необработанными растениями, но только в первые часы после воздействия. Так, через 2 часа после фотовоздействия уровень содержания фенольных соединений повышался в 2,5 раза по сравнению с таковым показателем у необлученных обработанных растений и в 2,8 раза в сравнении с необработанными растениями, подвергшимися действию УФ-света. Затем отмечали плавное снижение уровня фенолов в тканях инокулированных эндофитом растений, и через 24 ч этот показатель у обработанных растений, подвергшихся облучению УФ-светом, достоверно не отличался от показателя у инокулированных растений, не подвергшихся стрессу.

При облучении УФ-светом содержание растворимых фенольных соединений в тканях как необработанных, так и инокулированных бактериями растений *S. alba*, повышалось. При этом инокуляция семян клетками эндофита способствовала более значительному увеличению в тканях содержания фенолов при УФ-облучении в сравнении с неинокулированными растениями. Учитывая, что фенольные соединения способны защищать растительные клетки от ультрафиолета, в том числе солнечного света, которое является естественным фактором среды обитания высших растений, в данной работе мы расширяем представление о роли эндофитных мутуалистических бактерий в жизни как своеобразных потенциальных адаптогенов к обитанию растительного макроорганизма на Земле.

Работа частично выполнена в рамках выполнения Государственного задания РФ №АААА-А16-116020350027-7.

Прайминг растений картофеля лактон- и кетон-содержащими brassinosterоидами при последующем хлоридном засолении

Ефимова М.В.

Национальный исследовательский Томский государственный университет,
пр. Ленина 36, Томск, Россия.
stevmv555@gmail.com

Примерно 50% орошаемых и 20% обрабатываемых земель относятся к категории засоленных территорий. В основе негативного действия высоких концентраций солей на растения лежит нарушение осмотического статуса и ионного гомеостаза, а также проявление токсического действия неорганических ионов на клеточный метаболизм. Окислительный и осмотический стрессы приводят к снижению интенсивности фотосинтеза, падению продуктивности, ускорению процессов старения и могут вызывать гибель растений.

Повышение устойчивости растений к засолению во многом определяется факторами гормональной природы. Стероидные гормоны растений – brassinosterоиды являются перспективными соединениями для создания эффективных экологически безопасных регуляторов. В настоящее время известно более 70 представителей этого класса соединений, некоторые из них получены путем химического синтеза. Лучше всего охарактеризованы brassinолид, 24-эпibrassinолид и 28-гомобрassinолид, отличающиеся лактонной структурой цикла В стероидного скелета и представляющие собой заключительное звено в цепи биосинтеза структур с высокой фитогормональной активностью. Практически отсутствует информация о биологических эффектах других групп стероидных фитогормонов, в частности, производных 6-кето- ряда (24-эпикастастерона, 28-гомокастастерона и т.д.) – биогенетических предшественников лактонов, проявляющих во многих тестах столь же высокую биологическую активность. В последнее время была существенно расширена область агроприложений стероидных фитогормонов и созданы новые способы и средства повышения с их помощью урожайности и качества продукции растениеводства. Определённый успех в этом направлении исследований может быть связан с изучением эффекта кратковременной обработки растений brassinosterоидами до стрессового воздействия.

Было исследовано влияние 4-х часовой обработки лактон- (24-эпibrassinолид) и кетон- (24-эпикастастерон) содержащими brassinosterоидами на ростовые (длина осевых органов, площадь листовой поверхности, количество столонов, сырая и сухая масса растений) и физиологические (интенсивность перекисного окисления липидов, величину осмотического потенциала клеточного экссудата, содержание пролина, фотосинтетических пигментов, флуоресцентных показателей, отражающих фотохимическую активность фотосинтетического аппарата растений, активность антиоксидантных ферментов, содержание неорганических ионов) показатели растений картофеля.

Исследования проводили на *Solanum tuberosum* L. среднеспелого сорта Луговской (идентификатор 8301891), широко распространенного в Центральных регионах России и в Сибирском регионе.

Оздоровленные растения-регенеранты картофеля *in vitro* получали из апикальной меристемы и на протяжении 21 суток культивировали на агаризованной питательной среде Мурасиге и Скуга с половинным содержанием макро- и микроэлементов ($1/2$ МС). Корни растений отмывали от агаризованной среды и проводили двухнедельную адаптацию микроклонов к жидкой среде $1/2$ МС и условиям воздушной среды под люминесцентными лампами L36W/77 Fluora («Osram», Германия) при плотности потока квантов ФАР 200–250 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ в фитотроне с 16-часовым фотопериодом и температурой 20° ± 3°С. После 2-недельного роста растений на гидропонной установке в среде $1/2$ МС пятинедельные растения переносили на 4 часа на ту же самую среду (контрольный вариант) или на раствор, содержащий brassinosterоиды в концентрации 0,1 нМ. После 4-х часовой экспозиции растения переносили в раствор $1/2$ МС на 20 часов. В дальнейшем растения помещали на питательную среду $1/2$ МС (контрольный вариант) или питательную среду $1/2$ МС с добавлением 125 мМ NaCl (опытные варианты). Через 6 суток растительный материал фиксировали и использовали его для проведения анализов.

Было показано, что кратковременная корневая предобработка растений картофеля 24-эпикастастероном способствует увеличению количества столонов, ярусов, суммарной площади листовой поверхности и содержания хлорофиллов в отсутствие действия стрессора. Корневая предобработка (прайминг) растений картофеля 24-эпibrassinолидом снижает отрицательное воздействие последующего хлоридного засоления на ростовые показатели, содержание фотосинтетических пигментов, максимальный и эффективный квантовые выходы второй фотосистемы, коэффициенты фотохимического тушения флуоресценции qP. Протекторный эффект гормонов достигался за счёт снижения атомарной доли ионов хлора и натрия и увеличения активности антиоксидантных ферментов, хотя содержание пролина при этом уменьшалось. Более выраженный защитный эффект при действии хлоридного засоления показал лактонсодержащий 24-эпibrassinолид.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 20-54-00013-Бел_а).

Пренилирование белков в развитии таллома *Marchantia polymorpha*

Валева Л.Р.^{*}, Ибрагимова С.М.^{*}, Йошитаке Й.^{**}, Кочи Т.^{**},
Мамаева А.С.^{***}, Шарипова М.Р.^{*}

^{*} Казанский федеральный университет. ул. Парижской коммуны, 9, Казань, Россия.

^{**} Высшая школа биологических исследований, Киотский университет. Киото 606-8502, Япония.

^{***} Институт Биоорганической химии РАН. ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, Россия.

lia2107@yandex.ru

Пренилирование белков – одна из важнейших посттрансляционных модификаций, необходимых для нормального функционирования различных клеточных механизмов, таких как сигнальная трансдукция, полярный рост клеток, модификации мембран и клеточной стенки. Все перечисленные процессы представляют неотъемлемую часть функционирования многоклеточных организмов. Переход к многоклеточности является одним из наиболее важных событий в эволюции живых организмов, однако многое остается неизвестным о данном процессе. Изучение механизмов регуляции, задействованных в образовании многоклеточных организмов, позволит раскрыть ранее неизвестные факты об эволюции многоклеточности. Использование растений, в частности, новых модельных организмов, таких как печеночники *Marchantia polymorpha*, представляет большой интерес, поскольку в царстве растений переход к многоклеточности происходил независимо несколько раз.

Целью работы было изучение роли пренилирования белков в регуляции развития многоклеточного таллома *M. polymorpha*.

В геноме *M. polymorpha* было обнаружено 5 генов субъединиц пренилтрансфераз: ген общей альфа-субъединицы пренилтрансферазы PLP (Mapoly0093s0047), ген бета-субъединицы фарнезилтрансферазы ERA (Mapoly0123s0027), ген бета-субъединицы геранилгеранилтрансферазы I GGB (Mapoly0010s0084), альфа-субъединицы Rab-геранилгеранилтрансферазы Rab-GGTA (Mapoly0151s0003), ген бета-субъединицы Rab-геранилгеранилтрансферазы Rab-GGTB (Mapoly0074s0013). Нокаутирование генов проводили с помощью CRISPR/Cas9 технологии. Были получены линии *M. polymorpha* с мутациями: гена α -субъединицы, общей для PFT и PGGT (*Δplp*); гена β -субъединицы PFT (*Δera1*); гена β -субъединицы PGGT (*Δggb*). Показано, что мутации в генах *Δplp* и *Δggb* *M. polymorpha* приводят к неспособности образовывать нормальный таллом и формированию каллусоподобных тканей. Хотя у мутантов *Δplp* и *Δggb* маршанции сохранялась многоклеточная структура, однако, скопления клеток мутантов легко разобшались на фрагменты, что также может быть обусловлено дефектами в межклеточных контактах и адгезивных свойствах клеток. В свою очередь, мутантные растения *Δera* были способны формировать дорсо-вентральный таллом. Комплементация полученных мутантов подтвердила необходимость пренилирования белков в формировании таллома маршанции. Предварительный протеомный анализ мутантных растений показал отсутствие у них ряда белков, характерных для дикого типа.

Таким образом, мы предполагаем, что влияние на развитие растений оказывает нарушение функционирования геранилгеранилтрансферазы I. В дальнейшем будут идентифицированы гены белков-кандидатов регуляции развития многоклеточного таллома *M. polymorpha*. Изучение роли пренилирования белков в регуляции многоклеточного плана строения позволит получить новые знания об эволюции многоклеточности.

Работа выполнена в рамках проекта, поддержанного Стипендией Президента РФ СП-3391.2021.4.

**Прогестероновая система гормональной регуляции у высших растений:
характеристика основных компонентов и биологическая роль**

Шпаковский Г.В.^{*, *****,¹}, **Бабак О.Г.**^{**}, **Халилуев М.Р.**^{***}, **Баранова Е.Н.**^{***}, **Спивак С.Г.**^{** ****}, **Словохотов И.Ю.**^{*},
Шпаковский Д.Г.^{*}, **Терешонкова Т.А.**^{*****}, **Шематорова Е.К.**^{*}, **Кильчевский А.В.**^{***}

* ФГБУН Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Лаборатория механизмов геномной экспрессии, Москва, Россия.

** Государственное научное учреждение Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.

*** ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, Россия.

***** Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь.

***** Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства (ВНИИО) – филиал ФГБНУ

***** «Федеральный научный центр овощеводства», Московская область, Раменский район, д. Веря, Россия.

Лаборатория механизмов геномной экспрессии; НИЦ «Курчатовский институт»¹, Москва, Россия.

yushpak57@mail.ru¹

В высших растениях, наряду с brassinosterоидной, функционирует и другая, прогестероновая система стероидной гормональной регуляции [1]. В данной работе на примере растений семейства Solanaceae (томат, табак, картофель) показана важность этой системы для формирования комплексной защиты растений от биотических (инфекции фитопатогенами *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Oidium neolycopersici* и др.) и абиотических (засуха, засоление, низкие температуры) стрессов. Охарактеризованы основные фенотипические эффекты повышения уровня эндогенного прогестерона вследствие интеграции митохондриального цитохрома P450sc (CYP11A1) животных в стероидогенную систему томата *Solanum lycopersicum* L. Дана всесторонняя физиолого-биохимическая характеристика двух трансгенных линий томата с гибридными гормональными системами и контрольного трансформируемого сорта в поколениях T4 и T5. Показано, что цитохром CYP11A1 способен обеспечить направленную защиту митохондрий в листьях растений табака *Nicotiana tabacum* L. при засолении [2]. Эффекты экзогенного применения прогестерона изучены на примере развития проростков трёх сортов картофеля *Solanum tuberosum* L. (Индиго, Чикаго и 12-48-15): растения культивировались на среде с различными концентрациями прогестерона (0,001 и 0,01 мкг/мл) в течение 15 дней. Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что присутствие прогестерона в среде в концентрации 0,01 мкг/мл стимулирует увеличение биомассы растений, а также ускоряет их рост.

На основании полученных экспериментальных данных и биоинформационного анализа предсказано участие в прогестероновой системе таких белков, как ряд специфичных для растений цитохромов из семейств CYP90B, CYP72A (C-22 холестерин гидроксиллазы и оксидазы) и CYP71D (C-20 стероид гидроксиллазы), митохондриальные ферредоксинредуктаза MFDR и аденодоксинаподобные [2Fe-2S]-ферредоксины MFDX1 и MFDX2 [3], мембранные рецепторы и ко-рецепторы прогестерона MSBP1, MSBP2 и BIK1, белок транспорта холестерина и других фитостероинов TSPO (PBR).

Созданы перспективные селекционные образцы томата с повышенным синтезом эндогенных прегненолона и прогестерона, совмещающие встройку целевого гена *CYP11A1* и аллели устойчивости к мелойдогенозу (Mi-1.2), кладоспориозу (Cf-4), фузариозу (I-2), аллели гена Sp, определяющего тип роста растения. Отобраны формы, характеризующиеся комплексом ценных признаков: устойчивостью к болезням, засухе, повышенным накоплением каротиноидов, высокой продуктивностью. Выявлен различный характер экспрессии гена *CYP11A1* у трансгенных линий томата №4 и №7 (поколение T5) и перечисленных выше гибридов F3 с их участием.

Полученные результаты могут быть использованы в дальнейших научных исследованиях взаимодействия прогестероновой и brassinosterоидной систем между собой и с другими группами растительных гормонов с целью разработки селекционных программ, направленных на создание сортов и гибридов овощных культур с высоким качеством плодов и устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессам.

1. Shpakovski G.V., Spivak S.G., Berdichevets I.N., Babak O.G., Kubrak S.V., Kilchevsky A.V., Aralov A.V., Slovokhotov I.Yu., Shpakovski D.G., Baranova E.N., Khaliluev M.R., Shematorova E.K. A key enzyme of animal steroidogenesis can function in plants enhancing their immunity and accelerating the processes of growth and development. BMC Plant Biology, Vol. 17 (Suppl 1): 189 (2017).

2. Baranova E.N., Khaliluev M.R., Spivak S.G., Bogoutdinova L.R., Klykov V.N., Babak O.G., Shpakovski D.G., Kilchevsky A.V., Shematorova E.K., Shpakovski G.V. Targeted protection of mitochondria of mesophyll cells in transgenic CYP11A1 cDNA expressing tobacco plant leaves after NaCl induced stress damage. Proc. Latvian Acad. Sci., Section B: Natural, Exact and Applied Sciences, Vol. 72, No. 6 (717), pp. 334-340 (2018).

3. Shematorova E.K., Slovokhotov I.Yu., Shmakov V.N., Khaliluev M.R., Shpakovski D.G., Klykov V.N., Babak O.G., Spivak S.G., Konstantinov Yu.M., Shpakovski G.V. Novel interactions of adrenodoxin-related [2Fe-2S] plant ferredoxins MFDX1 and MFDX2 indicate their involvement in a wide spectrum of functions in plant mitochondria. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B: Natural, Exact and Applied Sciences, Vol. 73, No. 6 (723), pp. 478-486 (2019).

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-04-01262.

Программа прорастания семян – от раннего эмбриогенеза до развития корня

Обручева Н.В.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева, Ботаническая ул. 35, Москва, Россия.
n.obroucheva@mail.ru

Среди многочисленных данных по развитию семян, полученных на различных уровнях в последние годы, предстояло вычлнить основную линию развития, которая обеспечивает программу успешного прорастания и ее регуляцию. Для этой цели было использовано программирование, позволившее выразить динамику событий как «написание» программы, ее «сохранение» и «реализация» программы. Для простоты были проанализированы данные по зародышевым осям у непокоящихся ортодоксальных семян, в которых и развиваются события, ведущие к прорастанию.

Программирование прорастания начинается вскоре после оплодотворения под контролем последовательно синтезированных цитокининов, ауксина и гиббереллинов. Действие этих фитогормонов продолжается до самого конца прорастания. Раннее программирование иллюстрируется дифференцировкой покоящегося центра в верхней клетке гипофиза после первого деления зиготы, хотя развитие его в растущий корень произойдет после проклевывания. Готовность к прорастанию проявляется к концу позднего эмбриогенеза по способности семян к преждевременному прорастанию (живорождению). Прекращение делений достигается накоплением АБК, которая способствует инициации созревания, вызывая АБК-зависимое образование долгоживущей мРНК и запасных соединений. Сохранение программы происходит связыванием транскриптов с полирибонуклеотидами вплоть до начала набухания. На этом роль АБК заканчивается, экспрессируется 8'-оксигидролаза АБК, разрушающая АБК, а также с помощью 26S-протеасом деградируют ее рецепторы и сигнальная система. Метаболизм начинается в результате набухания имеющихся в сухих семенах ферментов, выше 60% влажности возможны *de novo* трансляция и транскрипция. Максимальное использование долгоживущих мРНК достигается к середине набухания, после его они окисляются. Для надежности программа рибосомальных белков и белков домашнего хозяйства частично дублируется, возможно считывание новых генов. Подготовка к проклевыванию и началу растяжения клеток заключается в реставрации вакуоли из белковых тел, синтезе вакуолярной АТФазы и тонопластных аквапоринов, а также в модификации полимеров клеточных стенок, приводящей к повышению их растяжимости. Механизм модификации заключается в активации плазмалеммной H^+ -АТФазы при 50% влажности, возрастании ее активности перед проклевыванием и выносу потока H^+ ионов в клеточную стенку, где при подкислении частично расщепляются ксилоглюканы и нарушаются водородные связи ксилоглюканов с микрофибриллами целлюлозы. Под давлением тургора клеточная стенка размягчается и начинается растяжение клеток при проклевывании. Для успешного прорастания выгодно именно растяжение клеток, описанный запуск которого не зависит от делений. Заключительный этап программы прорастания - развитие корня из покоящегося центра в корешке. Таким образом реализуется компетентная, надежно сохраненная, быстрая и успешная программа прорастания семян. Программа проростка начинается с роста стебля и листочков.

Продукция этилена отделёнными листьями растений *Arabidopsis thaliana* дикого типа и этилен-нечувствительного мутанта *ein2-1* при действии синтетического ауксина – 2,4-Д

Носов А.В., Фоменков А.А., Новикова Г.В., Ракитин В.Ю.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия
alexv.nosov@mail.ru, artem.fomenkov@gmail.com, gv.novikova@mail.ru, rakit@ippras.ru

Известно, что экзогенное воздействие ИУК и синтетических ауксинов, в том числе 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), активирует экспрессию генов и соответственно синтез *de novo* отдельных изоформ синтазы 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (ACS), которая является ключевыми ферментами в биосинтезе этилена. При этом 2,4-Д не влияет на экспрессию гена *EIN2 A. thaliana* и подобного ему гена у томата, кодирующего белок главного позитивного регулятора пути передачи этиленового сигнала. Однако функционирование EIN2 важно для проведения сигнала этилена и усиления его синтеза по автокаталитическому механизму за счёт активации ACS.

Ранее нами было показано (doi: 10.3389/fphys.2017.00142), что суспензионные культуры клеток *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. дикого типа Col-0 и этилен-нечувствительного мутанта *ein2-1* (штаммы NFC-0 и NFCE-2 соответственно), культивируемые на среде SH в присутствии 4.5 мкМ 2,4-Д, резко отличались по продукции этилена, хотя были схожи по интенсивности пролиферации. Клетки NFC-0 в логарифмической фазе роста синтезировали в 60 раз больше этилена, чем клетки NFCE-2. В связи с этим возникло предположение о нарушенной восприимчивости к 2,4-Д растений *ein2-1* и соответственно культивируемых клеток NFCE-2.

Для проверки этого предположения в экспериментах по экзогенной обработке 2,4-Д использовали листья 2–3 ярусов 5-недельных растений дикого типа и мутанта *ein2-1*, выращенных в почве в условиях фитотрона (24°C, световой день 8 ч, интенсивность света 150 мкмоль/(м²·с)). Листья отделяли от растений и помещали по 10 шт. для каждого варианта в чашки Петри со средой SH (полная среда без фитогормонов с 0.05% Tween-20 и 10 мМ MES, pH 5.7) без 2,4-Д или с добавлением 1, 5 или 25 мкМ 2,4-Д и инкубировали 1 ч. Затем с листьев тщательно удаляли среду и 5 листьев помещали в сухую чашку Петри, под крышкой которой находилась влажная фильтровальная бумага и оставляли на 24 ч при 26°C на рассеянном свете. Продукцию этилена этими листьями определяли через сутки. Оставшиеся 5 листьев помещали в стеклянные 15-миллилитровые флаконы с влажной фильтровальной бумагой, герметично закрывали пробками из самоуплотняющейся резины (Suba-Seal septa red rubber, “Sigma-Aldrich”) и инкубировали 1 ч при 26°C в темноте. Определение этилена проводили в газовом хроматографе Цвет 106 (Россия) с пламенно-ионизационным детектором. Концентрирование углеводов проводили в колонке (80–100 меш, 70 × 4 мм) Porapak N (“Supelko”, США) при –30°C. После десорбции при 50°C этилен определяли в колонке (80–100 меш, 3 мм × 2 мм) Porapak N.

Уже примерно через 3 ч после отделения от растений, включая часовую инкубацию с 2,4-Д и часовую экспозицию в закрытых флаконах, листья обоих генотипов продемонстрировали значительную продукцию этилена, как без обработки 2,4-Д, так и в вариантах с его разными концентрациями. После второй и третьей экспозиций листьев в закрытых флаконах и измерений выявилась слабая зависимость продукции этилена от концентрации 2,4-Д, постепенное падение выделения этилена листьями растений дикого типа и стабилизация процесса во всех вариантах с листьями растений *ein2-1*. При этом третье измерение показало двукратное превышение продукции этилена в вариантах с *ein2-1* по сравнению с листьями растений дикого типа.

Безусловно, картина продукции этилена в первые часы после отделения листьев от растений является суперпозицией эффекта поранения и действия 2,4-Д с преобладанием выделения раневого этилена. Известно, что в ответ на механическое повреждение в растениях в течение нескольких минут увеличивается синтез этилена и отвечают за этот процесс ACS2, ACS6, ACS7 и ACS8, одновременно находящиеся под контролем модуля митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) с участием МРК3/6 и предшествующих им МКК4/5 и кальций-зависимых протеинкиназ СРК5/6. Более значительное и продолжительное выделение раневого этилена листьями растений *ein2-1*, например, можно было бы объяснить большей активностью и/или стабильностью универсальных компонентов МАРК-модуля, уже готовых к работе в разных сигнальных системах, в том числе и в проведении сигнала этилена в обстоятельствах дисфункции EIN2.

Спустя сутки, «раневого» сигнал затихает и отчётливо проявляется действие 2,4-Д на продукцию этилена. В контрольном варианте листья растений *ein2-1* выделяли почти в три раза больше этилена, чем листья растений дикого типа (1.27±0.2 против 0.44±0.14 нл/(г·ч)), что соответствует данным литературы. При этом наблюдали превышение в ~1.6 раза выделения этилена листьями растений дикого типа и положительную зависимость процесса от концентрации 2,4-Д.

Таким образом, листья растений *A. thaliana* дикого типа и мутанта *ein2-1* способны активировать продукцию этилена при поранении и в присутствии экзогенного 2,4-Д. Выявленные различия в действии 2,4-Д на выделение этилена листьями растений не объясняют значительную разницу в продукции этилена культивируемыми клетками штаммов NFC-0 и NFCE-2 и скорее связаны с другими причинами, в которых нам предстоит разобраться.

Работа выполнена при финансовой поддержке Мегагранта Правительства Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1882) и частичной поддержке РФФИ (грант № 20-04-00757).

Пространственное распределение белков группы PIN1 при инициации бокового корня в апикальной меристеме родительского корня огурца (*Cucumis sativus*)

Ильина Е.Л., Кирюшкин А.С., Гусева Е.Д., Федий С.Б., Демченко К.Н.

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН,
ул. Профессора Попова, д.2, Санкт-Петербург, Россия.
eilina@binran.ru

Растения в силу прикрепленного образа жизни должны тонко регулировать свои ростовые реакции в ответ на действие факторов внешней среды. В функции корневой системы входит закрепление побеговой части растения в почве и обеспечение минерального питания. Обе задачи осуществляются за счёт ветвления корневой системы через формирование боковых корней (БК). Ключевую роль во всех стадиях образования БК от инициации до выхода из тела родительского корня во внешнюю среду играет фитогормон ауксин. Ауксин действует путём образования локальных максимумов и градиентов концентрации, что формирует позиционную информацию, необходимую для закладки и роста БК. В этом процессе активное участие принимают белки-транспортёры ауксина семейства PIN, осуществляющие направленный транспорт ауксина из клетки. В литературе описано распределение белков семейства PIN в корне *Arabidopsis thaliana*, в том числе на разных стадиях развития БК, но данные о распределении и составе белков PIN у других видов ограничены. У нескольких филогенетически неродственных групп растений, в том числе у Тыквенных, инициация БК происходит в апикальной меристеме родительского корня в отличие от большинства цветковых растений, включая *A. thaliana*, у которых БК инициируются выше зоны растяжения. В предыдущих работах нашей группы с использованием ауксин-чувствительного промотора *DR5* показано участие ауксина на всех этапах инициации БК в меристеме родительского корня кабачка и огурца, представителей семейства Тыквенные, но осталось неясным, каким образом формируются локальные максимумы ответа на ауксин в отдельных клетках перидикла. Целью данной работы было изучить пространственное распределение белков-транспортёров ауксина группы PIN1 при инициации БК в апикальной меристеме родительского корня огурца.

Объектом данного исследования является огурец (*Cucumis sativus* L.), представитель семейства Тыквенные. Сравнительный филогенетический анализ белковых последовательностей PIN *Arabidopsis*, томата, ели и огурца выявил 8 представителей белков семейства PIN у огурца. Ортологами гена *PIN1 Arabidopsis* являются гены *CsPIN1a*, *CsPIN1b*, *CsSoPIN1*. Нами были клонированы промоторные и кодирующие последовательности этих генов. Для локализации белков группы CsPIN1 были получены генетические конструкции на основе модифицированного вектора 236 pKGW-RR-MGW, содержащего кассету для визуализации ответа на ауксин *DR5::mRuby3-H2B*, методом рекомбинации Gateway. Каждая конструкция состоит из кодирующей последовательности одного из генов группы *CsPIN1*, слитой через линкер с последовательностью репортерного гена *mNeonGreen*, под контролем промотора соответствующего гена группы *CsPIN1*. С использованием методики трансформации Тыквенных *Agrobacterium rhizogenes* были получены трансгенные корни огурца. Локализацию и анализ распределения белков группы CsPIN1 проводили на продольных срезах кончика корня огурца (65 мкм) с применением лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.

Было выявлено, что домены тканевой локализации CsPIN1b и CsSoPIN1 в апикальной меристеме родительского корня огурца отличаются. Белок CsPIN1b был локализован неполярно на мембранах инициалей рядов клеток, но в пределах всех клеток центрального цилиндра и внутренних слоев коры, включая эндодерму, он располагался на базальных (проксимальных относительно инициалей рядов) мембранах клеток. Низкая концентрация CsPIN1b была отмечена во внешних слоях коры и в ризодерме, в пределах которой CsPIN1b располагался на апикальных мембранах клеток. CsPIN1b отсутствовал в корневом чехлике. CsPIN1b локализован в мембранах клеток перидикла ещё до инициации примордия БК и сопровождал все стадии его развития. На стадии инициации БК происходит перемещение белков CsPIN1b, находящихся на базальных мембранах клеток протоксилемы, на латеральные мембраны пары сестринских клеток перидикла, принимающих участие в инициации. Это событие начинается с центрального из трёх рядов перидикла, клетки которых принимают участие в инициации БК. Таким образом осуществляется перенаправление акропетального потока ауксина в клетки-предшественницы БК (founder cells). При этом в клетках перидикла, эндодермы и коры, фланкирующих примордий, наблюдается локальное отсутствие CsPIN1b. После завершения первого периклиналичного деления CsPIN1b локализуется на смежных мембранах разделившихся клеток перидикла, а также на мембранах, прилегающих к клеткам эндодермы, что формирует ток ауксина и вовлечение клеток эндодермы в формирование примордия БК. Эта тенденция наблюдается и на более поздних стадиях развития БК. Домен пространственной локализации белка CsSoPIN1 был более узким по сравнению с CsPIN1b. В пределах апикальной меристемы корня белок визуализировался только на базальных мембранах клеток центрального цилиндра. CsSoPIN1 отсутствовал в примордиях БК, однако белок также перераспределялся с базальной на латеральную мембрану клетки протоксилемы, прилегающей к клеткам-основательницам после завершения первых антиклиналичных делений в ходе инициации БК, таким образом участвуя в создании максимума ауксина. В докладе обсуждается роль белков группы CsPIN1 в создании локальных максимумов ауксина, необходимых для инициации и развития БК, в апикальной меристеме родительского корня огурца, а также сравнивается распределение белков-транспортёров ауксина у растений, отличающихся по месту инициации БК.

Экспериментальные исследования поддержаны грантом РФФИ 20-016-00233-а.

Протекторное действие 24-эпибрассиоида при хлоридном засолении

Решетник Г.В., Чмелёва С.И.

Крымский федеральный университет им.В.И.Вернадского,
проспект Вернадского, 4, Симферополь, Республика Крым, Россия.
reshetnikgv@gmail.com

В настоящее время засоление относится к актуальным проблемам растениеводства Республики Крым. На значительной территории степного Крыма стало невозможно получать высокие урожаи различных сельскохозяйственных культур из-за негативного влияния засоляющих ионов. Эффективным средством для повышения неспецифической устойчивости растений к стрессам могут быть природные соединения и их искусственные аналоги. Регуляторы роста принимают активное участие в регуляции физиологических и биохимических процессах в растениях. В последние десятилетия помимо «классических» стрессовых гормонов в мире интенсивно исследуют действие на растения брассиностероидов. Перспективность брассиностероидов как средство для повышения продуктивности и устойчивости растений обусловлена низкой токсичностью и экологической безопасностью. В связи с этим для исследовательской работы был выбран препарат Эпин экстра, действующим веществом которого является 24-эпибрассинолид.

Цель исследования – изучение протекторного действия 24-эпибрассинолида на проростки некоторых злаковых при хлоридном засолении. Для достижения поставленной цели исследовали влияние препарата на амилазную активность прорастающих семян *Hordeum vulgare* L. и некоторые компоненты антиоксидантной активности *Triticum aestivum* L. при осмотическом стрессе.

В процессе проведения эксперимента установили, что оптимальной концентрацией для предпосевной обработки семян *Hordeum vulgare* L. является 0,025% концентрация препарата Эпин экстра, а для семян *Triticum aestivum* L. – 0,0125% концентрация. Экспозиция предпосевной обработки семян составляет 4 часа.

Амилолитическую активность в прорастающих семенах ячменя определяли в динамике. С возрастанием концентрации хлорида натрия активность фермента снижалась. При концентрации 150мМ активность фермента α -амилазы падает почти в 3 раза по отношению к контролю, а при минимальной концентрации NaCl (50мМ) – на 25% за первые сутки прорастания семян. Влияние препарата Эпин-экстра на активность фермента проявилось незначительно, в среднем активность повысилась на 7% по сравнению с чистым засолением. Стимулирующий эффект исследуемого препарата значительно проявился для 3-суточных проросших семян, активность фермента повысилась на 21%.

При действии различных стрессоров, которые, как правило, вызывают образование в клетках растений повышенного количества АФК, у растений развивается окислительный стресс. Образование АФК происходит во всех частях растительной клетки. Это связано как с неферментативными, так и с ферментативными процессами. Изменение активности ферментов является ответной реакцией организма на внешние воздействия. Активность ферментов, как каталазы, так и пероксидазы, зависела от содержания стрессора в среде и времени прорастания семян.

При изучении активности каталазы прорастающих семян пшеницы при осмотическом стрессе было отмечено снижение активности в течение 72 часов наблюдений. Высокая концентрация (100мМ) хлорида натрия уменьшила активность фермента в среднем на 50%. В результате проведенных исследований было зафиксировано повышение активности фермента использованием предварительного замачивания семян в растворе препарата Эпин экстра. Под действием 24-эпибрассинолида активность фермента повысилась в среднем на 23%. При концентрации 50мМ NaCl активность фермента под действием 24-эпибрассинолида увеличилась на 28% по сравнению с водным контролем.

Обезвреживание активных форм кислорода (АФК) в стрессовых условиях обеспечивается многоступенчатой системой защиты, в которой участвуют не только антиоксидантные ферменты, но и низкомолекулярные метаболиты, одним из которых является пролин. Его накопление в клетках является неспецифической защитной реакцией растений на действие стресс-фактора. Нами установлено, что концентрация пролина в проростках пшеницы при концентрации 100мМ хлорида натрия увеличилась в 2,5 раза, по сравнению с водным контролем. Под действием препарата уровень пролина снижался во всех вариантах опыта с нитратом свинца в среднем на 100%.

Изучая влияние хлорида натрия на морфометрические показатели 7-суточных проростков пшеницы установили, что в варианте опыта с максимальным количеством соли (100мМ) высота стебля отличалась от контрольных значений на 22%, а длина корня – на 15%. Под действием 24-эпибрассинолида данные показатели увеличились на 34 и 25% соответственно по сравнению с показателями на чистом засолении. При концентрации соли 50мМ под действием препарата показатели высоты проростков и длины корневой системы приближались к показателям контроля, а под действием препарата ростовые показатели стебля и корневой системы были значительно выше контроля. Таким образом, можно утверждать, что 24-эпибрассинолид в условиях осмотического стресса воздействует на активность основных антиоксидантных ферментов, тормозит синтез пролина, повышает показатели роста проростков. Препарат Эпин экстра проявляет протекторное действие на прорастание семян и рост проростков при хлоридном засолении.

Протекторное действие 24-эпибрассинолида на протеом проростков различающихся по засухоустойчивости сортов пшеницы в условиях прогрессивной засухи

Авальбаев А.М., Аллагулова Ч.Р., Федорова К.А., Юлдашев Р.А., Шакирова Ф.М.

ИБГ УФИЦ РАН, пр. Октября, 71, Уфа, Россия.
avalbaev@yahoo.com

В ходе предыдущих исследований нами был обнаружен защитный эффект 24-эпибрассинолида (ЭБ) на проростки пшеницы различающихся по засухоустойчивости сортов Омская-35 (О-35, устойчивый сорт) и Салават Юлаев (СЮ, восприимчивый сорт) в условиях прогрессивной засухи, что может быть обусловлено изменениями в протеоме. Цель настоящей работы заключалась в изучении действия 24-эпибрассинолида на содержание растворимых белков, уровень их фосфорилирования по тирозину при воздействии прогрессивной засухи, моделируемой увеличением на 1% концентрации полиэтиленгликоля (ПЭГ) в среде инкубирования проростков пшеницы сортов О-35 и СЮ с 13% до 15% каждые 24 ч. Выявлено, что в ходе прогрессивной засухи наблюдаются количественные и качественные изменения в белковом спектре растений обоих сортов. У подверженных засухе проростков выявлено уменьшение уровня большинства белков, в частности, участвующих в фотосинтезе (предшественники белка, входящего в состав кислород-выделяющего комплекса фотосистемы II, малая и большая субъединицы рибулозобисфосфат карбоксилазы (РБФК), активатора РБФК, фосфоглицераткиназа, хлоропластная фруктозобисфосфатальдодаза, РБФК-связывающий белок), процессах роста и энергетического обмена растений (актин, субъединицы тубулина, рибонуклеопротеин, субъединицы АТФ-синтазы, глутамин синтетаза и др.), а также исчезновение некоторых белков. Стоит отметить, что негативные изменения в содержании белков усиливались с увеличением силы стресса и были более выражены в неустойчивом сорте СЮ. Воздействие засухи также существенно усиливает фосфорилирование по тирозину ряда белков (среди которых и упоминавшиеся выше белки фотосинтеза, роста и энергетического обмена) и увеличивает число фосфотирозинового белков в проростках обоих сортов, и эти изменения гораздо более выражены в проростках сорта СЮ. Предобработка растений 24-эпибрассинолидом (ЭБ) способствует адаптации протеома и тирозинового фосфопротеома проростков обоих сортов к воздействию прогрессивной засухи. В пользу этого указывают данные о предотвращении ЭБ стресс-индуцированного снижения уровня белков фотосинтеза, роста и энергетического обмена, а также снижение до контрольного уровня стресс-индуцированного повышения фосфорилирования полипептидов по тирозину, и дефосфолирование тех фосфотирозинового белков, которые специфически индуцировались в ответ на засуху. В то же время, выявленное накопление защитных белков (глутатион-S-трансфераза, 2-цис-пероксиредоксин, хлоропластные шаперонины и др.) в ответ на обработку ЭБ свидетельствует об их вовлечении в спектр протекторного действия гормона. Интересно, что в условиях стресса ЭБ-предобработанные проростки характеризуются заметно меньшим уровнем накопления этих защитных белков в сравнении с необработанными гормоном образцами, что свидетельствует о снижении стрессовой нагрузки на предобработанные ЭБ растения. Таким образом, одним из механизмов выявленного нами защитного действия предобработки ЭБ на проростки различающихся по засухоустойчивости сортов пшеницы Омская-35 и Салават Юлаев в условиях прогрессивной засухи является предотвращение гормоном существенных стресс-индуцированных сдвигов в протеоме и тирозиновом фосфопротеоме.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №20-04-00904_a).

Протекторное действие 24-эпибрассинолида на целостность мембран проростков пшеницы, подвергнутых обезвоживанию

Федорова К.А., Авальбаев А.М., Аллагулова Ч.Р., Шакирова Ф.М.

Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра.
РАН, 450054, пр. Октября, 71, Уфа, Россия.
kristina-iva@yandex.ru

Работа была посвящена изучению защитного действия 24-эпибрассинолида (ЭБ) на содержание малонового диальдегида (МДА) и выход электролитов из тканей проростков различающихся по чувствительности к засухе сортов пшеницы, подвергнутых дефициту влаги на этапе прорастания семян и начальные фазы роста проростков. В опытах использовали 2 сорта пшеницы: Омская 35 (О-35) – устойчивый к засухе сорт, и Салават Юлаев (СЮ) – менее устойчивый сорт. Предобработанные в течение 3 ч в 0.4 мкМ растворе ЭБ семена проращивали в течение 3, 5, 7 суток в присутствии 5 %-го маннита. Сравнительный анализ влияния предпосевной ЭБ обработки на содержание МДА проростков пшеницы обоих сортов показал, что предобработанные в нормальных условиях гормоном проростки практически не отличались по этому показателю от контрольных растений. Присутствие маннита в среде проращивания необработанных ЭБ проростков привело к существенному увеличению концентрации МДА в сравнении с контролем в побегах проростков обоих сортов, которое было выше у растений менее устойчивого сорта СЮ. Предобработка ЭБ значительно снизила уровень этого показателя по сравнению с необработанными ЭБ проростками, что в свою очередь указывает на то, что предобработанные проростки испытывают меньший по уровню окислительный стресс, при этом защитный эффект проявился сильнее у растений устойчивого сорта О-35. Выход электролитов является одним из важных показателей негативного воздействия стрессовых факторов на растения. Засуха привела к значительному увеличению этого показателя у обоих сортов, хотя корни чувствительного к засухе сорта СЮ характеризовались примерно на 30% большей утечкой электролитов. Вместе с тем предобработанные ЭБ растения характеризовались значительно меньшим уровнем стресс-индуцированного экзоосмоса электролитов из корней обоих сортов в условиях засухи, что служит важным аргументом в пользу проявления антистрессового эффекта ЭБ на мембранных структурах и в целом на проростки пшеницы. Таким образом, стресс-индуцированное усиление образования активных форм кислорода приводит к негативным последствиям, которые выражаются в нарушении целостности мембранных структур клеток и их проницаемости, на что указывают данные по существенному увеличению содержания МДА и выходу электролитов из тканей. Предобработка гормоном растений пшеницы хотя и не предотвращала, но существенно снижала негативное действие моделируемой маннитом засухи на целостность мембранных структур проростков пшеницы, о чем свидетельствуют данные по уменьшению в них уровня стресс-индуцированного накопления МДА и экзоосмоса электролитов. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности применения ЭБ с целью повышения устойчивости растений пшеницы разных сортов к условиям засухи.

Развитие боковых корней *Arabidopsis thaliana* L. на ювенильном этапе жизни растения

Кривобок А.С. , Шилович А.А.** , Коновалова И.О.* , Бедарев В.А.** ,
Куделина Т.Н.*** , Мамедова Д.С.** , Бибикова Т.Н.***

* Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН. Хорошевское ш., 76 А, Москва, Россия, E-mail: nuxin@yandex.ru.

** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. Ленинские горы, 1, Москва, Россия.

*** РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева. Тимирязевская ул., 49, Москва, Россия.

**** Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф.Купревича НАН Беларуси.
Академическая ул., 27, г. Минск, Беларусь.

Боковые корни (БК) ответственны за формированием разветвленной корневой сети, а значит определяют потенциал растения как в поиске и потреблении ресурсов, так и в механическом креплении в почве. Абсолютное большинство исследований БК арабидопсиса сфокусировано на анализе роста и развития корней длиной не более 5 мм. Предполагается, что при длине более 10 мм (бая стадия развития) БК достигают своей физиологической зрелости. В то же время в естественных условиях боковые корни *Arabidopsis* растут значительно длиннее, а для оценки реакции корневой системы на внешние факторы важное значение имеет поведение не только молодых, но и зрелых БК. Нами было проведено комплексное исследования развития структуры, гормональной и ростовой активности БК длиной до 70 мм.

Результаты наших экспериментов показывают, что при нормальном развитии скорость роста БК постепенно увеличивается, достигая значений до 9 ± 2 мкм/мин. Совокупный анализ данных относительно строения, скорости роста, пространственной ориентации и клеточной структуры БК *A. thaliana* позволил получить новые данные относительно их стадий развития. Установлено, что на фоне интегрального спада экспрессии генов ауксинового ответа в диапазоне длин корня от 10 до 25 мм клеточная структура БК продолжает развиваться как за счет роста меристемы, так и за счет увеличения предельной длины клеток за границами зоны растяжения. Указанный период сопровождается ослаблением гравитропической ориентации БК. Этот феномен может объясняться как началом автотропного роста корня после завершения ряда ауксин-зависимых гравитропических переходов, так и проявлением альтернативных ориентирующих факторов, например, нутриотропических стимулов.

На основе регрессионного анализа данных установлено, что после активации меристемы БК проходит через три ростовых этапа, которые определяются возрастом корня и в меньшей степени зависят от влияния факторов среды обитания. Эти наблюдения свидетельствуют об отсутствии временной однородности в развитии бокового корня и ставят под сомнение предположение о полной идентичности органов внутри корневой системы.

Полученные результаты являются принципиально новой информацией, которая вносит ясность в интерпретацию уже имеющихся в литературе данных о БК, а также открывает новую область исследований регуляции зрелых БК, имеющих измененный по отношению к молодым БК гормональный фон и стабильную клеточную структуру.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ Бел_мол_а 19-54-04015 и БРФФИ Б19РМ-065.

Развитие симбиотического клубенька бобовых растений: клеточные и молекулярные механизмы

Цыганов В.Е.

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии.
ш. Подбельского, 3, Пушкин-8, Санкт-Петербург, Россия.
Санкт-Петербургский научный центр РАН, Университетская наб., 5, Санкт-Петербург, Россия.
vetsyganov@arriam.ru

Взаимодействие растений сем. Бобовых и почвенных бактерий – ризобий завершается образованием на корнях растений новых органов – симбиотических клубеньков. В ходе развития симбиотического клубенька ризобии дифференцируются в специализированную для азотфиксации форму – бактериоиды. Бактериоиды, окруженные симбиотической мембраной растительного происхождения, формируют органелло-подобные структуры – симбиосомы. Дифференцировка инфицированной растительной клетки обеспечивает размещение многочисленных симбиосом. Она сопровождается реорганизацией элементов тубулинового и актинового цитоскелета, направленной на создание условий для значительного увеличения клетки в объеме и распределения клеточных органелл и симбиосом в клетке. Реорганизация тубулинового цитоскелета была показана для различных видов бобовых растений, формирующих как детерминированные (с ограниченной активностью меристемы), так и для недетерминированных клубеньков (с продолжительной активностью меристемы, и как следствие, характеризующихся формированием гистологической зональности). Дифференцировка инфицированной клетки сопровождается также значительными транскрипционными изменениями, что было показано при анализе транскрипционных профилей в клетках, выделенных с помощью лазерной микродиссекции, из различных гистологических зон клубенька гороха посевного (*Pisum sativum* L.), формирующего клубеньки недетерминированного типа.

Фитогормональная регуляция играет ведущую роль в развитии симбиотических клубеньков. Например, у гороха гиббереллины и цитокинины играют позитивную роль в функционировании клубеньков, а этилен и абсцизовая кислота являются негативными регуляторами, стимулируя окончание функционирования клубеньков и переход их к старению, направленному на реутилизацию питательных веществ. Активно функционирующая антиоксидантная система также необходима для развития клубенька, одним из ее важных компонентов является глутатион.

Особый интерес для исследований представляет изучение влияния различных стрессовых факторов на развитие симбиотических клубеньков. К таким факторам можно отнести различные пестициды, в том числе и фунгициды. Показано, что фунгициды могут подавлять развитие клубеньков у гороха, а также нарушать их гистологическую и ультраструктурную организацию.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2020-920 от «16» ноября 2020 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Размножение подвоев косточковых плодовых культур ЛЦ-52 и Гизела-6 методом *in vitro*

Собралиева Э.А. *, Баматов И.М. *, Идрисова М.**

* Чеченский государственный университет, Шерипова ул.,32, Грозный, Россия.

** Чеченский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Ленина ул.1, Грозный, Россия.
batukaevmalik@mail.ru

Интенсивная технология выращивания плодовых и ягодных культур на современном этапе невозможна без оздоровленного посадочного материала, производство которого основано на биотехнологических методах. Перевод садоводства на безвирусную основу диктуется ужесточением правил международной торговли и обмена только безвирусным посадочным материалом культурных растений по специальным сертификатам. Поэтому разработка биотехнологии гарантированно безвирусного посадочного материала обеспечит значительный рост его качества, повысит экономическую рентабельность и интенсивность отрасли.

Для проверки эффективности питательной среды был заложен ряд опытов с использованием сред Мурасиге и Скуга, Драйвера-Кунжуки, Кворина-Лепуавра и WPM. Анализ приживаемости инициальных эксплантов после испытания различных питательных сред показал, что на начальном этапе оптимальна среда Мурасиге и Скуга, однако экспланты подвоя ЛЦ-52 на питательной среде Драйвера-Кунжуки развивались более интенсивно. В наших опытах рост и развитие эксплантов различных косточковых культур на средах Кворина-Лепуавра и Андерсона проходил значительно хуже, чем на контрольной среде. Выражалось это в отсутствии зеленого пигмента в микропобегах на средах Андерсона, что приводило к гибели растений и в меньшем приросте микропобегов на среде Кворина-Лепуавра в конгломерате и разрастании каллусной ткани, из которой, при проведении последующих наблюдений, было отмечено развитие единичных фасцированных побегов. Это явление классифицировалось нами как фенотипическое изменение культивируемого растения.

Использование среды Драйвера-Кунжуки при размножении *in vitro* подвоя Гизела-6 также показывает отличные результаты. Промеры микропобегов на этапе пролиферации показывают в среднем увеличение прироста побегов на 0,5 см. за пассаж. Сбор данных по использованию питательной среды Драйвера-Кунжуки в процессе микроклонального размножения клонового подвоя Гизела-6 носит на данный момент накопительный характер и требует более тщательного анализа ее влияния на рост и развитие микропобегов на этапе пролиферации. Однако, предварительные данные позволяют рекомендовать данную среду для более широкого использования в процессе изучения и оптимизации технологии получения оздоровленного посадочного материала категории базисные.

Таким образом, использование питательной среды Драйвера-Кунжуки в процессе микроклонального размножения подвоев для косточковых культур перспективно. Эффективность ее обусловлена большим приростом микропобегов при одинаковой концентрации цитокининов в питательной среде и, следовательно, большим выходом растений, пригодных к укоренению *in vitro*. Исходя из вышесказанного, можно рекомендовать более широко использовать данную питательную среду для микроклонального размножения подвоев косточковых культур в процессе получения посадочного материала категории «базисные».

Acknowledgment. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и образования РФ прикладных научных исследований, и экспериментальных разработок в рамках реализации ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы». (Соглашение № 14.577.21.0292 от 04.12.2018г.) с уникальным идентификатором проекта RFMEFI57718X0292

**Разработка CRISPR/Cas9 технологии редактирования генома для моделирования сроков
колошения мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.)**

Мирошниченко Д.Н.^{*,}, Тимербаев В.Р.^{*,**}, Клементьева А.А.^{*,**},
Шульга О.А.^{**}, Салина Е.А.^{***}, Долгов С.В.^{*,**}**

* Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.
Просп. Науки 6, Пушкино, Россия.

** Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии.
Тимирязевская ул., 42, Москва, Россия.

*** Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН.
Просп. Акад. Коптюга, Новосибирск, Россия.
miroshnichenko@bibch.ru

Время колошения современных сортов гексаплоидной мягкой пшеницы в значительной степени зависит от их потребности в яровизации. Сорты пшеницы, поздно переходящие к колошению, могут быть подвержены воздействию различных неблагоприятных факторов во второй половине вегетации (засуха, высокие температуры, поражение фитопатогенами, избыточная влажность), что не позволяет обеспечить полноценное формирование урожая. Чувствительность к яровизации контролируется группой скоординировано функционирующих *VRN* генов, важнейшая роль среди которых принадлежит гену *VRN-1*. Известно, что промотор генов *VRN-1* содержит консервативные цис-элементы (CArG-, VRN- и G-боксы) представляющие собой мишени для транскрипционных факторов растений, участвующих в ответе на яровизацию. При этом доминантные аллели *Vrn-1* имеют существенные изменения нуклеотидной последовательности промотора по сравнению с рецессивным аллелем *vrn-1*, включающие транспозонные вставки, делеционные фрагменты различной протяженности, а также единичные нуклеотидные замены. Различные комбинации доминантных и рецессивных аллелей могут приводить к отличиям во времени цветения у мягкой пшеницы. Несмотря на то, что количество информации о структуре генов *VRN* и их разнообразии достаточно велико, знания о вкладе конкретных мутаций промотора в формирование фенотипа и проявление такого важного физиологического признака как «яровость-озимость» - недостаточны. Возможность контролирования сроков колошения путем модифицирования и редактирования аллелей *VRN-1*, а именно нуклеотидной последовательности промотора, позволило бы расширить эти знания и помочь в создании новых высокопродуктивных сортов.

Современный способ внести целенаправленные изменения в гены растений, не затронув остальной геном – это использование методов геномного редактирования, таких как CRISPR/Cas9. Получение растений пшеницы с отредактированным геномом – достаточно трудная задача, требующая сочетания взаимодополняющих подходов, включающих методы культуры клеток и тканей, генетической трансформации, биоинформатики, молекулярной биологии и генетики. В наших исследованиях мы разработали эффективный способ биобаллистической доставки компонентов редактирования системы CRISPR/Cas9 в морфогенные каллусы пшеницы с последующей регенерацией и отбором растений *in vitro*. Целью геномного редактирования являлось создание растений мягкой пшеницы с нуклеотидными изменениями в консервативной промоторной области гена *vrn-A1*. Для этого провели биоинформатический подбор гидовых РНК, протестировали их способность создавать разрывы ДНК в целевом участке в условиях *in vitro* в комплексе с Cas9 и сконструировали ряд векторов для экспрессии в клетках пшеницы. В результате генетической ко-трансформации двумя векторами, один из которых содержал последовательность ген-специфичной гидовой РНК, а другой - последовательность кодирующую нуклеазу Cas9, был получен ряд независимых линий. При использовании одного из трех векторов, экспрессирующих специфичные гидовые РНК, изменение последовательности промоторного участка гена *vrn-A1* было обнаружено у четырех независимых растений. Полученные растения содержали различные изменения, включающие единичную нуклеотидную делецию или вставку, делецию из четырех нуклеотидов. У одной из линий одновременно достигнута и вставка, и делеция нуклеотидов в консервативном участке промотора *vrn-A1*. Мутантные растения сформировали семена в условиях зимних теплиц. Анализ семенного поколения T1 подтвердил наследование мутантных вариантов *vrn-A1*, а также выявил изменения времени колошения у этих растений в сравнении с исходным сортом. Более подробные результаты, касающиеся эффективности редактирования генома мягкой пшеницы, возможности получения растений, не содержащих последовательности «инструментов» геномного редактирования, и влияния внесенных геномных правок на фенотип и урожайность растений будут представлены во время конференции.

Разработка генно-инженерных подходов для создания растений, устойчивых к вирусу оспы сливы (PPV)

Сидорова Т.Н.* **, Тимербаев В.Р.* **, Pushin A.S.* **, Мирошниченко Д.Н.* **, Долгов С.В.* **

* Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Просп. Науки 6, Пущино, Россия.

** Никитский ботанический сад — Национальный научный центр РАН, пгт Никита, Ялта, Россия. sidorovat@rambler.ru

Вирус оспы сливы (PPV) является серьезным карантинным заболеванием косточковых плодовых культур, приводящим к большим потерям урожая у сливы, вишни, абрикоса, персика. В настоящий момент PPV распространилась по всей Европе, включая Центральную и Европейскую части России, при этом вирусные инфекции, вызываемые вирусом оспы сливы, наносят ежегодный урон на сумму более 200 млн. EUR по всему миру. Известно крайне мало естественных доноров генетической устойчивости к PPV. Из-за длительности селекционного процесса плодовых деревьев, несовместимости при межвидовой гибридизации, а также полиплоидности и гетерозиготности современных сортов, достичь устойчивости методами классической селекции до сих пор не удалось. Методы генетической инженерии и геномного редактирования являются перспективным направлением получения вирусоустойчивых растений плодовых косточковых деревьев.

Для создания вирусоустойчивых растений, нами разработана методика агробактериальной трансформации, которая позволяет получать независимые трансгенные растения различных представителей рода *Prunus* в течение 5-6 мес. Она основана на протоколе регенерации растений из соматических тканей (листовых эксплантов *in vitro*), что позволяет сохранять оригинальные признаки сортов. Путем стабильной встройки в геном растений шпилечной конструкции, содержащей инвертированные повторы участка генома вируса PPV, нами показана высокая эффективность использования механизма РНК-интерференции для успешного подавления инфекции косточковых культур вирусом оспы сливы. Трансгенные деревья сливы домашней (*Prunus domestica*), полученные с помощью генно-инженерных подходов, сохраняют устойчивость к заражению PPV на протяжении более чем 10 лет. Поскольку полученные растения содержат участки генома вируса, их дальнейшее практическое значение ограничено из-за регуляторных запретов на использование ГМ растений.

В этой связи использование более современных подходов, а именно создание цисгенных растений в сочетании с редактированием генов системой CRISPR/Cas9, расширяет возможности для достижения устойчивости к вирусам у растений. Для этих исследований нами выбраны гены, кодирующие компоненты трансляционного аппарата растений, которые рекрутируются вирусами для репликации и системного распространения в клетках. Мутации, например, в генах факторов инициации трансляции eIF4 или их изоформ, могут обеспечить рецессивную генетическую устойчивость к вирусной инфекции, в частности к потивирусам, к которым относится PPV. Механизмы резистентности, обусловленные мутациями факторов eIF4, не до конца понятны, и зависят от конкретного взаимодействия между штаммом вируса и видом растений. Для понимания того, как наиболее эффективно противостоять инфекциям PPV, при этом не нарушить функциональную активность трансляционного аппарата растения, мы проводим исследования по изучению роли различных изоформ и типов факторов трансляции косточковых культур. Нами разработаны две стратегии изменения экспрессии генов eIF4 - нокаун (методом РНК-интерференции) и нокаут генов (методом геномного редактирования CRISPR/Cas9). Сконструированы векторные конструкции на основе нативных регуляторных элементов генома представителей рода *Prunus*, содержащих интерферирующие повторы участков генов, кодирующих различные факторы инициации трансляции, а также подобраны последовательности гидовых РНК для внесения в них мутаций. Изменение функциональной активности eIF4(iso)E гена методом РНК-интерференции привело к серьезным нарушениям фенотипа растений сливы, указывая на его критическую роль для нормальной жизнедеятельности. Тогда как замалчивание гена eIF4(iso)G позволило получить фенотипически нормальные растения, в которых общая функциональная избыточность изоформ факторов инициации трансляции позволила обеспечить устойчивость сливы к заражению PPV без ущерба для роста и развития растений.

**Разработка растительной экспрессионной системы наработки артемизинина
с использованием методов синтетической биологии**

Фирсов А.П. *, Митюшкина Т.Ю. *, Пушин А.С. *, Шалойко Л.А. *, Вайнштейн А.М. **, Долгов С.В. *

* Филиал института биоорганической химии им. акад.М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, 142290
Проспект Науки 6, Пушкино Московской обл. Россия.

** Еврейский университет Иерусалима, сельскохозяйственный факультет, Реховот 76100, Израиль.
dolgov@bibch.ru

В настоящее время известно относительно немного исследований в области одновременного переноса в геном растений большого количества гетерологичных генов. Так, в геном *Arabidopsis thaliana* удалось перенести 10 различных генов в составе Т-ДНК размером 28,5 т.п.н. (Collier et al., 2018), а в модельный вид люцерны *Medicago truncatula* – 8 генов, важных для симбиоза с ризобией (размер Т-ДНК 74 kb; Untergasser et al., 2012). В исследовании Fujisawa et al. (2009) растения *Brassica napus* были трансформированы семью генами биосинтеза каротиноидов. Десять генов устойчивости к насекомым в составе Т-ДНК размером 32 т.п.н. были успешно перенесены в геном кукурузы, экспрессия гетерологичных генов в полученных растениях была подтверждена (Ward et al., 2009).

Известно большое количество исследований по агробактериальной трансформации хризантем, в большинстве из них частота трансформации варьирует в пределах 1-8% от числа трансформированных эксплантов (Shinozuma et al., 2015; Naing et al., 2016; Mitouchkina et al., 2018). В этих и других исследованиях в геном хризантемы переносили два-три гена, включая селективный. Примеры трансформации хризантемы большим количеством генов нам неизвестны. В данном исследовании нам удалось впервые перенести в геном хризантемы шесть генов в составе Т-ДНК размером около 14 т.п.н. Клонированы гены биосинтетического пути артемизинина из полыни *Artemisia annua*- ADS (аморфа-4,11-диен синтазы), CYP71AV1 (аморфа-4,11-диен монооксигеназы), DBR2 (дельта-11(13) редуктазы артемизининового альдегида) и CPR (цитохром P450 редуктазы). На основе клонированных генов получены векторы для трансформации растений- p1250 с цитоплазматической локализацией продукта гена ADS и p1240- с его митохондриальной локализацией. Также получен вектор для трансформации растений p2356 с клонированными в нём генами биосинтеза предшественника артемизинина фарнезилдифосфата (ген фарнезилдифосфатсинтазы, FDPS) и альдегид-дегидрогеназы ALDH1, катализирующей окисление дигидроартемизининового альдегида до дигидроартемизининовой кислоты- непосредственного предшественника артемизинина.

В результате агробактериальной трансформации успешно получены трансгенные растения хризантемы- восемь независимых линий после трансформации вектором p1240 и две линии – вектором p1250. Методом ПЦР- анализа показана интеграция всех целевых генов ADS, CYP71AV1, DBR2, CPR и tHMGR в геном двух трансгенных линий, полученных в результате трансформации вектором p1240, и одной линии, полученной после трансформации вектором p1250. Трансгенная природа этих линий была дополнительно подтверждена методом Саузерн блот анализа. Таким образом, впервые удалось перенести в геном хризантем 6 гетерологичных генов (включая селективный ген npt II) в составе одной Т-ДНК размером 14 т.п.н. Синтез артемизинина в полученных растениях подтверждается методами тонкослойной и жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ).

ПЦР-анализ трансгенных линий показал наличие в геноме хризантемы последовательностей, гомологичных генам CYP71AV1, CPR, ADS и DBR2 *A. annua*. Кроме того, выявлена транскрипция в листьях хризантемы генов, гомологичных генам CYP71AV1, CPR и DBR2 *A. annua*. Полученные результаты косвенно подтверждают сходство биохимических процессов у растений хризантемы и *A. annua*.

Полученные результаты, подтверждают возможность переноса в геном трансгенных растений групп генов, кодирующих целые биохимические модули. Это открывает дальнейшие перспективы для совершенствования методов комбинаторной инженерии метаболических путей для разработки экспрессионных систем для производства небелковых веществ, в том числе и артемизинина.

Разрыв «Проблемы ФОТОСИНТЕЗА» на световые и темновые отдельные части ведет к экологической катастрофе и гибели Земной цивилизации

Чиков В.И., Ахтямова Г.А., Хамидуллина Л.А.

Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань, Россия.
vichikov@bk.ru

Произошедший в начале 80-х годов XX века разрыв проблемы фотосинтеза на два самостоятельных направления привел к тому, что исследования фотосинтетического метаболизма углерода почти прекратились. Не сильно продвинулись исследования и по фотопроцессам, так как все они предназначены природой для защиты структур хлоропластов от фотодеструкции избыточной энергией квантов света. Известно, что в ходе фотосинтеза используется около одного процента энергии квантов. Поэтому к регуляции продукционных процессов они имеют не прямое отношение. В то же время, нашими исследованиями было доказано (ФР, 2015(1);2016(1), что ключевым звеном регуляции фотосинтеза является даже не хлоропласт, а внеклеточный в листе растения фермент инвертаза. Это он, гидролизуя транспортный продукт фотосинтеза - сахарозу, повышает осмотичность внеклеточной водной среды. В результате, устьица прикрываются и сокращают поток CO_2 в лист, приводя к согласию световые и темновые процессы фотосинтеза. Конкретное воздействие на инвертазу оказывает изменение pH раствора апопласта, который зависит от степени углеводной направленности метаболизма фотосинтеза (УНМФ) в мезофильных клетках в результате нарушения в образовании световых и темновых продуктов фотосинтеза в листе. Именно связь УНМФ с экспортной функцией листа и является главным рычагом в регуляции фотосинтеза. Понимание этого позволило нам сразу выяснить причину возникновения и развития на Земле экологической катастрофы в связи с немеренным количеством используемых минеральных удобрений в сельском хозяйстве, избыток которых вымывается из почвы в реки, моря и океаны. Повышенное количество в воде океана минеральных удобрений (прежде всего нитратов) усиливает неуглеводную направленность фотосинтеза у водорослей в океане. Это относительно снижает образование кислорода в воде (а океан – главный поставщик кислорода в атмосферу) и делает водоросли (с повышенным содержанием белков) хорошей пищей для бактерий, которые питаются тканями водорослей расходуют кислород в воде, препятствуя жизни морских животных. А главное, уменьшают связывание моллюсками CO_2 при синтезе своих раковин и образования известковых пород – главный путь снижения CO_2 в атмосфере (результат – исчезновение «Большого Барьерного Рифа»). Избыточное использование в сельском хозяйстве минеральных удобрений (прежде всего нитратов) не только вымывает их из почвы в реки и далее в океан, но и с пылью уносится ветром в леса. Нитраты, по тому же механизму, тормозят экспорт сахаров из листьев в корни и, тем самым, уменьшают соотношение массы корни/листья у деревьев. В этих условиях уменьшается и поток воды из почвы в листья. Вода уже транспортируется только по тканям коры дерева, а не по всему сечению его ствола. И деревья становятся засухо- и пожаро-неустойчивыми. Именно она (древесина ксилемы) сохнет и загорается в первую очередь при малейшей пожарной возможности, так как ее клетки сухие и мертвые. Нами предложен выход из этого положения – немедленное прекращение использования минеральных удобрений, активация оттока сахаров из листьев в корни и, симбиоза растений с микроорганизмами. Посланы эти материалы в Австралию, Калифорнию, Испанию, где шли массовые пожары в лесах, но никакой реакции от них не проявилось. Видимо, все живут идеями только изменения световых процессов фотосинтеза. А всё дело оказывается в метаболизме. Или по привычке никому не верят. В результате изменения под действием удобрений биохимических и структурных процессов в океане, меняется направление и скорость движения морских течений. Мы это видим по радикальному изменению погоды. Всё это нарушает место и силу динамического давления на Земную кору, ведущее к усилению вулканической деятельности. А все это ведёт ко всё большему повышению концентрации углекислоты в воздухе, которая становится всё ближе к выдыхаемой концентрации CO_2 (4%) у наземных животных. Приближение к этой величине (а это, как видите рядом) затруднит реакции декарбонирования при дыхании в митохондриях и приведет к гибели всех животных на Земле. А погибшие тела животных (особенно во впадинах океанов) станут будущими нефтяными месторождениями (через миллиарды лет). Возможно это уже повторялось и не раз. Наши многолетние работы в исследовании механизмов регуляции фотосинтеза позволили найти выход и из этого положения. Разрабатывается путь изменения агротехники выращивания сельскохозяйственных растений без удобрений, не снижая продукционный процесс и наращивая плодородие почв за счет повышенного симбиоза растений с микроорганизмами. Ведь наши 2-х метровые черноземы образовались в природе без всяких удобрений. А за последние 100 лет эти чернозёмы потеряли половину органического вещества. Чтобы это восстановить, надо только направить больше продуктов фотосинтеза в корни. И главное, это не понизит фотосинтез, так как фотосинтез зависит от «запроса» на продукты фотосинтеза. Больше запроса – больше фотосинтез.

Растительные и животные эпоксиалкогольсинтазы

Смирнова Е.О., Горина С.С., Ланцова Н.В., Топоркова Я.Ю., Гречкин А.Н.

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленно структурное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук».
Лобачевского ул., 2/31, Казань, Россия.
yelena.smirnova@aiesec.net

Ферменты семейства CYP74 играют важную роль в липоксигеназном каскаде, продуктами функционирования которого являются оксипирины. Эти соединения широко распространены в организмах, принадлежащих к разным таксонам. До недавнего времени считалось, что ферменты CYP74 характерны исключительно для цветковых растений. Сюда относились алленоксидсинтазы (АОС), гидропероксидлиазы (ГПЛ) и дивинилэфирсинтазы (ДЭС). Однако к настоящему времени ферменты, гомологичные представителям семейства CYP74, обнаружены у мхов *Physcomitrella patens* и *Marchantia polymorpha*, протеобактерии *Methylobacterium nodulans*, бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus* и некоторых представителей царства животных, включая оленерогого коралла *Acropora palmata*, литоральную роющую актинию *Nematostella vectensis* и ланцетника *Branchiostoma floridae*. Степень сходства аминокислотных последовательностей данных ферментов не позволяет отнести их к семейству CYP74, однако особенности первичной структуры и механизмов каталитического действия, а также данные филогенетического анализа позволили объединить эти ферменты и семейство CYP74 в единый клан CYP74. К нему отнесли еще одну группу ферментов – эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС). До недавнего времени данные ферменты были обнаружены у ланцетника, бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus* и актинии *Nematostella vectensis*. Кроме того, ЭАС активность была обнаружена у ГПЛ подсемейства CYP74C и некоторых ферментов из подсемейства CYP74B. В 2018 году была охарактеризована и описана первая растительная эпоксиалкогольсинтаза, относящаяся именно к семейству CYP74. Обнаружен данный фермент был у плаунка *Selaginella moellendorffii*. Кроме того в 2020 году был описан фермент клана CYP74 ланцетника *Branchiostoma belcheri*, который обладал эпоксиалкогольсинтазным и алленоксидсинтазным типом активности. Это первый фермент клана CYP74, который участвует в образовании АОС продуктов.

Продукты реакции ЭАС представителей разных таксонов различаются по стереохимии. ЭАС животных (в том числе и дуалистичного фермента ланцетника *Branchiostoma belcheri*) продуцируют эпокиспирты с цис-дизамещенным эпоксидом. А эпокиспирты, синтезированные при участии ЭАС плаунка, бурой водоросли *E. Siliculosus*, ферментов из подсемейств CYP74B и C содержат транс-дизамещенное эпоксидное кольцо. По-видимому, образование эпокиспиртов с цис-конфигурацией эпоксидного кольца является особенностью животных ферментов с ЭАС активностью.

Исследование фермента ланцетника *Branchiostoma belcheri* выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20–34–70126 Стабильность.

Реакция проростков тритикале на действие модельной (ПЭГ-6000) засухи

Арслангереева М.И. *, Алиева З.М. *, Куркиев К.У. **, Хабиева Н.А. *

* Дагестанский государственный университет. ул. М. Гаджиева, 43а, Махачкала, Россия.

** Дагестанская опытная станция – филиал ВИР, 378612, Дербентский район, пос. Вавилово.
zalieva@mail.ru

Засушливый климат характерен для многих регионов России и мира, в том числе Дагестана, а усиливающаяся аридизация климата и высокая степень ее влияния на продуктивность культурных растений делает изучение этой проблемы особенно актуальным. В работе изучена реакция на засуху проростков сортообразцов яровой (Ровня, Ярик) и озимой (Сват, Праг-559) тритикале (*Triticosecale*). Для моделирования ее условий семена тритикале проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной растворами непроницающего осмотика полиэтиленгликоля (ПЭГ – 6000: 5, 10, 15%) и водой (контроль). На 10-е сутки после прорастания определяли морфометрические показатели (длину и массу надземной и подземной части, количество корней), содержание фотосинтетических пигментов и относительное содержание воды (ОСВ).

У испытанных сортообразцов всхожесть семян в контрольном варианте была высокой и варьировала от 100 % у образцов Ярик, Сват и Ровня до 95% у ПРАГ-559. ПЭГ в концентрациях 5 и 10% не оказывал существенного влияния на всхожесть семян и рост корней проростков, большую чувствительность к водному дефициту проявила их надземная часть. У сорта Ровня в контрольном и опытных вариантах показатели длины корня варьировали в диапазоне 95-103%. Размеры надземной части проростков этого сорта снижались в варианте 10% ПЭГ на 22% по сравнению с контролем. Снижение ростовых показателей у сортообразца Праг-559 было более существенным: длина корня и надземной части проростков в варианте 10% ПЭГ снижалась по сравнению с контролем на 30%. В условиях более интенсивной модельной засухи (10 и 15% ПЭГ) высота надземной части относительно контроля у сорта Ровня снизилась на 50 и 79% соответственно. Рост корней в вариантах 5-10% ПЭГ был интенсивным, а при усилении стрессового воздействия (15%) снизился на 41% относительно контроля. У сортов Ярик и Сват наблюдались сходные изменения: в условиях повышенной концентрации ПЭГ (15%) длина надземной части уменьшилась на 65%, а корня на 88% по сравнению с контролем. Показатели надземной части у сортообразца Праг-559 в вариантах 10 и 15% ПЭГ снижались на 76- 91% соответственно, длина корня на 48-71%. На количество корней ПЭГ не оказывал заметного влияния.

ЭГ не влиял на количество корней у изучаемых сортов. В опытных вариантах (5-10% ПЭГ) заметно снижалась сырая биомасса надземной части. Масса корней у сорта Ровня снизилась в варианте 10% ПЭГ на 57% по сравнению с контролем, в то время как у сортообразца Праг 559 лишь на 25%. По накоплению сырой биомассы надземной части выделился сорт Сват: по сравнению с контролем в 15% ПЭГ показатель снизился на 70%, в то время как у сортов Ровня, Ярик и сортообразца Праг 559 на 90-95%. Наиболее устойчивыми к недостатку влаги при оценке сырой биомассы корней оказались сорта Ровня и Ярик, у которых в высокой концентрации ПЭГ (15%) она снизилась на 60% относительно контроля. Менее устойчивыми оказался сорт Сват и сортообразец Праг 559, сырая биомасса корней снизилась у них по сравнению с контролем соответственно на 67 и 78%. Подобная картина наблюдалась и при анализе данных по сухой биомассе.

Относительное содержание воды у сорта в корнях и надземной части проростков сорта Ровня в варианте 15% ПЭГ уменьшилось по сравнению с контролем на 44 и 77%, Праг-559 на 75 и 92% соответственно. Заметно снижалось ОСВ в надземной части у сорта Ярик: в вариантах 5-10% ПЭГ на 58%, а в варианте 15% ПЭГ на 92% относительно контроля. Наиболее высокие показатели ОСВ в надземной части отмечены у сорта Сват, у которого в повышенной концентрации ПЭГ (15%) показатель снизился относительно контроля в надземной части на 64%, а корней на 50%.

Анализ морфометрических показателей у сравниваемых сортов показал, что наибольшей устойчивостью к действию водного дефицита обладал сорт Ровня, который превосходил другие образцы по всхожести семян, высоте надземной части, длине и количеству корней, а также относительному содержанию воды в условиях модельной засухи.

Реакция сосны обыкновенной на засуху и смену жизненного состояния по данным мониторинга водного режима в контрастные по экологическим условиям годы

Клушевская Е.С., Кузнецова Н.Ф.

Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии.
Ломоносова ул., 105, Воронеж, Россия.
ekogenlab@gmail.com

Приведены результаты изучения водного режима в осенних свежесобранных образцах 2-летней хвои модельных деревьев сосны обыкновенной Ступинского тест-объекта (Воронежская область, зона высокопродуктивных сосновых лесов, экологически благоприятная территория). Анализ проводился в контрастные годы – оптимальные (2013, 2017, 2018 гг.), засушливый 2014 г. и в 2015 г. – год частичной дестабилизации сосновых лесов на территории Центрально-Черноземного района (ЦЧР). Дестабилизация была вызвана мощной и самой продолжительной за всю историю метеонаблюдений 8-летней тепловой волной, которая протекала на фоне резкого падения уровня грунтовых вод и 4-х сильных засух (2007, 2010, 2012 и 2014 г.). Последняя засуха данной волны включала два засушливых периода – слабая весенняя и сильная продолжительная поздняя засуха. Осенью 2014 г. за три месяца выпало менее 20% нормы осадков, поэтому сосновые леса в зиму ушли ослабленными. В 2015 г., несмотря на то, что год по метеорологическим показателям соответствовал оптимальному, в ЦЧР впервые за 35 лет мониторинга зафиксирован переход сосны из равновесного в слабо неравновесное (более низкое жизненное) состояние. Характеристика водного режима приведена по трем основным его параметрам (содержание влаги, коллоидно-связанной воды и дефицит влаги). Общее содержание влаги – эколого-зависимый признак, позволяющий оценивать как жизненное состояние растения, так и его генотип-средовую связь. Показано, что в засушливый и оптимальные годы усредненные значения содержания влаги сопоставимы и составляют в среднем 56-57%, что в целом соответствует литературным данным (Тарханов, 2011). Отметим, что в течение всех проанализированных лет (2013-2018 гг.) только у 30% деревьев содержание общей влаги сохранялось на одном уровне. В 2015 г. зафиксированы самые низкие минимальные значения содержания влаги (51.6%). Различия между оптимальными и годом дестабилизации достоверны. Засушливый 2014 г. занимает промежуточное положение. При сравнительном анализе изменения амплитуды данного признака установлено, что оптимальные годы характеризуются наиболее широкими границами варьирования (7.4%), а засушливый 2014 г. самыми узкими (2.9%). Содержание коллоидно-связанной воды в норме у сосны невысокое, но при стрессе уровень повышается. Показано, что в оптимальный и засушливый год ее количество в нативных образцах практически одинаковое (15.2 и 15.1%, соответственно), но каждому из этих лет присущи свои особенности. Самая высокая амплитуда изменения признака отмечена в оптимальный год (15.3%). В засушливый и в год дестабилизации ее диапазон почти вдвое уже: 8.1% в засуху и 8.2% при дестабилизации. Область распределения признака в целом пересекается на 48.8%. Наблюдаемые различия с оптимальным годом выявляются за счет существенного повышения минимальных значений в 2014 году (4,8% в 2013г. - оптимальный и 12,4% в 2014г. - засушливый), при сходных максимальных значениях (20.1 и 20.5%, соответственно). В год дестабилизации содержание коллоидно-связанной воды повышается почти на треть (21.4% - усредненные данные), наблюдаются достоверные отличия с оптимальным и засушливым годом. Область распределения признака смещается в сторону возрастания ее содержания (16.3 – 24.5%). Повышение уровня коллоидно-связанной воды является адаптивным механизмом, способствующим удержанию влаги и сохранению жизнеспособности растения. Третьим анализируемым параметром является такой важный показатель жизнедеятельности растения, как дефицит влаги. В оптимальные годы его величина в хвое составляет в среднем 5.2%. В сильную осеннюю засуху уровень дефицита снизился до 3.98%. Максимальная его величина, как и в случае двух других анализируемых параметров водного режима, оказалась в год дестабилизации сосны (7.64%). Диапазоны изменчивости показателей дефицита влаги модельных деревьев смещены в область более высоких значений. Отличия между годами достоверны. Как и у других параметров водного режима, самый большой размах варьирования признака отмечен в оптимальные годы (8.43%). Отличительная черта засушливого 2014 г. – резкое почти трехкратное сужение границ его изменчивости (2.74%). Таким образом, в ходе проведенных мониторинговых исследований выявлена общая тенденция отклика вегетативной сферы сосны на изменение среды обитания, при условии различий деревьев внутри выборки. Установлено, что засуха и переход сосны из равновесного в слабо неравновесное состояние накладывают разный отпечаток на физиологическое состояние деревьев. Стресс-реакция оказалась более выраженной в год дестабилизации, чем в сильную засуху, вызвавшую данную смену. По-видимому, это свидетельствует о более глубокой перестройке метаболизма при дестабилизации, чем при засухе, устойчивости слабо неравновесного состояния, при котором адаптация к изменившимся частично совпадающим с биологией вида условиям сопряжена со снижением общего жизненного состояния лесных экосистем.

Регуляторные коды 5'НТР высоко транслирующихся мРНК у *Arabidopsis thaliana*

Дейнеко И.В. *, Мустафаев О.Н. **, Тюрин А.А. *, Кабардаева К.В. *, Голденкова-Павлова И.В. *

* Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.

** Институт генетических ресурсов ААН, Баку, Азербайджан.

Igor.Deyneko@inbox.ru

ВВЕДЕНИЕ

Часто наблюдаемое несоответствие между уровнями транскриптов генов и их белковых продуктов предполагает существенную роль регуляции экспрессии генов на стадии трансляции мРНК. Трансляция представляет собой сложный биологический процесс с многочисленными участниками, включая сами мРНК, тРНК, рибосомы и другие белковые факторы. Регуляторные коды, закодированные в последовательностях мРНК, являются основными мишенями при регуляции трансляции конститутивным или специфичным образом.

Мы провели секвенирование мРНК, выделенной из клеток *A. thaliana* Columbia-0 и фракционированной на части, обогащенные и обедненные рибосомами. Статистический анализ (программы edgeR, R) был применен к трем экспериментальным наборам данных: полисомная мРНК, моносомная мРНК и общая цитозольная мРНК.

После нормализации и очистки данных сиквенирования, каждая мРНК была классифицирована в один из четырех наборов данных в соответствии с правилами: попадание в 15% самых высоких/низких мРНК в общей цитозольной фракции, разница мРНК в полисомной фракции и моносомной фракции отличается более чем в два раза, длина 5'UTR находится между 50 bp-250 bp и значение p-value отличия полисомной и моносомной фракций $\leq 10^{-4}$ (таблица 1).

Таблица 1. Количество мРНК в классифицированных группах. Используя критерии (см. текст), были составлены четыре набора данных мРНК, в зависимости от уровня транскрипции и рибосомной нагрузки.

Транскрипция \ Трансляция	Высокая (топ 15%)	Низкая (нижние 15%)
	Полисомы ($\log FC_i > 1$)	357
Моносомы ($\log FC_i < -1$)	177	336

Транскрипция

Используя наборы данных из таблицы 1 и программы для поиска мотивов были проанализированы все наборы на наличие потенциальных регуляторных мотивов. Наиболее значимым мотивом в 5'UTR мРНК в полисомной фракции был СТYYУТСТСТНУ (значение $p < 10^{-12}$). Применение программы Tomtom показало высокое сходство (p -value $< 10^{-4}$) с мотивами связывания для семейства факторов формирующих цинковый палец (факторы GATA1, GATA2, ZNF263). Кроме того, мотив МААМААТGGCKTC (p -value $< 10^{-9}$) был идентифицирован как окружающий стартовый кодон, но который имеет очень ограниченное сходство с известной последовательностью Козака. Также было показано, что нуклеотидный контекст 5'UTR в генах с высокой и низкой трансляцией демонстрирует существенные различия.

Метилтранскриптом является новой областью, которая изучает метилирование м6А в РНК. Используя две базы данных MeT-DB и MethSMR, было показано, что метилирование РНК в 5'UTR, как обратимая посттранскрипционная модификация нуклеотида А, положительно коррелирует с общим количеством цитозольной мРНК в клетке. Напротив, полисомные и моносомные фракции мРНК не отличаются по частоте метилирования в 5'UTR. Мы предполагаем, что корреляция между метилированием м6А и наблюдаемым в экспериментах более высоким выходом белка достигается за счет увеличения стабильности мРНК и, следовательно, более высокого количества мРНК в клетке.

Используя базу данных PANTHER v.14.0 была проведена функциональная классификация мРНК. Обнаружена статистически значимое превышение количества мРНК генов имеющих молекулярную функцию «регулирование» (GO: 0098772, наблюдаемое 12,7%, ожидаемое 4,5%, p -value = $2,9 * 10^{-5}$) и соответствующий биологический процесс «биологическая регуляция» (GO: 0065007, наблюдаемое 19%, ожидаемое 7,7%, p -value = $7,2 * 10^{-9}$) в наборе полисомальных мРНК с одновременно низкой транскрипцией. Этот факт имеет прямую биологическую интерпретацию, поскольку гены с регуляторной функцией обычно имеют невысокий уровень транскриптов, но как только требуется регуляция, белок быстро синтезируется с эффективно транслируемых мРНК.

Работа поддержана проектом РФФ (18-14-00026).

Регуляторы соматического эмбриогенеза среди генов *NF-Y* у *Medicago truncatula*

Поценковская Э.А., Творогова В.Е., Лутова Л.А.

Санкт-Петербургский Государственный Университет, кафедра Генетики и Биотехнологии, Университетская набережная, 7/9, 199034, Санкт-Петербург, Россия.
epots556@gmail.com

Соматический эмбриогенез (СЭ) – это процесс, при котором незиготические клетки формируют эмбрионы, которые проходят через характерные стадии эмбрионального развития, в итоге формируя новое растение. Этот процесс широко используется в биотехнологии для регенерации растений, что обуславливает многие методы трансформации растений, также применяется при получении искусственных семян и изучении зиготического эмбриогенеза.

Развитие эмбрионов из соматических клеток нечасто встречается в природе, но за несколько последних десятилетий для многих видов были разработаны протоколы для получения соматических эмбрионов. Значимость настоящего исследования заключается в первую очередь в том, что поиск и изучение регуляторов СЭ применяются для улучшения методик получения соматических эмбрионов.

Для гена *MtNF-YB10* с помощью ПЦР в реальном времени была показана активация экспрессии в ходе СЭ. Кроме того, мутанты с потерей функции этого гена в каллусной культуре, по-видимому, практически не способны к образованию соматических эмбрионов. А в условиях культивирования в жидкой среде потеря функции *MtNF-YB10* приводит к более раннему формированию соматических эмбрионов у *Medicago truncatula*. Эти данные позволяют предположить участие *MtNF-YB10* в СЭ.

Ближайшим гомологом гена *MtNF-YB10* у *Arabidopsis thaliana* является ген *LEC1*. Он задействован в развитии суспензора, ингибировании прорастания и формировании эмбриональных признаков.

MtNF-YB10 принадлежит к семейству ТФ *NF-YB*, которые вместе с субъединицами *NF-YA* и *NF-YC* образуют гетеротример *NF-Y*. Была поставлена задача - выявить гетеротримерные комплексы *NF-Y*, которые работают в СЭ у люцерны.

С помощью ПЦР в реальном времени было обнаружено, что уровень экспрессии генов *MtNF-YA3*, 4, 7, 8, а также гена *MtNF-YB3*, который является близким гомологом *MtNF-YB10*, специфически повышается в ходе соматического эмбриогенеза. Среди семейства *MtNF-YC* таких генов обнаружено не было, однако гены *MtNF-YC1*, 2, 3, 7 демонстрировали в целом высокий уровень экспрессии в каллусах.

По результатам анализа взаимодействия перечисленных выше белков с помощью дрожжевой двугибридной системы можно сделать вывод о том, что в *Medicago truncatula* следующие субъединицы способны к взаимодействию хотя бы в одном сочетании: субъединицы *MtNF-YB3*, *B10*, *C1*, *C2* и *C3* способны к взаимодействию с *MtNF-YA3*, *A4*, *A4*, *A7* и *A8*; субъединицы *MtNF-YB3*, *B10* способны к взаимодействию с *MtNF-YC1*, *C2*, *C3* и *C7*. А субъединица *MtNF-YC7* не способна к взаимодействию с *MtNF-YA3*, *A4*, *A4*, *A7* и *A8*.

В дальнейшем мы планируем проверить полученные данные с помощью метода бимолекулярной флуоресцентной комплементации и коиммунопреципитации. Кроме того, планируется продолжать поиск белковых партнеров субъединиц *MtNF-YB3* и *B10* с помощью аффинной очистки и последующего протеомного анализа. Также ведутся работы по получению растений *Medicago truncatula* с потерей функции отобранных генов *NF-Y* для анализа их роли СЭ, с использованием технологии CRISPR.

В случае обнаружения новых ингибиторов или стимуляторов СЭ на модельном объекте *Medicago truncatula*, следующей задачей будет получение растений семейства бобовые, таких как *Pisum sativum*, с увеличенной способностью к регенерации.

Данная работа поддержана грантами РНФ 16-16-10011 и РФФИ 20-016-00124.

Регуляция гидравлической проводимости и ее значение для адаптации растений к изменяющимся условиям обитания

Кудоярова Г.Р., Веселов Д.С., Высоцкая Л.Б.

Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, пр. Октября, 69, Уфа, Россия.
guzel@anrb.ru

Оптимальная оводненность тканей растений необходима для обеспечения их роста, фотосинтеза и высокой урожайности. Ее поддержание в изменяющихся условиях обитания – сложная задача, поскольку возрастание температуры воздуха, освещенности и усиление ветра увеличивают испарение воды с поверхности листьев, что может привести к дегидратации растений. Наиболее простое решение этой проблемы – закрытие устьиц. Однако результаты полевых испытаний, показали, что растения далеко не всех сортов пшеницы закрывают устьица при повышении температуры воздуха. При этом более высокой урожайностью в условиях умеренной засухи отличались именно растения, способные поддерживать устьичную проводимость, что можно объяснить необходимостью для фотосинтеза поступления через открытые устьица углекислого газа. Чтобы избежать дегидратации при повышении транспирации, растение должно увеличить приток воды из корней, а наиболее быстрый процесс, способный его ускорить, – это возрастание способности корней проводить воду, т.е. гидравлической проводимости. Остается загадкой, каким образом происходит координация процессов, контролирующей транспирацию и поступление воды из корней. Наши исследования показали, что эту роль может выполнять гормон абсцизовая кислота (АБК). При повышении температуры воздуха было выявлено быстрое накопление этого гормона в корнях растений пшеницы и ячменя. Очевидно, АБК поступала из побега, поскольку блокирование флоэмного транспорта предотвращало ее накопление в корнях. При этом АБК оставалась в листьях, что приводило к закрытию устьиц. Повышение уровня АБК в корнях способствовало возрастанию гидравлической проводимости, и обеспечивало увеличение притока воды из корней при повышении уровня транспирации. Наличие причинно-следственной связи между этими эффектами было доказано в экспериментах, в которых экзогенная АБК повышала гидравлическую проводимость корней. Иммуногистохимическая локализация с использованием специфических антител к АБК и HvPIP2 аквапоринам показала, что накопление этого гормона в клетках экзодермы корня ячменя приводит к повышению уровня аквапоринов и возрастанию проницаемости плазмалеммы для воды, что было доказано с помощью метода cell pressure probe. Значение накопления АБК в регуляции гидравлической проводимости при повышении температуры воздуха подтвердили эксперименты с дефицитным по АБК мутантом ячменя. Отсутствие накопления АБК у растений мутанта приводило к падению водного потенциала и прекращению роста на фоне неизменной гидравлической проводимости.

Повышение гидравлической проводимости оказывает свое положительное влияние на рост и оводненность растений при условии доступности почвенной влаги, но этот механизм может не сработать при подсыхании почвы в отсутствие дождей. В этих условиях, напротив, уменьшение активности аквапоринов может защищать растение, снижая потери воды при ее транспорте из глубины почвы по проводящей системе корней через подсыхающие верхние слои. Оценка экспрессии гена аквапорина PIP2;4 выявила резкое снижение уровня транскрипта в корнях при засолении у солеустойчивой линии дикого ячменя *Hordeum spontaneum*. Снижение гидравлической проводимости на фоне дефицита воды в среде обитания корней также связывают с АБК. Однако, в этом случае обсуждается влияние этого гормона на процессы, происходящие не в корнях, а в листьях. С помощью метода иммуногистохимической локализации мы действительно обнаружили снижение окрашивания на HvPIP2 и накопление АБК в клетках листьев ячменя при засолении. Однако не АБК была причиной снижения уровня аквапоринов. Погружение срезанных листьев в раствор АБК не снижало, а увеличивало содержание в них аквапоринов и их гидравлическую проводимость. Наши данные свидетельствуют против предположения о подавлении гидравлической проводимости под влиянием АБК в листьях ячменя. Скорее возможно обратное влияние, и накопление АБК в результате понижения гидравлической проводимости и оводненности листа (причиной может быть некий, возможно, гидравлический сигнал) приводит к закрытию устьиц.

Важно выявить механизм, регулирующий распределение АБК между побегом и корнями, что определяет влияние этого гормона на потоки воды, ограничивая их при накоплении АБК в побегах и увеличивая – в случае накопления гормона в корнях. На растениях арабидопсиса нами показано, что ванадат (ингибитор ABC транспортеров) снижает уровень АБК в корнях, вероятно, ингибируя загрузку гормона в побеге и его транспорт в корни. Задача будущего – выяснить, не этот ли механизм работает у растений ячменя и пшеницы, регулируя распределение АБК между побегом и корнем и гидравлический ответ на дефицит воды.

Таким образом, в зависимости от характера дефицита воды (в атмосфере или области корней), в адаптации растений участвуют разнообразные механизмы, вовлекающие как повышение, так и понижение гидравлической проводимости и транспирации за счет изменения активности аквапоринов. В реализации этих механизмов прослеживается роль АБК.

Грант РФФ № 21-14-00070.

Регуляция начальных этапов роста растений биологически активными веществами ксилотрофных грибов

Нсенгиумва Д.С., Балабанов П.А., Ермошин А.А., Киселева И.С.

Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина.
Ленина пр., 51, Екатеринбург, Россия.
irina.kiseleva@urfu.ru

В условиях ограниченных земельных ресурсов, пригодных для выращивания сельскохозяйственных культур и стремительно растущей численности населения Земли остро стоит вопрос интенсификации растениеводства «зелеными» способами, минимизирующими воздействие на окружающую среду и сохраняющими качество пищевой продукции. Поиск новых регуляторов роста растений является одной из задач, решение которой будет способствовать развитию таких технологий. Успехи в области синтеза аналогов фитогормонов позволили широко использовать в практике сельского хозяйства препараты стимулирующего и гербицидного действия. Однако, синтетические препараты не всегда метаболизируются растениями до безопасных и полностью разлагаемых соединений. В этой связи перспективным является поиск природных биологически активных веществ (БАВ), претендующих на роль регуляторов роста растений.

Известно, что представители царства Fungi являются продуцентами большого количества БАВ, которые широко используются в народной и официальной медицине, однако их использование в растениеводстве весьма ограничено. Ксилотрофные грибы, поражающие древесные растения, очевидно, имеют не только активные ферменты деградации целлюлозы и других компонентов клеточных стенок, но и большое количество других активных соединений белковой, фенольной, полисахаридной и др. природы, среди которых могут быть интересны как регуляторы роста и метаболизма растений.

В нашей работе изучено действие водных тотальных экстрактов 14 видов ксилотрофных базидиомицетов (трутовых грибов) на прорастание семян, рост проростков и накопление в них пигментов. Плодовые тела видов *Inonotus obliquus*, *Fomes fomentarius*, *Trichaptum pergamenum*, *Fomitopsis pinicola*, *Cerrena unicolor*, *Piptoporus betulinus*, *Daedaleopsis tricolor*, *Stereum subtomentosum*, *Funalia trogii*, *Phellinus cinereus*, *Trametes versicolor*, *T. pubescens*, *T. gibbosa* and *Ganoderma applanatum* были собраны в окрестностях биостанции УрФУ и в г. Екатеринбурге с 5 разных субстратов: *Betula pendula*, *Pinus Sylvestris*, *Prunus padus*, *Populus balsamifera*, *Picea obavata*.

Проращивание семян ячменя, томатов и огурцов на чашках Петри с добавлением экстрактов грибов (эквивалент 5 мг/мл) в сравнении с контролем (проращивание на дистиллированной воде) показало, что в большинстве случаев экстракты мало влияли на всхожесть семян (оценивали на 7, 8, 9, 10 день). Очевидный ингибирующий эффект был показан только для экстрактов чаги. У томата ингибирование прорастания составило 26,7%, у ячменя - 25% по сравнению с контролем, всхожесть семян огурца не изменялась. Однако, экстракты грибов влияли на энергию прорастания семян (показатель определяется на 3-5 день). Так, у ячменя на 3 день от замачивания этот показатель составил при использовании экстрактов 41,6-58,3 % против 26,6 % в контроле, а на 5 день, соответственно, 75,5-83,3 % против 58,3%. У томатов экстракты чаги, *F. fomentarius* и *D. tricolor* на 3 день подавляли энергию прорастания. Она составила 40% в контроле и 18-25% при добавлении экстрактов этих грибов. Экстракты *C. unicolor* и *T. versicolor*, напротив, стимулировали более быстрое прорастание: 60% на 3 день. На 5 день энергия прорастания составила 66,6% в контроле, при применении экстрактов *C. unicolor* и *T. versicolor* - 73,3 и 76,7%, а в случае чаги, *F. fomentarius* и *D. tricolor* 55 и 60%.

Биомасса проростков на 14 день эксперимента выросла во всех случаях при использовании экстрактов в сравнении с контролем: у ячменя на 3-23%, у огурца - 77-130% и томата - 52-93%. Содержание хлорофиллов и каротиноидов увеличивалось в листьях проростков ячменя, томатов и огурца при использовании экстрактов *C. unicolor*, *P. betulinus*, *D. tricolor*, *S. subtomentosum*, *F. trogii*, *P. cinereus*, *T. pubescens*, *T. gibbosa*, *G. applanatum*. Экстракты других видов в основном подавляли образование этих пигментов, за исключением содержания каротиноидов у ячменя при проращивании на экстрактах *I. obliquus*, *F. fomentarius*, *T. pergamenum*, *F. pinicola*.

Анализ всего массива данных позволяет сделать вывод о том, что водные экстракты плодовых тел *C. unicolor*, *P. betulinus*, *D. tricolor*, *S. subtomentosum*, *F. trogii*, *P. cinereus*, *T. pubescens*, *T. gibbosa*, *G. applanatum* оказывали преимущественно стимулирующее действие на прорастание семян и начальные этапы роста ячменя, огурца и томатов, а экстракты из *I. obliquus*, *F. fomentarius*, *T. pergamenum*, *F. pinicola*, *F. pinicola*, *T. versicolor* вызывали, в основном, ингибирование изученных процессов. Не обнаружено отличий в эффектах экстрактов одного и того же вида грибов в зависимости от природы древесного субстрата. Эффекты грибных экстрактов менее всего проявлялись на ячмене.

Таким образом, ксилотрофные базидиомицеты могут рассматриваться как возможные источники регуляторов роста растений. Для этого необходим детальный анализ состава экстрактов и оценка действия индивидуальных соединений.

Регуляция фитогормонами образования активных форм кислорода в митохондриях растений

Буцанец П.А., Баик А.С., Шугаева Н.А., Шугаев А.Г.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, Москва, ул. Ботаническая 35, Россия.
p.corbeau@list.ru

Изучено влияние салициловой кислоты (СК) и мелатонина на дыхание и продукцию активных форм кислорода (АФК) при окислении сукцината в митохондриях, выделенных из семядолей этиолированных проростков люпина (*Lupinus angustifolius* L.) и этиолированных эпикотилей гороха (*Pisum sativum* L.). Митохондрии выделяли методом дифференцированного центрифугирования, дыхание органелл измеряли полярографически с использованием кислородного электрода, образование АФК (H_2O_2) в митохондриях определяли с использованием флуорогенных индикаторов: Amplex Red (AR) и 2,7-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (DCFDA).

Полученные результаты показали, что присутствие в среде инкубации 0.05-2.0 мМ СК оказывало прямое действие на процесс окислительного фосфорилирования (скорость окисления субстратов, величину дыхательного контроля (ДК) и коэффициента АДФ:О), разобщая и ингибируя дыхание изолированных митохондрий растений в зависимости от ее концентрации. При этом более низкие концентрации СК оказывали преимущественно разобщающее действие на дыхание, что проявлялось в увеличении скорости окисления субстрата в состоянии 4 (в отсутствие АДФ). При увеличении концентрации СК (0.5 мМ и выше) наблюдалось заметное ингибирование окисления сукцината в состоянии 3 (в присутствии АДФ) и снижение величины ДК. Известно, что окисление субстратов ЦТК в митохондриях растений и животных сопровождается образованием АФК в трех точках ЭТЦ (комплексы I, II и III). Нами было обнаружено, что наибольшая скорость продукции перекиси водорода в исследуемых нами митохондриях (0.25 – 0.35 нмоль H_2O_2 в мин на мг белка), наблюдалась при окислении сукцината с участием комплекса II (сукцинатдегидрогеназы). Кроме того, были получены доказательства возможного участия СК в митохондриальном сигналинге, основанном на существенной активации под влиянием гормона образования АФК при окислении сукцината. Показано, что 0.05-0.1 мМ СК, существенно, в 1.5-2.5 раза стимулировала образование H_2O_2 митохондриями эпикотилей гороха и семядолей люпина, которую выявляли по разнице сигнала DCF в отсутствие и в присутствии дыхательного субстрата. Полученные результаты согласуются с литературными данными, согласно которым СК в низкой физиологической концентрации (10-50 мкМ) активирует перенос электронов в комплексе II, на уровне сукцинат-убихинон редуктазы. При этом существенно возрастает скорость образования супероксида при окислении сукцината, который в дальнейшем трансформируется в H_2O_2 с участием СОД. Далее, при инкубации митохондрий исследуемых растений в среде, содержащей мелатонин в концентрации 0.01-0.1 мМ, не было обнаружено заметного влияния гормона на скорость дыхания и величину коэффициента ДК. В то же время, в широком диапазоне концентраций (10^{-7} – 10^{-4} М) мелатонин оказывал существенное ингибирующее действие на образование H_2O_2 в митохондриях, которое зависело не только от концентрации, но также от чувствительности к гормону митохондрий, изолированных из различных растительных объектов. В митохондриях семядолей люпина это ингибирование было выражено более значительно (до 60% в присутствии 0.1 мМ мелатонина) и зависело от концентрации гормона, начиная с 0.001 мМ. Более высокие, но, по-видимому, нефизиологические концентрации гормона (1 мМ) снижали продукцию перекиси в митохондриях семядолей на 75-80%. Митохондрии эпикотилей гороха оказались несколько менее чувствительными к действию мелатонина, достоверное снижение генерации перекиси в них наблюдалось, начиная с 0.01 мМ концентрации гормона. Тем не менее, полученные результаты подтвердили антиоксидантные свойства мелатонина, которые ранее были продемонстрированы только на митохондриях животных.

В целом, полученные результаты показали способность СК и мелатонина оказывать прямое регуляторное действие на генерацию АФК митохондриями, обеспечивая защиту органелл от окислительного стресса, а также способствуя их вовлечению в формирование ответной реакции растений на неблагоприятные условия окружающей среды.

Регуляция формирования растительных клеточных стенок

*Мокишина Н.Е. *, Митсуда Н. **, Горшков О.В. *, Горшкова Т.А. **

* КИББ-обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН. Лобачевского 2/31, Казань, России.

** National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Цукуба, Япония.
ne_mokshina@kibb.knc.ru

Биосинтез и функционирование растительной клеточной стенки, одной из важнейших структур растительной клетки, стали одними из самых востребованных направлений исследований в современной биологии растений. Клеточные стенки, как основная часть растительной биомассы, являются основным компонентом возобновляемого растительного сырья и имеют огромный потенциал для промышленного применения и биоэкономики. Все растительные клетки окружены первичной клеточной стенкой, которая позволяет клетке удлиняться. Как только клетка достигает окончательного размера, многие клетки образуют утолщенные вторичные клеточные стенки, которые придают клетке дополнительную прочность и гидрофобность (волокна и сосуды). Именно вторичная клеточная стенка составляет основную массу древесины – лигноцеллюлозного сырья. Основными компонентами вторичной клеточной стенки являются целлюлоза, ксилан и лигнин. В волокнах многих видов растений формируется ТРЕТИЧНАЯ клеточная стенка (в древесине натяжения ее также называют G-слоем), в ней практически отсутствует лигнин и ксилан, она обогащена целлюлозой, а также содержит особый пектин - RG-I (рамногалактуронан I). В лубоволокнистых культурах, таких как конопля, лен, рами, третичная клеточная стенка формируется в волокнах конститутивно во время нормального развития растений, также ее формирование может быть индуцировано при гравистимуляции, что наблюдается в древесине натяжения покрытосеменных. Недавно были достигнуты существенные прорывы в исследованиях биохимических процессов и установлении сложных сетей регуляторов для первичных и вторичных клеточных стенок. При этом механизмы формирования третичной клеточной стенки недостаточно изучены и представляют своего рода одну из главных последних загадок в области изучения регуляции клеточных стенок. Выяснение механизмов формирования и регуляции третичной клеточной стенки в растениях, открыло бы возможность модулировать свойства растительного материала в сторону обогащения его целлюлозой и снижения лигнина, повысив, тем самым, эффективность обработки сырья и снизив энергозатраты.

В докладе будет представлен обзор данных литературы об известных регуляторах формирования первичных (факторы семейства ERF), вторичных клеточных стенок растений (факторы семейства NAC), а также результаты экспериментов, направленных на поиск факторов транскрипции, принимающих участие в формировании третичной клеточной стенки растительных волокон (факторы семейств NAC и bZIP).

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФ № 20-44-07005.

Регуляция фотосинтеза на уровне *Rubisco* высших растений (исторический аспект)

Косогова Т.М.

Луганский государственный педагогический университет. Оборонная ул., 2, Луганск.
kosogova@list.ru

Известно, что в широком смысле термин «регуляция» включает в себя и процессы управления. В ходе эволюции первыми возникли внутриклеточные системы регуляции. К ним относятся регуляция на уровне ферментов, генетическая и мембранная регуляция (например, фотохимически активных мембран тилакоидов). Фотосинтез – основной процесс, влияющий на продуктивность растительных организмов, который зависит от ряда факторов. Так, процесс фиксации CO_2 регулируется прежде всего светом, активизирует ряд ферментов цикла Кальвина, среди которых – *RUBISCO* (Е.С. 4.1.1.39). Известно, что он характеризуется бифункциональностью, действует при особых условиях, как карбоксилаза, так и оксигеназа. Этот фермент может находиться как в растворимом, так и связанном состоянии: Растворимая форма локализована в стромах хлоропластов, а связанная – ассоциирована с тилакоидами мембранами (Эдвардс Дж., Уокер Д., 1986; Романова, 1991; Русинова, Карапетян, Беляева, 1992; Makino Amane, 2003). Лабильная структура мембран позволяет им выполнять наряду с барьерной, транспортной, осмотической, электрической, структурной, энергетической, биосинтетической, секреторной и *рецепторно-регуляторную функцию*. Формирование *RUBISCO* включает в себя синтез, транспорт и сборку субъединиц (8 больших и 8 малых), которые кодируются в различных клеточных геномах. Синтез этого фермента контролируется на уровне ядра, а также – хлоропласта. Сбор *RUBISCO* в молекулу происходит в пластидах. Наиболее вероятная модель четвертичной структуры фермента – 8 больших и 8 малых субъединиц (*L8S8*) (Романова, 1991), с молекулярной массой 51-58 тыс. дальтон и 12-18 тыс. дальтон соответственно. Рядом ученых показано, что несмотря на центральную роль, *RUBISCO* «работает» малоэффективно по сравнению со многими другими ферментами, которые могут обрабатывать тысячи молекул в секунду, а *RUBISCO* за то же время – примерно три молекулы CO_2 . Растительные клетки компенсируют этот недостаток путем синтеза большого количества фермента (Curmi P.M., Cascio D., Sweet R.M., Eisenberg D., Schreuder H, 1992). Цель нашей работы (выполненной в период с 1983 по 1993 гг.) – показать *RUBISCO*, как фермент, которому принадлежит регуляторная роль в процессе фотосинтеза; определить содержание и активность фермента в проростках C_3 - и C_4 -растений. Экспериментальную работу выполняли в лаборатории автотрофной ассимиляции углерода Института биохимии им. А.Н. Баха АН СССР (в последующем – Института биохимии им. А.Н. Баха АН РАН). В нашей работе принимали участие – д.б.н., профессор Доман Н.Г., ведущий н.с., к.б.н. Русинова Н.Г., д.б.н., профессор Карапетян Н.В., н.с. Беляева Е.В. Объектом исследования были проростки *Hordeum sativum L.*, *Triticale trisppecies L.*, *Raphanus sativus L.* и *Zea mays L.* Карбоксилазную активность *RUBISCO* определяли радиометрическим методом при 30°C по скорости включения $^{14}\text{CO}_2$ с $\text{NaN}^{14}\text{CO}_3$ в кислотоустойчивые продукты реакции при наличии рибулозо-1,5-бисфосфата. Содержание *RUBISCO* в экстрактах из листьев проростков определяли по методу Дина и Лича после электрофоретического выделения фермента. Показано, содержание суммарного растворимого белка, включая *RUBISCO*, в листьях проростков редиса в 1,6 раза больше нежели у кукурузы и в 3 раза – у ячменя и тритикале при их выращивании в условиях освещенности $0,12 \text{ Вт/м}^2$. При освещенности $0,4 \text{ Вт/м}^2$ этот показатель остается почти у всех проростков на прежнем уровне, только у ячменя возрастает в 1,7 раза. По содержанию *RUBISCO* в мг/г сырой массы листьев – у проростков всех растений кроме редиса, для которого содержание фермента снижается при увеличении освещенности почти в 1,3 раза, этот показатель одинаков с вариантом освещенности $0,12 \text{ Вт/м}^2$. Активность *RUBISCO* в ед/мг суммарного растворимого белка (включая *RUBISCO*) ячменя и тритикале в 2 раза выше нежели у кукурузы и редиса при освещенности $0,12 \text{ Вт/м}^2$, при освещенности $0,4 \text{ Вт/м}^2$ данный показатель почти не меняется.

**Редокс-зависимое защелачивание апопласта и активность H^+ -АТФазы плазмалеммы
клеток корней этиолированных проростков гороха**

Лапшин Н.К., Пиотровский М.С., Трофимова М.С.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
troms@mail.ru

Важную роль в процессах роста растений как изотропного, так и анизотропного (в том числе, полярного) играет H^+ -АТФаза плазмалеммы, создающая трансмембранный протонный градиент, необходимый для поступления в растущую клетку ионов и метаболитов. От эффективности ее работы зависят основополагающие для жизни растительной клетки процессы, обеспечивающие ее осморегуляцию и поддержание ионного гомеостаза. В последние годы также установлено, что существенную роль в регуляции роста принадлежит НАДФН-оксидазам плазмалеммы, активность которых связана с продукцией АФК в апопласте. Однако, вопрос о том, чувствительна ли к АФК H^+ -транспортирующая активность АТФазы плазмалеммы остается неясным. В этой связи обращает на себя внимание присутствие в ферменте консервативных цистеиновых остатков, которые могут быть мишенями его возможной редокс-регуляции. Такой процесс имеет место, например, в случае Na^+/K^+ -АТФазы клеток животных, чувствительной к АФК и изменениям редокс-статуса цитозоля. Нельзя исключить, что окисление консервативных цистеинов H^+ -АТФазы Р-типа растений также может выступать важным фактором, влияющим на транспортную и каталитическую активности фермента. В настоящее время основным молекулярным механизмом, участвующим в регуляции активности H^+ -АТФазы клеток растений, все-таки принято считать ее фосфорилирование, которое сопровождается взаимодействием с регуляторными 14-3-3 белками. Известно, что редокс-зависимое фосфорилирование 14-3-3 белков по тирозину ингибирует их взаимодействие с АТФазой. Чтобы понять, какие молекулярные механизмы, связанные с окислением консервативных цистеинов H^+ -АТФаз Р-типа или с редокс-зависимым фосфорилированием 14-3-3 белков, регулирующим их взаимодействие с автоингибиторным С-терминальным доменом фермента, участвуют в активации/инактивации трансмембранной транслокации ионов H^+ , было предпринято настоящее исследование. Важно отметить, что несмотря на наличие в молекуле H^+ -АТФаз Р-типа относительно большого числа консервативных цистеинов, в том числе, с локализацией их в петлях, экспонированных в цитозоль, эти аминокислотные остатки до настоящего времени не рассматривались в качестве возможных редокс-сенсоров. Исследовали, каким образом изменяется активность основного протонного насоса плазматической мембраны клеток растений – АТФазы Р-типа в условиях окислительного стресса. Окислительный стресс имитировали обработкой корней гороха в присутствии окислителя – диамида или ингибитора редокс-чувствительных протеинфосфатаз – фениларсин оксида. Оценивали кинетические и транспортные активности фермента в составе изолированных везикулярных препаратов плазматических мембран. Обнаружено, что действие диамида сводится к ингибированию как гидролиза АТФ, так и протон-транспортирующей активности H^+ -АТФазы, при этом не происходило изменения K_m , однако в 2–3 раза снижались V_{max} и начальная скорость трансмембранного транспорта протонов, указывая на возможность конформационных изменений в молекуле фермента. Пассивная проницаемость плазмалеммы, полученной в разных условиях эксперимента, была идентична контрольному варианту. Анализ действия фениларсин оксида, модулирующего статус фосфорилирования, в частности 14-3-3 белков – известных регуляторов АТФазы, не выявил каких-либо существенных изменений активности фермента. Показано также, что на изолированных мембранах ни диамид, ни фениларсин оксид не вызывали изменений АТФ-зависимого трансмембранного H^+ -транспорта. Из этого можно заключить, что цистеиновые остатки молекулы АТФазы в мембранном окружении, защищены от непосредственного окисления. Для подтверждения этой гипотезы белки плазмалеммы были подвергнуты ПЭГилированию – процессу, при котором доступные цистеины мембранных белков подвергались алкилированию в присутствии ПЭГ-малеимида с последующим вестерн-блот анализом АТФазы. Показано, что только в денатурирующих условиях в присутствии ионных детергентов в ферменте выявляются SH-группы, способные к взаимодействию с ПЭГ-малеимидом. Сравнительный анализ молекулярных масс белковых комплексов, разделенных электрофорезом в нативных условиях содержащих АТФазу, подтвердил, что порядок олигомеризации фермента идентичен для мембран, полученных в присутствии дитиотреитола или диамида. Обработка корней проростков диамидом *in vivo* приводила к ингибированию роста и сопровождалась формированием широкой щелочной зоны вокруг растущего корня, тем самым, подтверждая концепцию «кислого» роста и роль в этом процессе H^+ -АТФазы плазмалеммы. Можно заключить, что АТФаза Р-типа плазмалеммы растений принадлежит редокс-зависимым ферментам, но регуляция таким способом ее активности происходит, скорее всего, опосредованно с участием ферментативных систем цитозоля.

Рекальцитрантные семена с глубоким покоем: физиология, биохимия, особенности клеточной структуры

Азаркович М.И.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
m-azarkovich@mail.ru

Рекальцитрантные семена, в отличие от высыхающих при созревании ортодоксальных семян, к моменту созревания сохраняют высокую влажность и активный метаболизм. Рекальцитрантные семена неустойчивы к высыханию, они не могут храниться длительное время. Единственным способом хранения таких семян является криоконсервация, требующая больших финансовых затрат. Поэтому для сельскохозяйственного производства рекальцитрантность семян является серьезной проблемой. Рекальцитрантные семена распространены среди видов, обитающих в тропиках и субтропиках, где климатические условия позволяют семенам прорасти сразу после опадения с материнских растений. Рекальцитрантные семена имеют важные хозяйственные растения, такие как *Coffea arabica* L., *Theobroma cacao* L., *Cocos nucifera* L., *Cola nitida* Vent., *Zizania aquatica* L. и ряд других. В жарком влажном климате рекальцитрантность семян (способствующая быстрому прорастанию) дает виду существенные преимущества. Однако при продвижении видов с рекальцитрантными семенами на север, где сезонные изменения температуры не позволяют реализовать преимущества быстрого прорастания, растениям с невысыхающими семенами приходится изобретать дополнительные защитные механизмы. Немногочисленные виды умеренного климата с рекальцитрантными семенами (*Quercus robur* L., *Aesculus hippocastanum* L.) для выживания в зимних условиях выработали в процессе эволюции состояние глубокого покоя.

Глубокий покой семян, как способ адаптации к неблагоприятным условиям, представляет собой сложное, тонко регулируемое, одно из наиболее загадочных явлений в жизни растений. В настоящее время природа и молекулярные механизмы индукции, поддержания и преодоления глубокого покоя семян всё ещё остаются неизвестными. Следует отметить, что физиология глубокого покоя исследуется преимущественно на семенах ортодоксального типа. Для преодоления глубокого покоя и инициации прорастания семян необходимо воздействие тех или иных специфических факторов. Для ряда семян, в том числе и для рекальцитрантных семян каштана конского таким фактором является воздействие низких положительных температур на увлажнённые семена, т.е., стратификация. Молекулярные механизмы действия стратификации на физиологическое состояние семян пока остаются неизвестными.

Показано, что зародышевые оси в покоящихся (не способных прорасти) рекальцитрантных семенах каштана конского (*Aesculus hippocastanum* L.) не имеют собственного покоя и обладают ростовой активностью. С использованием изолированных осей как модельной системы впервые охарактеризовано физиологическое состояние зародышевых осей рекальцитрантных семян в период глубокого покоя и его преодоления в ходе холодной стратификации, получены данные о характере действия фитогормонов на рост осевых органов, изолированных из покоящихся и прорастающих семян. Выявлено участие семядолей и семенной кожуры в поддержании покоя зародыша и ключевая роль АБК в этих процессах. Очевидно, глубокий покой является результатом сложного взаимодействия различных тканей семени, а потеря чувствительности зародышевых осей к АБК может свидетельствовать о завершении прорастания.

Проведенный нами анализ белков зародыша показал, что, в отличие от большинства ортодоксальных семян, характерной чертой протеома семян каштана конского является высокое содержание в цитозоле белков альбуминового типа, среди которых доминируют устойчивые к тепловой денатурации (термостабильные) белки, а содержание глобулинов, которые могли бы претендовать на роль запасных белков, крайне невелико.

При цитологическом исследовании клеток осей и семядолей семян каштана алейроновые зерна (белковые тела) не были обнаружены, что подтвердило биохимические данные об отсутствии в семенах каштана типичных для ортодоксальных семян запасных белков. Исследование семян дуба черешчатого (*Quercus robur* L.), которые также относятся к рекальцитрантному типу, показало отсутствие алейроновых зерен и белков глобулинового типа, которые могли бы претендовать на роль запасных белков. Сходные особенности белкового состава и клеточной структуры семян каштана и дуба могут быть связаны с рекальцитрантным характером исследуемых семян, а также с необходимостью во влажном состоянии переносить длительное охлаждение в зимний период. Хотя синтез белков в клетках осевых органов и семядолей семян каштана конского идет даже в условиях холодной стратификации, включения радиоактивной метки в главные мажорные термостабильные полипептиды не происходит. Синтез белка в изолированных частях зародыша ингибируется циклогексимидом на 95% и в ходе стратификации нечувствителен к α -аманитину (7мкг/мл), но подавляется им на 40% при прорастании. Это указывает на присутствие преформированных мРНК, способных участвовать в трансляции, тогда как при прорастании синтез белка в значительной степени зависит от транскрипции.

Такие характеристики протеома, как отсутствие типичных запасных белков (и отсутствие белковых тел в клетках), накопление большого количества термостабильных белков, могут служить диагностическим признаком рекальцитрантности семян. Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ и Программы «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН.

Репродуктивный статус растений как основа физиологической селекции (теоретические и прикладные аспекты)

Гончарова Э.А.

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений
имени Н.И. Вавилова. Б. Морская 42, 44, Санкт-Петербург, Россия.
e.goncharova@vir.nw.ru

Результаты изучения эколого-физиологических механизмов адаптации различных сельскохозяйственных культур убедительно показали, что их урожай и слагающие его компоненты в разной степени изменяются в одних и тех же неблагоприятных условиях. Однако, следует отметить, что различные по своему характеру экстремальные факторы (засуха, жара, дефицит питания и т.д.) оказывают на структуру урожая растений однотипное по своему характеру воздействие. Отмеченные закономерности изменения структуры урожая в экстремальных условиях среды генетически обусловлены и имеют большую целесообразность с точки зрения сохранения в разных условиях вида, как эволюционирующей биологической единицы. Так, при образовании плодов, между ними и вегетативными органами (в частности, листьями) устанавливаются специфические донорно-акцепторные взаимодействия, проявляющиеся в особенностях транспорта воды и других веществ к разным плодам и листьям, в различиях физиолого-биохимических параметров (водного обмена, фотосинтезирующего аппарата, гормонального баланса и др.) у плодов и разноудаленных от него листьев. Такие взаимодействия (особо степень аттракции генеративных органов) не только определяют формирование уровня продуктивности в условиях их вегетации, но и играют существенную роль в устойчивости растений к стрессам. Применение радиоизотопных и биофизических методов позволило впервые установить, что в системе плодоносящего растения транспорт веществ осуществляется по пути корень (стебель) – лист – плод. Барьерную (но функционально значимую) роль перед плодом на этом пути выполняют наиболее близко расположенные к нему «питающие» листья. В основе осуществления выявленных изменений лежит ряд механизмов, связанных с метаболизмом растения: резко проявляется функциональная значимость листьев, по-разному расположенных к плодам: наиболее высокая стабильность физиологических процессов (водообмен, фотосинтез, гормональный и нуклеиновый балансы и т.д.) у близлежащих. В экстремальных условиях гормональный баланс в плодах в период их интенсивного роста сдвигается в сторону усиления его активности и приводит к усилению аттрагирующего влияния плодов на транспорт веществ. Обнаружено что снижение пула транспортируемых в растении воды и ассимилятов при стрессе приводит, как правило, к обострению конкуренции между плодами. Экспериментально показано достоверное воздействие плодов на общую устойчивость растений. Последнее, очевидно, имеет глубокий биологический смысл и причинную обоснованность, так как образование генеративных органов мобилизует все потенциальные возможности организма, в том числе и его устойчивость к стрессам и сопротивляемость. У представителей некоторых видов растений генетически приспособленных к разным типам естественного размножения (генеративного и вегетативного) в условиях экологических стрессов изменяется способность воспроизводства популяции (Род *Fragaria* L.).

Следовательно, генетически детерминированная регуляция плодоношения растений направлена на поддержание функционально и биологически наиболее важных органов. Последнее особо важно при диагностике стрессустойчивости генотипов используемых в интродукции и селекционной практике.

**Роль *AOX1a* в модификации клеточных сигнальных путей в растениях
Arabidopsis thaliana при повышенной инсоляции**

Гармаш Е.В., Белых Е.С., Малышев Р.В., Дымова О.В., Велегжанинов И.О.

Институт биологии Коми НЦ УрО РАН ФГБУН ФИЦ «Коми научный центр Уральского отделения
Российской академии наук», Сыктывкар, Россия.
garmash@ib.komisc.ru

К настоящему времени сложилось мнение о том, что дыхательная ЭТЦ (мЭТЦ) участвует оптимизации фотосинтеза растений, и важную роль при этом играет альтернативная терминальная оксидаза (АОХ), обеспечивающая окисление избытка экспортируемых из хлоропластов восстановителей (Noguchi, Yoshida, 2008; Dinakar et al., 2010; Garmash et al., 2017). Механизмы световой регуляции экспрессии генов АОХ и других митохондриальных нефосфорилирующих путей (НФП) остаются слабо изученными. Задачей работы было провести профилирование экспрессии генов АОХ, других НФП в листьях *Arabidopsis thaliana* с разным уровнем экспрессии *AOX1a* при повышенной освещенности, выявить потенциальные механизмы транскрипционного контроля экспрессии генов путем анализа их промоторов на наличие общих *cis*-регуляторных элементов (CAREs). Для этого 4-х недельные растения трех линий (дикого экотипа Col-0, линии XX-2 со сверхэкспрессией гена и антисенсовой линии AS-12), выращенные при 100 мкмоль/м² с, экспонировали к повышенному уровню освещения (400 мкмоль/м² с) в течение 8 часов.

При повышенном освещении в линии дикого экотипа Col-0 усиливалась экспрессия *AOX1a*, *AOX1c* и *AOX2*, в антисенсовой линии AS-12 – *AOX1d*. Линия XX-2 характеризовалась стабильно высоким уровнем экспрессии *AOX1a*, что очевидно было результатом повышенного базального уровня экспрессии гена (Umbach et al., 2005). Схожий характер экспрессии *AOX1a,c,d* и *AOX2* и наличие в их промоторах общих светозависимых CAREs подтверждает возможность комплементарного взаимодействия генов АОХ на свету. Присутствие нескольких элементов G-box (CACGTG) в промоторах *AOX1a* и *AOX2* и коэкспрессия этих генов свидетельствует об их световой индукции по пути активации транскрипционного фактора (ТФ) семейства bZIP – GBF1, являющегося активатором фотоморфогенеза (Menkens et al., 1995; Mallappa et al., 2006). Световая индукция экспрессии *AOX1a,c,d*, по-видимому, больше зависит от редокс-состояния ЭТЦ хлоропластов. Присутствующие в промоторах генов SORLEP3, SORLIP2, CCA1 связываются с ТФ семейства MYB, участвующими в фитохромной регуляции экспрессии генов, кодирующих белки для сборки светособирающего комплекса ФС II (Wang et al., 1997; Hudson, Quail, 2003).

Индукция генов АОХ сопровождалась усилением синтеза белка АОХ. Содержание белка АОХ1 34 кДа – продукта экспрессии *AOX1a* – заметно увеличивалось в линии Col-0 и AS-12, в линии XX-2 – поддерживалось в обильном количестве. Синтез белка АОХ2 38 кДа был несколько выше в линии AS-12 по сравнению XX-2 и усиливался в линии Col-0, что указывало на важную роль АОХ2 в реакции на свет.

Усиление экспрессии большинства генов НФП (*NDA1*, 2, *NDC1*, *NDB1,2,3*, *UCP1,2*, 3, 5) при высокой освещенности наблюдали в линии AS-12. Анализ промоторов *AOX1a*, *NDA1* и *NDB2* выявил самое высокое совпадение в них общих свето- и стрессозависимых CAREs, что указывает на возможность взаимодействия генов на транскрипционном уровне. Экспрессия *NDA1* и *NDB2*, а также синтез кодируемых белков в линии XX-2 имели взаимодополняющий, а в линии AS-12 – компенсирующий характер. Промоторы генов *NDA2*, *NDB3* и *UCP1*, экспрессия которых усилилась «на высоком свете» только в AS-12, имели меньшее содержание общих с *AOX1a* элементов. Гены *NDA1*, *NDB2* и *UCP5*, напротив, в промоторах содержали высокое количество общих с *AOX1a* CAREs (9-14), но экспрессия этих генов не зависела от уровня экспрессии *AOX1a*. Таким образом, наличие в промоторах генов общих мотивов указывает лишь на их возможное взаимодействие на уровне транскрипционного ответа, а схожий характер индукции экспрессии генов, скорее всего, обусловлен общими сигнальными путями или их сближением.

Показатели, отражающие состояние окислительного стресса – активность ПОЛ, образование супероксида – увеличивались при повышенной освещенности только в линии Col-0. В линиях XX-2 и AS-12 эти показатели были вдвое ниже, что указывает на пре-адаптацию (готовность) трансформантов к возможному действию стресса.

Полученные данные свидетельствуют о зависимости экспрессии генов НФП от уровня экспрессии *AOX1a*. Выявлен явный компенсаторный эффект растений линии AS-12 за счет индукции экспрессии генов и активации других НФП. Сделан вывод о том, что подавление АОХ усиливало митохондриальный путь передачи сигналов о стрессе, а сверхэкспрессия гена – обеспечивала низкий базальный уровень АФК и эффективную защиту от светового стресса. Результаты работы соответствуют представлениям о том, что АОХ является «важным игроком» в модификации и интеграции сигнальных путей, определяющих экспрессию других генов НФП и, в целом, реакцию растения на стресс (Giraud et al., 2008; Van Aken et al., 2009).

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00476-а.

Роль внешних факторов среды и внутренних параметров при моделировании фотосинтеза на уровне листа

Болондинский В.К. *, Соколов А.В. **

*Институт леса КарНЦ РАН, Петрозаводск. Россия, 185910. Петрозаводск, Пушкинская 11.

**Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН. Россия, 119991 Москва, ул. Косыгина, 19.

**Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН. Россия, 127051,

г. Москва, Б. Каретный пер., д. 19, стр. 1.

bolond@krc.karelia.ru

В связи с многообразием вариантов описания функционирования фотосинтетического аппарата в настоящее время не удается достигнуть полной однозначности между совокупностью экспериментальных данных и объясняющей их моделью, так как всегда приходится выбирать между несколькими возможными вариантами модели, различающимися по сложности внутренних взаимосвязей (Laisk, Oja, 1998).

В нашей работе использованы результаты экспериментов по измерению газообмена (H_2O и CO_2) у сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) и внешних факторов среды (освещенность, температура и влажность воздуха), проводившихся на полевой базе «Габозеро» в 50 км к северу от г. Петрозаводска ($62^{\circ}13'$ с.ш. и $34^{\circ}10'$ в.д.). Исследования фотосинтеза проводились с помощью стационарной газометрической установки на базе газоанализатора Infracal-4 (Junkalor, DDR) в сосняке черничном свежем на дереве 45-55-летнего возраста. В исследованиях 1990-2000-х годов использовалась портативная система LI-6200 (фирма LI-COR, США). Транспирация (E) измерялась с помощью установки на базе дифференциального психрометра (конструкция Б.М. Веселкова). Из большого массива данных для моделирования был выбран фрагмент с 20 июня по 23 июля (1632 измерения с шагом 30 минут), который попал на окончание апикального роста, и начало интенсивного радиального роста.

Для построения моделей использовалась технология сбалансированной идентификации, которая объединяет в единое целое несколько областей математики, современное программное обеспечение и возможность привлечения мощных распределенных вычислительных ресурсов. Технология позволила рассмотреть ряд моделей, объективно оценить значимость рассматриваемых гипотез, определить погрешности описания используемого набора данных и объективно оценить, насколько различные варианты модели соответствуют имеющемуся экспериментальному материалу. Особое внимание уделялось ошибке кроссвалидации – если при модификации модели (усложнении или упрощении) погрешность убывает – это серьезный аргумент в пользу изменения. В процессе модификации всякая последующая модель являлась развитием предыдущей. Таким образом, только недавно появилась возможность обработать данные, полученные в 80-90-х годах и построить модель, соответствующей сложности.

На основе закона диффузии Фика (для водяного пара и CO_2) были рассчитаны устьичная проводимость (G_s) и концентрация CO_2 в межклеточниках (C_i). Первоначальные модели простых функциональных зависимостей фотосинтеза (P) от внешних факторов среды, усложнялись введением в рассмотрение устьичной проводимости (G_s), динамики CO_2 в атмосфере и углекислотных компенсационных пунктов (УПК). Модели показали, что при отсутствии дефицита влаги в почве ведущими факторами, влияющими на G_s , являлись солнечная радиация (Q) и дефицит воды в растении (WD). Температура воздуха (T) и дефицит давления водяного пара в воздухе (VPD) оказывали в анализируемый период меньшее влияние на фотосинтез, но VPD являлся основным внешним фактором, определяющим водный режим растения. Добавление в модель мезофильной проводимости (G_m), рассчитанной на основе закона диффузии с использованием УПК, увеличило погрешность. При этом модель предсказывала уменьшение G_m при росте Q в диапазоне 2300-3500 $\mu\text{моль м}^{-2} \text{с}^{-1}$. Кроме того, G_m возрастала при увеличении VPD и WD . В результате отсутствия осадков, несмотря на уменьшение G_s фотосинтез и транспирация (E) сохраняли относительное постоянство, как и показатель эффективности использования воды (WUE). Лишь в дождливые периоды наблюдалось значительное его увеличение, вызванное низкими значениями VPD . Рассчитанные по модели среднесуточные значения P , E , WUE и WD составили соответственно 2.52 $\mu\text{моль м}^{-2} \text{с}^{-1}$, 0.196 $\text{ммоль м}^{-2} \text{с}^{-1}$, 12.8 $\mu\text{моль } CO_2 \cdot (\text{ммоль } H_2O)^{-1}$ и 2.32 л. В кратковременные периоды повышения T (до $24^{\circ}C$) и VPD (до 2 кПа) на фоне роста WD существенного снижения фотосинтеза и транспирации не наблюдалось. Величина WUE отклонялась от среднего значения не более 7%.

Таким образом, результаты модели показывают, что в период интенсивного роста регуляция процессов направлена на сохранение высокого уровня CO_2 -газообмена при неснижающемся показателе WUE .

Работа выполнена сотрудниками ИППИ РАН (при финансовой поддержке РФФИ проект 20-07-00701) и Института леса КарНЦ РАН (финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0220-2014-0010)).

Роль мелатонина в изменении экспрессии генов метаболизма и сигналинга цитокининов и АБК у *Arabidopsis thaliana* при фотоокислительном стрессе

Бычков И.А., Кудрякова Н.В., Кузнецов В.В.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
Ivan.a.b@mail.ru

Мелатонин является высокоактивным соединением, способным выступать в качестве регулятора физиологических процессов и выполнять антиоксидантную функцию при воздействии различных биотических и абиотических стрессов. В ряде исследований было показано, что мелатонин может влиять на гормональный статус в клетках растений, однако механизмы такого воздействия почти не изучались. Целью данной работы было исследование влияния мелатонина на экспрессию ряда генов, связанных с восприятием и передачей сигналов цитокининов и абсцизовой кислоты (АБК) и содержанием этих гормонов при фотоокислительном стрессе.

Использовали растения *Arabidopsis thaliana*, которые выращивали на агаризованной MS-среде с половинным содержанием минеральных солей в камере фитотрона при 22°C, интенсивности освещения 60 мкМ⁻² с⁻¹ и световом режиме 16/8. Двухнедельные растения переносили на трое суток на бумажные фильтры, смоченные жидкой MS-средой, в которую добавляли мелатонин в концентрации 50 мкМ или эквивалентное количество спирта. Контрольные растения оставляли в фитотроне в условиях выращивания. Накопление транскриптов изучаемых генов анализировали с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Свет высокой интенсивности (600мЕ 24 часа) значительно активировал экспрессию генов, участвующих в сигналинге АБК (*ABI1*, *ABI2*, *ABI4*, *ABI5*), по сравнению с контролем. Экзогенный мелатонин уменьшал их индукцию, в то время как в контрольных условиях эффект был выражен очень слабо. Сходная картина наблюдалась для гена *ABA3*, белок кодируемый этим геном -молибденовый кофактор сульфуразы, превращает альдегид АБК в АБК на последнем этапе ее синтеза.

В контрольных условиях мелатонин резко снижал экспрессию генов синтеза и сигналинга: цитокининов рецептора *AHK3*, фосфотрансмиттера *AHP2*, транскрипционных факторов *ARR2* и *CRF6* и генов регуляторов ответа типа А *ARR4* и *ARR5*, а также гена *IPT3* участвующего в биосинтезе цитокинина. Однако в условиях стрессового воздействия данного эффекта не наблюдалось. Более того, экзогенный мелатонин повышал уровни транскриптов *ARR4* и *ARR5*. Для *ARR4* эта реакция, возможно, связана с его вовлечением в световой сигналинг при взаимодействии с фитохромом В. Вместе с тем известно, что, индукция регуляторов типа А создает негативную регуляторную петлю, которая позволяет модулировать силу и длительность ответа на ЦК. Следовательно, при сильном продолжительном воздействии света, мелатонин, вероятно, способствует снижению ответа на ЦК и, как следствие, обеспечивает сохранение жизнеспособности растений.

Таким образом, наблюдается взаимодействие мелатонина и фитогормонов на уровне экспрессии генома. Подтверждена тесная связь мелатонина с абсцизовой кислотой и его участие в модуляции цитокининового сигнала при сильном, продолжительном воздействии света. Понимание роли мелатонина в гормональных взаимодействиях может расширить представления о «тонкой настройке» регуляторных механизмов защиты растений в условиях стрессового воздействия.

Роль метаболических перестроек в механизмах адаптации растений амаранта к Cd и Zn стрессу

Осмоловская Н.Г., Билова Т.Е., Ву В.З., Лыкова Т.Ю., Тараховская Е.Р., Фролов А.А.

Санкт-Петербургский государственный университет.
Университетская наб., 7-9, Санкт-Петербург, Россия.
natalia_osm@mail.ru

Исследование метаболических перестроек, происходящих в растениях при абиотическом стрессе, становится все более актуальным в связи с серьезными угрозами, которые неблагоприятные условия окружающей среды и экологические стрессы представляют для мирового производства растительной продукции. Загрязнение среды тяжелыми металлами (ТМ) приводит к существенному снижению урожайности многих сельскохозяйственных культур. В то же время, растения способны проявлять весьма эффективные стратегии адаптации к неблагоприятным факторам среды, в том числе, сопряженные с изменениями в их метаболизме. Это в значительной степени является причиной роста интереса к использованию метаболомного подхода при анализе устойчивости растений к действию тяжелых металлов. Несомненный интерес в качестве объекта метаболомного исследования представляют растения рода *Amaranthus*, имеющие широкий ареал произрастания в разных климатических зонах и позиционируемые как высокопродуктивная пищевая и кормовая культура с C₄-типом фотосинтеза, богатая биологически активными веществами и антиоксидантами. Наше исследование выполнялось в условиях водной культуры на растениях *Amaranthus caudatus*, которые в возрасте 6 недель подвергали 7 сут воздействию ТМ стресса путем внесения 300 мкмоль/л Zn или 90 мкмоль/л Cd в питательную среду. Анализ состава и определение концентраций метаболитов проводили в корнях, ювенильных и зрелых листьях амаранта с использованием метода газовой хромато-масс-спектрометрии (GC-MS). На основании проведенного анализа было аннотировано более 200 метаболитов и установлено, что воздействие Zn и Cd вызывало существенные биохимические перестройки в различных органах растений, которые носили металло- и органоспецифичный характер, и очевидно имели адаптационную направленность. В наибольшей степени изменились паттерны метаболитов в корнях амаранта, где в присутствии Cd и Zn наблюдалось увеличение относительного содержания, соответственно, для 74 и 81 метаболита, а снижение – для 16 и 43 метаболитов. Увеличение содержания наблюдалось, прежде всего, в отношении карбоновых кислот (цитрат, малонат и др.) и сахаров, причем если уровни глюкозы, фруктозы, арабинозы, а также ряда ди- и олигосахаридов возрастали в основном в 2-3 раза, то содержание сахарных кислот возрастало до 15-30 раз, в том числе, глюконовой кислоты в 14 и 24 раза при воздействии Cd и Zn соответственно, что позволяет говорить о ее возможной функциональной роли как хелатора ТМ в корнях амаранта. Среди аминокислот заметный прирост отмечен только в отношении пролина и аланина и наблюдался исключительно в присутствии цинка. Существенно, что оба ТМ вызывали повышение уровней важнейших вторичных метаболитов, таких как шикимовая кислота (в 2,5 раза), а также коричная и ее производные – кофейная (до 4-7 раз) и феруловая кислоты, локализуемых преимущественно в клеточных стенках и играющих роль антиоксидантов и предшественников в синтезе лигнина, что указывает на вероятность их участия в стратегиях адаптации амаранта в условиях ТМ стресса. В листьях растений в ответах на ТМ стресс участвовало меньшее количество метаболитов, причем Cd инициировал увеличение их содержания преимущественно в ювенильных листьях (49 метаболитов против 11 в зрелом листе), тогда как для Zn отмечена обратная зависимость – уровни только 9 метаболитов повышались в ювенильных листьях против 48 в зрелом листе. В ювенильных листьях при действии Cd возрастало содержание, в первую очередь, растворимых сахаров, в том числе, глюкозы, сахарозы, ряда ди- и олигосахаридов, а также сахарных кислот, валлина и некоторых фенольных и жирных кислот, которое, однако, не превышало 2-3-кратного. В отличие от этого, в зрелых листьях амаранта содержание сахаров не менялось, либо даже снижалось, в то время в содержании некоторых карбоновых кислот отмечался заметный прирост, в частности, малата – до 5 раз, что коррелирует со стратегией адаптации органов побега по пути перераспределения метаболитов из донорного в акцепторный лист и ускорения этапов их онтогенеза. При Zn стрессе уровни большинства метаболитов в ювенильных листьях не изменялись, за исключением прироста в содержании арахидоновой и стеариновой кислот, в то время как в зрелых листьях внесение Zn инициировало 2-3,5 -кратное повышение содержания большинства растворимых углеводов, а также малата (в 2,7 раза), и в меньшей степени – эритроновой и глюконовой кислот. Эти наблюдения позволяют говорить об отличиях в стратегиях адаптации амаранта к разным ТМ, возможно, обусловленных меньшей токсичностью Zn в сравнении с Cd при заданных концентрациях и длительности воздействия ТМ, что в случае Zn воздействия не привело к усилению оттока метаболитов в ювенильные листья на фоне повышения их содержания в зрелом листе. Несомненно, значимым в метаболомном ответе амаранта на внесение ТМ явилось повышение содержания в его органах салициловой кислоты как важной сигнальной молекулы в условиях стресса. Максимальное возрастание уровня салицилата наблюдалось в ответ на Zn воздействие, причем наибольший прирост отмечался в корнях (в 24 раза) и в ювенильных листьях (в 26 раз), тогда как при Cd стрессе прирост содержания салицилата в этих органах составил 6 и 9 раз соответственно. Можно заключить, что метаболические перестройки, отмеченные в органах амаранта, являются важными составляющими стратегии адаптации этого растения к ТМ стрессу, направленными как на детоксикацию ионов ТМ, так и на устранение негативных последствий, сопряженных с нарушениями водного и редокс статуса в органах растений.

Роль природных стимуляторов в адаптации новых сортов хлопчатника к засолению почв

Бабаева Д.Т., Наврузов С.Б., Нурматова М.И., Кулдошева К., Ахунوف А.А., Хашимова Н.Р.

Институт биоорганической химии им. А.С. Садыкова АН РУз.
Мирзо Улугбека, 83, Ташкент, Узбекистан.
info@biochem.uz

Растения в процессе развития сталкиваются с широким спектром стрессовых воздействий окружающей среды, включая экстремальные температуры, засуху, засоление, токсичность загрязняющих веществ, которые могут негативно влиять на рост и урожайность многих основных культур. Повышение стрессоустойчивости и урожайности сельскохозяйственных растений экологически чистым способом при низких затратах и меньшем количестве химических веществ является важнейшей задачей в сельском хозяйстве.

Применение тритерпеновых гликозидов в составе комплекса с биологически активными веществами становится все более популярным подходом к разработке новых транспортных форм низкодозных препаратов. Созданные таким путем композиции при низких концентрациях сохраняют действие активно действующего вещества, которые менее токсичны, намного экономичны и обладают рядом новых полезных свойств. Глицирризиновая кислота (ГК) является преобладающим тритерпеновым гликозидом корней солодки *Glycyrrhiza glabra* L., способной стимулировать рост растений в условиях засоления почв. Концентрация ГК 10^{-6} М оказывает слабое цитокинин-подобное действие. Высокая биологическая активность ГК и салициловой кислоты (СК) явилась предпосылкой для разработки способа практического использования супрамолекулярного комплекса ГК с СК (далее препарат ДАГ-1) в сельскохозяйственной практике в качестве регулятора роста и индуктора устойчивости хлопчатника в условиях засоления почв.

Было изучено влияние предпосевной обработки семян хлопчатника серии Порлок, полученного методом «геннокаута» и классической селекции – солеустойчивого сорта Султан препаратом ДАГ-1 в концентрации 10^{-7} М (экспериментально установленной) на рост и развитие растений в лабораторных (100 мМ NaCl) и полевых условиях засоления почв. Предпосевная обработка новых сортов хлопчатника препаратом ДАГ-1 привело к значительным изменениям в про-/антиоксидантной системе, позволившая оценить эффективность препарата для каждого исследуемого генотипа, с учетом его влияния на уровень продуктов перекисного окисления липидов; накопление вторичного мессенджера – H_2O_2 , индуцирующее синтез ферментов-антиоксидантов, уровень которых определяет устойчивость клетки к действию засоления; содержание свободного пролина как осмолитика и низкомолекулярного антиоксиданта; содержание редуцирующих сахаров; уровень фитогормонов абсцизовой (АБК), индолилуксусной (ИУК) и салициловой (СК) кислот как регуляторов клеточного гомеостаза.

Лабораторные исследования влияния препарата ДАГ-1 на формирование ответных реакций хлопчатника к солевому стрессу показали, что включение защитных механизмов в исследуемых сортах имело определенную последовательность. На первом этапе солевого стресса (1 ч) увеличение содержания редуцирующих сахаров и пролина обеспечивала функционирование осмотических и антиоксидантных систем. На втором этапе (24 ч) эффективность антиоксидантной системы возрастала за счет увеличения активности ферментов аскорбатпероксидазы, супероксиддисмутазы, а также повышения содержания свободного пролина.

Исследование влияния препарата ДАГ-1 в условиях засоления на уровень эндогенных фитогормонов биотехнологических сортов хлопчатника методом масс спектрометрии (LC-MS) показало повышение содержания эндогенной СК, АБК и снижение ИУК. Такая стимуляция путей биосинтеза эндогенной СК и АБК и репрессия биосинтеза ИУК, вероятно, объясняет усиление вегетативного роста хлопчатника и усиление устойчивости к стрессу засоления, наблюдаемый и другими исследователями после применения биоактивных природных соединений.

В полевых условиях было выявлено пролонгирующее адаптивное действие препарата ДАГ-1 при предпосевной обработке семян и опрыскивании хлопчатника сорта Порлок и Султан на стадии бутонизации, ускоряющее процессы созревания волокна, накопление целлюлозы. Гистохимический анализ хлопкового волокна в динамике развития в 20, 30, 40 дневных коробочках выявило повышение содержания H_2O_2 , участвующий в процессах растяжения и формировании вторичной клеточной стенки хлопкового волокна. Установлено, что предпосевная обработка семян хлопчатника препаратом ДАГ-1 оказывала не только защитно-стимулирующее действие, но и способствовало увеличению ростовой активности и в конечном итоге повышению урожайности хлопчатника. Урожайность биотехнологического сорта Порлок и сорта Султан при предпосевной обработке семян и опрыскивании кустов перед цветением препаратом повысилась по сравнению с контролем на 9.0 и 7.0 ц/га соответственно.

Таким образом, препараты на основе глицирризиновой кислоты можно использовать в регулировании молекулярного и биохимического адаптационного потенциала, заложенного в генотипе хлопчатника для повышения толерантности к экологическим стрессам, что в свою очередь позволит увеличить их урожайность.

Роль сурфактина в индукции устойчивости растений картофеля против *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) эндофитным штаммом *Bacillus subtilis* 26Д

Сорокань А.В., Бенковская Г.В., Благова Д.К., Максимов И.В.

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа, Россия.
fourtyanns@googlegmail.com

Колорадский жук (КЖ) является одним из наиболее важных вредителей в картофелеводческих регионах мира. Обнаружено, что некоторые популяции КЖ формируют резистентность к ряду часто используемых химических инсектицидов и биопрепаратов на основе бактерии *Bacillus thuringiensis*. Для замедления развития такой резистентности необходимо как можно более комплексное воздействие на организм жука, которое может быть достигнуто праймированием защитных реакций растений химическими иммуномодуляторами или штаммами стимулирующих рост растений микроорганизмов (СРРМ). Следует отметить, что некоторые СРРМ являются эндофитами, то есть обитают внутри тканей растений и защищены от воздействия внешних условий зоны рискованного земледелия. Индуцируемая устойчивость связана с ранними реакциями растений на стресс, такими как окислительный взрыв и реакция сверхчувствительности (СВЧ). Антимикробные соединения, такие как бактериоцины, сидерофоры и липидопептидные биосурфактанты, особенно характерные для бактерий рода *Bacillus*, позволяют вытеснить и уничтожить патогенные микроорганизмы и формировать структуру микробиоты, также влияя на иммунитет хозяина.

Нами в геноме штамма *B. subtilis* 26Д был выявлен ген *sfp*, кодирующий сурфактин-синтетазу. После трансформации вектором pDG 1662, получен штамм бактерий *B. subtilis* 26Дsfp- с неактивным геном *sfp*. Растения картофеля инокулировали суспензией клеток эндофитного штамма *B. subtilis* 26Д за 7 дней до контакта с КЖ. Часть опытных и контрольных растений скармливали имаго и личинкам колорадского жука и оценивали процент их смертности. В тестах с выбором имаго рассаживались по 1 особи в чашки Петри с растением, содержащим эндофиты *B. subtilis* 26Д, и со стерильным растением, интенсивность питания оценивали визуально, по количеству съеденных листьев. Интенсивность окислительного взрыва оценивали после повреждения КЖ в течение 3-5 минут.

Бактерии штамма *B. subtilis* 26Д вызывали наиболее раннее и интенсивное увеличение содержания перекиси в поврежденных растениях, в отличие от полученного на его основе рекомбинантного штамма, не продуцирующего сурфактин. Кроме того, обработка растений *B. subtilis* 26Д способствовала активации ингибиторов протеиназ картофеля после контакта с вредителем, что является важным фактором защиты растений от фитофагов. Отсутствие экспрессии гена сурфактин-синтетазы приводила только к небольшому подъему этого параметра. В тестах с выбором из растения, обработанного штаммом *B. subtilis* 26Д и растением, обработанным водой, преобладающее большинство жуков предпочитало питаться последними. В случае *B. subtilis* 26Дsfp- частота выбора жуком инокулированных растений была выше, и они повреждались больше, чем растения, обработанные штаммом *B. subtilis* 26Д. В тестах без выбора смертность личинок при питании растениями, обработанными водой, составляла $4.3 \pm 0.4\%$ через 14 дней после кормления, и $55.9 \pm 4.7\%$ после питания растениями, обработанными *B. subtilis* 26Д. Питание растениями, обработанными рекомбинантным штаммом, приводило к гибели $11.1 \pm 3.2\%$ особей.

Следует отметить, что клеток не продуцирующего сурфактин штамма *B. subtilis* 26Дsfp- во внутренних тканях растений содержалось в 2 раза меньше, чем клеток бактерии *B. subtilis* 26Д (1.57 ± 0.03 и 3.5 ± 0.05 , соответственно). Таким образом, дефицит сурфактина приводил к нарушению колонизации растений эндофитным штаммом, вследствие чего, вероятно, снижалась антифидантная активность исходного штамма

Работа выполнена в рамках Госзадания № 116020350027-7 (2016-2018) и при финансовой поддержке РФФИ 17-29-08014 офи_м.

**Роль ферментов АОС при альтернативном пути утилизации сахарозы
у *Pinus sylvestris* L. с косослойной древесиной**

**Никерова К.М., Галибина Н.А., Синькевич С.М., Софронова И.Н.,
Бородина М.Н., Мощенская Ю.Л., Новицкая Л.Л.**

Институт леса — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук»,
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия.
knikerova@yandex.ru

Косослойная древесина у хвойных и, в частности, у растений рода *Pinus* характеризуется наклоном веретенообразных клеток, который может достигать до 90 градусов по отношению к оси ствола (Hartig, 1895; Kubler, 1991; Haggis, 2012). Быстрое изменение наклона и расположения клеток вдоль оси ствола часто связано с укорочением веретенообразных клеток, что объясняется преобладанием косых антиклинальных делений над интенсивностью интрузивного роста (Jones, 1963; Kubler, 1991). Во время периода активного камбиального роста эти деления очень часты, затем их интенсивность снижается (Philipson et al., 1972; Larson, 2012). Среди причин возникновения косослойной древесины ученые называют действие генетических факторов, так как косослой встречается только у определенных пород деревьев и наследуется в потомстве. Считается, что большинство хвойных древесных растений сначала развивают левую спираль, которая затем к 10-30 годам изменяется на правую и остается таковой до конца жизни (Mayer-Wegelin, 1956; Vité, Rudinsky, 1959; Northcott, 1965; Kozłowski et al., 1967). Косослойная древесина имеет функциональное значение для растений. Гипотетически она может оказывать влияние на поставку воды и минеральных веществ от корней к кроне и, напротив, влиять на равномерность оттока ассимилятов от кроны к тканям ствола (Kubler, 1991; Kozłowski, Pallardy, 1996). Еще в ранних работах упоминалось, что возникновение косослойной древесины инициируется потоками фотоассимилятов в соответствующем направлении (Harris, 1967). Ранее было показано, что наличие другого вида камбиальных структурных изменений – узорчатой древесины у карельской березы – биохимически отражается в преимущественной утилизации сахарозы за счет высокой активности апопластной инвертазы (АпИInv) (Галибина и др., 2015, 2016, 2018, 2019), а также может быть диагностировано повышением активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), пероксидазы (ПО) и полифенолоксидазы (ПФО) (Никерова и др., 2016, 2017, 2018, 2019) по сравнению с растениями без признаков структурных аномалий.

Исследовали 150-300-летние деревья сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. с прямослойной древесиной и с проявившимся косослоем, выраженным в разной степени (5-20 градусов наклона), которые произрастали в лесничествах на территории Республики Карелия. Образцы были отобраны в период активного камбиального роста. У деревьев сосны обыкновенной в тканях ствола определяли активность сахарозосинтазы (СС), АпИInv, СОД, КАТ, ПО и ПФО. Также со ствола деревьев сосны обыкновенной на высоте ~ 1.3 м от земли были взяты керны для определения среднего значения радиального прироста за десятилетний период за счет измерения ширины годичных колец. Исследование показало, что в ксилеме в период активного роста косослойная древесина биохимически характеризуется увеличением активностей КАТ, ПО, ПФО, во флоэме – ПФО. Можно предположить, что у деревьев без признаков аномалий интенсивнее протекали ростовые процессы, а у косослойных растений преобладали процессы вторичного метаболизма. Так, у растений с признаками косослоя в ксилеме ниже активность СС, по сравнению с таковой у растений с прямослойной древесиной, что говорит об уменьшении роли СС в утилизации сахарозы. При этом, у косослойных растений наблюдается более высокая метаболизация сахарозы в апопласте, активность АпИInv более, чем в 2 раза выше, по сравнению с прямослойными растениями. Кроме того, прямослойные деревья имели среднюю ширину годичного кольца больше, чем деревья с выраженным косослоем, что говорит о большем приросте.

Отметим, что переключение на более интенсивный ПО-путь может контролироваться активностью АпИInv после включения образующихся гексоз в реакции цикла Кребса и ПФЦ с последующим образованием АФК и фенольных соединений. Вероятно, в этом случае перекись водорода может быть сигнальной молекулой, которая обеспечивает взаимосвязь ферментов АОС и АпИInv, в том числе, через уровень экспрессии *PR*-генов (Vi et al., 1995; Pellinen et al., 2002), кодирующих, среди прочего, и ПО (Kinkema et al., 2000; Van Loon et al., 2006; Almagro et al., 2009). Высокая активность ПФО может быть связана, с накоплением АФК (Thipyarong et al., 2004; Mayer, 2006) и изменением окислительно-восстановительного статуса (Webb et al., 2014), а, с другой стороны, с увеличением субстратов фенольной природы (Constabel et al., 1996; Guyot et al., 1996; Shin et al. 1997; Jimenez, Garcia-Carmona, 1999; Li, Steffens, 2002; Melo et al., 2006; Wuys et al., 2006). Накопление этих компонентов обычно наблюдается при формировании ядровой древесины, которая активно формируется у сосны обыкновенной. Кроме того, некоторые из этих соединений являются предшественниками лигнина (Humphreys, Chapple, 2002). Изучение причин формирования косослойной древесины важно с практической точки зрения. Наличие косослоя изменяет свойства древесины: значительно ухудшается ее качество, затрудняется обработка. Чем больше волокна отклоняются от продольного направления, тем меньшую прочность будет иметь древесина. Появления угла даже в 10 градусов может сделать древесину совершенно непригодной для дальнейшего использования (Pope et al., 2005).

Роль фуллеренола C₆₀ в повышении устойчивости растений огурца к дефициту цинка и марганца

Панова Г.Г. , Удалова О.Р.* , Хомяков Ю.В.* , Вертебный В.Е.* , Аникина Л.М.* , Журавлева А.С.* , Семенов К.Н.** , Подольский Н.Е.** , Якконен К.Л.*** , Битюцкий Н.П.****

* ФГБНУ «Агрофизический научно-исследовательский институт». Гражданский пр., 14, Санкт-Петербург, Россия.

** ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова». ул. Льва Толстого, д. 6-8, Санкт-Петербург, Россия.

*** ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет». Университетская наб., д. 7/9. Россия.
gaiane@inbox.ru

Цинк (Zn) и марганец (Mn) относятся к группе необходимых для роста и развития растений микроэлементов. В связи с низкой подвижностью соединений цинка и марганца в почвах (особенно карбонатных и известкованных) разработка новых подходов к оптимизации питания растений этими микроэлементами является актуальной задачей. На ее решение направлены усилия многих исследовательских лабораторий мира. В этом отношении перспективно применение различных наноматериалов, в частности, водорастворимых производных легких фуллеренов C₆₀. Молекулы этого вещества обладают высокой химической активностью, благодаря которой фуллерены могут присоединять различные радикалы, проявлять антиоксидантную активность, проникать через клеточные мембраны и модулировать транспорт ионов. Однако к настоящему времени роль фуллеренов в регуляции питания растений микроэлементами и устойчивости растений к дефициту микроэлементов практически не изучена. В связи с этим цель настоящей работы состояла в изучении роли некорневой обработки растворами фуллеренола C₆₀ в повышении устойчивости растений к дефициту цинка и марганца.

Экспериментальная работа проведена в регулируемых условиях интенсивной светокультуры на базе Агрофизического научно-исследовательского института. Растения огурца гибрида F₁ Нева выращивали в сосудах с аэрируемым питательным раствором Гельригеля. Условия дефицита цинка и марганца создавали путем исключения этих микроэлементов из состава питательного раствора. Опрыскивание растений осуществляли следующими растворами: дистиллированная вода, сульфат марганца или цинка в концентрации 1 ммоль/л, фуллеренол в концентрациях 1 мг/л (Ф1) или 2 мг/л (Ф2), комплексы Ф1 и Ф2 с сульфатом марганца или цинка в указанных выше концентрациях. Растения опрыскивали дважды в течение вегетации: в фазе второго и четвертого листа. Длина светового периода – 14 час/сут, облученность растений 85-90 Вт/м² в области ФАР. Температуру воздуха поддерживали в пределах 22-24 °С днем и 18-20°С ночью; влажность воздуха – 70-80%. Смену растворов в сосудах осуществляли через каждые трое суток. Эксперименты повторены дважды. Реакцию растений на экспериментальные воздействия оценивали на второй и седьмой день после каждого опрыскивания. Контролируемые параметры в листьях: площадь ассимилирующей поверхности, концентрация пигментов (хлорофилла, каротиноидов), железа, цинка и марганца, интенсивность перекисного окисления липидов, активность пероксидазы и каталазы. Кроме того, измеряли сухую массу побегов и корней растений

В ходе проведенных исследований выявлена способность фуллеренола C₆₀ посредством некорневых подкормок активно влиять на доступность растениям и аккумуляцию в них марганца и цинка, восстанавливать площадь листовой ассимилирующей поверхности и содержание пигментов хлорофиллов в листьях следующих ярусов после обработанных, стабилизировать окислительные процессы в листьях, что в итоге положительным образом отразилось на формировании сухой массы растений, особенно побегов в условиях дефицита марганца или цинка в питательном растворе. Выявлено, что степень проявления реакции, направленность и развитие процессов при дефиците марганца зависит от концентрации растворов фуллеренола C₆₀ и времени после обработки ими растений. Так, моно- и смешанные с сульфатом марганца растворы фуллеренола C₆₀ в концентрации 2 мг/л оказывают более выраженное положительное влияние на физиологическое состояние растений в условиях дефицита марганца. При дефиците цинка различий во влиянии фуллеренола в двух испытываемых концентрациях на растения практически не наблюдались. Вероятный механизм действия фуллеренола при некорневых подкормках растений микроэлементами может быть связан со способностью этой наноструктуры повышать проницаемость покровов листьев (кутикулы, плазмалеммы) и тем самым облегчать поступление микроэлементов из нанесенных на поверхность листьев рабочих растворов. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности продолжения исследований по изучению влияния фуллеренола C₆₀ на растения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-016-00003 А.

Ростовые процессы и формирование продуктивности новых раннеспелых и среднеранних гибридов кукурузы (*Zea mays* L.) при выращивании на зерно в агроклиматических условиях Калининградской области

Роньжина Е.С., Григорович Л.М., Тулунов А.Е.

Калининградский государственный технический университет. Советский проспект, 1, Калининград, Россия.
e.ronzhina39@mail.ru

Почвенно-климатические условия западной части Русской равнины, на которой расположена Калининградская область, не в полной мере соответствуют биоэкологическим требованиям такой важной сельскохозяйственной культуры как кукуруза. Недостаток ФАР, суммы эффективных температур и избыточное увлажнение почвы в критические периоды развития позволяют возделывать кукурузу в Калининградской области лишь на зеленую массу и силос с относительно невысокой урожайностью 13-18 т/га.

Недавно венгерская семеноводческая компания «ВУДСТОК» Кфт создала высокопродуктивные гибриды кукурузы, способные, по заявлению производителей, давать высокие урожаи зерна в недостаточно благоприятных условиях Калининградского региона. Эти гибриды уже внесены в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию в Российской Федерации по Северо-Западному региону. Однако остается неясным, благодаря каким физиологическим механизмам эти новым гибридам удастся противостоять ограничивающему действию экологических факторов. Выяснение этого вопроса и явилось целью настоящей работы.

Изучали гибриды разных групп спелости, отличающихся по числу ФАО: пять раннеспелых гибридов с числом ФАО от 150 до 199 и шесть среднеранних, имевших число ФАО от 200 до 299.

Сравнительная оценка зерновой продуктивности показала, что в условиях Калининградской области в рамках полевого опыта все изученные гибриды сформировали высокий урожай зерна. У раннеспелых гибридов его величина находилась в диапазоне 11,90-13,75 т/га в расчете на стандартную влажность зерна 22%. Однако этот показатель был ниже, чем в группе среднеранних гибридов, где он составил 13,23-16,15 т/га. Наиболее продуктивными оказались гибриды ИДА МГТ с числом ФАО 240 и Далма МГТ с числом ФАО 200, обеспечившие урожайность 16,15 и 15,56 т/га соответственно. При этом более крупное зерно сформировалось у гибрида ИДА МГТ (масса 1000 зерен 384,5 г). На день проведения уборки зерна его влажность у разных гибридов находилась в пределах 29,1-36,3%, что соответствует нормальной (но выше стандартной, требуемой для закладки на хранение).

Фенологические наблюдения за развитием растений в условиях полевого опыта показали, что все изученные гибриды достигали соответствующих фенофаз и стадий развития в оптимальные сроки и были способны сформировать урожай зерна до конца вегетационного периода. Разница по срокам у гибридов была незначительной и составляла два-три дня.

Высота стеблестоя достигала 235 (ГС 210) – 260 (ГС 240) см, что свидетельствовало об оптимальном росте и развитии гибридов. При этом у всех гибридов, представленных в испытаниях, устойчивость к полеганию (оценка которого была проведена по пятибалльной шкале по величине наклона главного стебля растения) была максимальной и составляла пять баллов (не полегающие растения).

Ассимиляционный потенциал был достаточно высок и незначительно отличался у гибридов разных сроков созревания.

Сделан вывод о том, что ассортимент современных гибридов кукурузы позволяет получать высокие урожаи зерна в агроклиматических условиях Калининградской области. При этом сельскохозяйственным предприятиям необходимо ориентироваться на гибриды разных групп спелости для снижения рисков, вызванных нестабильными погодными условиями региона.

НИиОКР выполнена в рамках государственного задания на выполнение государственных работ по теме: «Разработка предложений по совершенствованию сырьевой базы рыбного кормопроизводства в условиях природно-климатических и антропогенных изменений».

Салициловая кислота и метилжасмонат как индукторы устойчивости растений пшеницы к низкой положительной температуре

Игнатенко А.А., Таланова В.В., Репкина Н.С., Холопцева Е.С., Титов А.Ф.

Институт биологии – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».
Пушкинская ул., 11, Петрозаводск, Россия.
angelina911@ya.ru

Салициловая кислота (СК) и жасмонаты являются ключевыми сигнальными молекулами, участвующими в формировании устойчивости растений к патогенам и фитофагам. В последние годы активно обсуждается их возможное участие в реакции растений на действие абиотических факторов, включая низкую температуру. В связи с этим, цель работы заключалась в изучении влияния СК и метилжасмоната (МЖ) на устойчивость растений пшеницы, находящихся в условиях низкой положительной температуры, вызывающей закалывающий эффект.

Проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с. Московская 39 в течение 7 сут выращивали на питательном растворе, а затем на 1 сут помещали на раствор СК (100 мкМ) или МЖ (1 мкМ). После этого растения, находящиеся на СК или МЖ, в течение 7 сут подвергали действию температуры 4°C. О холодоустойчивости растений судили по температуре, вызывающей гибель 50% палисадных клеток листа после их 5-мин промораживания. Интенсивность фотосинтеза измеряли с помощью установки для исследования CO₂-газообмена. Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА), уровень пролина определяли с помощью нингидринового реактива, а активность антиоксидантных ферментов – спектрофотометрически. Накопление транскриптов генов изучали методом ПЦР в режиме реального времени.

Проведенные опыты показали, что обработка пшеницы СК или МЖ даже при обычной температуре (22°C) повышает ее холодоустойчивость. Помимо этого у обработанных СК или МЖ проростков обнаружено увеличение активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), гваякол-специфичной пероксидазы (ГПО) и содержания транскриптов кодирующих их генов *FeSOD*, *MnSOD* и *CAT*, соответственно. Уровень пролина и содержание мРНК генов *P5CS* и *P5CR*, кодирующих ферменты его синтеза, в листьях пшеницы под влиянием как СК, так и МЖ при оптимальных условиях также несколько возрастали.

Предобработка растений СК или МЖ вызывала дополнительный прирост холодоустойчивости по сравнению с вариантом, где растения находились при температуре 4°C без такой предобработки. Установлено также, что под влиянием этих соединений в условиях холодого воздействия в листьях растений поддерживалась более высокая интенсивность фотосинтеза. Наряду с этим, при действии температуры 4°C экзогенные СК или МЖ вызывали существенное увеличение активности СОД, КАТ и ГПО, а также усиливали экспрессию кодирующих их генов *FeSOD*, *MnSOD* и *CAT*, соответственно. При этом под влиянием МЖ в большей степени повышалась активность СОД и КАТ, а СК оказывала более сильное воздействие на активность ГПО. Помимо этого в низкотемпературных условиях МЖ и, в большей степени СК, вызывали увеличение уровня пролина и содержания мРНК генов *P5CS* и *P5CR*, кодирующих ферменты его синтеза – Δ^1 -пирролин-5-карбоксилат синтазу и Δ^1 -пирролин-5-карбоксилат редуктазу, соответственно. Активизация работы антиоксидантной системы (АОС) под влиянием СК или МЖ, в свою очередь, способствовала снижению уровня ПОЛ в листьях, о чем свидетельствовало меньшее накопление МДА в период холодого воздействия.

Таким образом, из полученных данных следует, что как СК, так и МЖ способны индуцировать повышение холодоустойчивости пшеницы через активизацию работы АОС. Увеличение активности антиоксидантных ферментов и уровня пролина в листьях под их влиянием приводит к снижению интенсивности процессов ПОЛ, способствуя сохранению целостности клеточных мембран, нормальному протеканию основных физиологических процессов, включая фотосинтез, а следовательно, создает благоприятные условия для формирования повышенной холодоустойчивости растений.

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук». Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (тема № 0218-2019-0074).

Самонесовместимость S-РНКазного типа у петунии *Petunia hybrida*

Захарова Е.В. *, Ковалева Л.В. **, Тимофеева Г.В. **

* Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии,
Тимирязевская ул., 42, Москва, Россия.

** Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
zakharova_ekater@mail.ru

Молекулярные механизмы самонесовместимости (СН) и программируемой клеточной смерти (ПКС), фундаментальных процессов в развитии и выживании растений, активно исследуются в настоящее время. СН – генетически детерминированный репродуктивный барьер, который во многих семействах покрытосеменных предотвращает самооплодотворение. У растений с СН Solanaceae-типа поведение пыльцы определяется ее собственным S-генотипом (пыльца признается “своей” и отторгается пестиком в случае, если ее гаплотип идентичен одному из двух S-гаплотипов пестика). В механизм СН Solanaceae-типа включены два гена на S-локусе: (1) ген *S-РНКазы*, контролирующей S-специфичность пестика и (2) ген *S-локус F-box (SLF)*, контролирующей S-специфичность пыльцы. Большая часть F-box белков является компонентами SCF (SKP1/Cullin1/F-box) комплекса, функционирующего как E3 убиквитин-лигаза в системе убиквитин-медируемой деградации белков 26S-протеасомой. Полагают, что белки SLF функционируют как модуль узнавания субстрата комплекса SCF, который инактивирует чужие S-РНКазы через убиквитин-26S-протеасомный путь. S-РНКаза пестика и белки SLF пыльцы взаимодействуют в цитоплазме ПТ. Для объяснения того, как взаимодействуют S-РНКазы и белки SLF, предложен ряд моделей. У *Petunia hybrida* L. “своя” пыльца отторгается в пестике РНКазой, а SLF белки совместно обезвреживают чужие S-РНКазы.

Наши исследования ответили на два актуальных вопроса и поставили новый. Визуализация пыльцевых трубок (ПТ) петунии, растущих *in vivo* в проводниковых тканях пестика, с помощью методов электронной и флуоресцентной микроскопии показала, что совместимые ПТ росли по тканям рыльца и столбика и через 30 ч достигали завязи, где происходило оплодотворение, в то время как рост несовместимых ПТ прекращался через 8-9 ч в тканях столбика вследствие функционирования механизма СН.

Во-первых, проведенное тестирование гипотезы об участии ПКС в механизме СН у петунии с использованием трех методов выявило наличие маркеров ПКС (включая фрагментацию ДНК) в несовместимых ПТ во время прохождения СН. Визуализацию места локализации ПКС в системе пыльца-столбик петунии проводили по TUNEL-методу (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling).

С использованием КИТа (APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit). Дополнительное окрашивание DAPI показало, что TUNEL-позитивный сигнал соответствует ядерной ДНК. Результаты впервые достоверно доказали, что ПКС является детерминантой механизма СН РНКазного типа.

Во-вторых, впервые установлено, что СН-индуцированная ПКС в несовместимых ПТ сопровождается повышенным уровнем каспазо-подобной активности. Определение каспазо-подобной активности проводили, используя АМС субстрат: Ac-DEVD-АМС (Ac-Asp-Glu-Val Asp-АМС [АМС=7-амино-4-метилкумарин]) (EMD Biosciences, San Diego, CA; BIOMOL, Plymouth Meeting, PA). Таким образом, получены первые данные об участии каспазо-подобных протеаз в ПКС при функционировании механизма СН РНКазного типа.

В-третьих, впервые установлен факт участия фитогормона этилена в механизме СН РНКазного типа. Предварительная обработка рылец СН клона АОА (ингибитор синтеза предшественника этилена АЦК) стимулировала рост несовместимых ПТ, которые достигали завязи. При этом наблюдали почти полное отсутствие фрагментации ДНК. Результаты свидетельствуют в пользу гипотезы, что этилен контролирует прохождение ПКС на уровне деградации ДНК в несовместимых ПТ в ходе функционирования механизма СН РНКазного типа.

Работа выполнялась при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ №17-04-00153).

Синтетические металлоорганические комплексы ингибируют фотохимическую активность фотосистемы 2 и активность карбоангидразы и глутатионредуктазы хлоропластов

*Родионова М.В.**, *Халилова Л.*** , *Жармухамедов С.К.**** , *Караджан М.***** , *Караджан Н.***** ,
*Креславский В.Д.**** , *Алвасел С.****** , *Аллахвердиев С.И.**

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

** Институт молекулярной биологии и биотехнологии, НАН Азербайджана, Баку, Азербайджан

*** Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушкино, Россия

**** Университет Гази, Анкара, Турция

***** Колледж науки, Университет короля Сауда, Эр-Рияд, Саудовская Аравия

rodionovamv5@gmail.com

Различные ингибиторы могут применяться для исследования функций ферментов, а также использоваться в дальнейшей разработке средств защиты культурных растений.

Синтетические комплексы сурьмы (III) были изучены в качестве веществ, способных подавлять ключевые реакции в растениях. Эти соединения исследовались на предмет ингибирующего воздействия на фотосинтетический перенос электронов и карбоангидразную активность фотосистемы 2 (ФС-2). Кроме того, изучалось их влияние на глутатионредуктазу хлоропластов.

Обнаружено, что шесть ингибиторов оказывают различное действие на активность исследованных ферментов. В эффективных комплексах атомы сурьмы координированы ионами хлора или брома. По-видимому, эти соединения способны вытеснять ионы хлора из сайтов их связывания на донорной стороне ФС-2 вблизи Mn_4CaO_5 -кластера и, таким образом, нарушают структуру водоокисляющего комплекса, а также перенос электронов на донорной стороне ФС-2. При этом, добавление комплексов сурьмы (III) приводило только к уменьшению амплитуды F_M , но не изменяло начальное значение флуоресценции. Это может свидетельствовать о необратимом влиянии данных комплексов на ФС-2, не влияя на перенос энергии в активный центр фотосистемы и на первичное разделение зарядов в активном центре.

Предполагается, что природа лиганда комплекса не так важна для эффективного ингибирования α -карбоангидразы. Возможно, эти вещества подавляют активность α -карбоангидразы, связываясь с ионом Zn^{2+} в активном центре фермента, блокируя обмен H^+ или OH^- . Однако размер комплекса также имеет значение.

Предполагается, что комплексы сурьмы (III) могут нарушать GSSG-связывающий сайт глутатионредуктазы, при этом сайт связывания НАДФН остается активным. Данный эффект также зависит от структуры и размера комплекса.

Работа была поддержана Российским научным фондом (грант 19-14-00118). С. Алвасел благодарит Программу стипендиования выдающихся ученых Университета короля Сауда, Саудовская Аравия (Distinguished Scientists Fellowship Program, King Saud University, Saudi Arabia) за финансовую поддержку.

Системы цифрового фенотипирования высших растений *in vivo* и *in vitro* на основе сверточных нейронных сетей

Бондаренко В.Ю., Шашко А.Ю., Светлаков В.И., Колбанов Д.В., Колесников О.В.,
Пржевальская Д.А., Черныш М.А., Демидчик В.В.

Белорусский государственный университет. Пр. Независимости, 4, Минск, Республика Беларусь.
dzemidchuk@bsu.by

Феномика – новый раздел биологии, посвященный глубокому анализу свойств фенотипа и изучающий закономерности его формирования в онтогенезе и модификации под действием внешних факторов с использованием цифровых подходов. Феномика представляет собой омиксную дисциплину, сводящую информацию об анатомо-морфологических характеристиках и физиологических процессах к численно-анализируемому цифровому формату, схожему с массивами информации в геномике. На данном этапе развития феномики крайне важно развитие новых недорогих платформ фенотипирования, т.е. аппаратно-программных комплексов, позволяющих регистрировать и анализировать информацию о фенотипе (фенотипировать растительные системы). Целью данной работы являлись разработка и апробация сверточных нейронных сетей для высокоточного определения таксономических и сортовых характеристик декоративных растений, их физиологического состояния в условиях открытого грунта и *in vitro*, а также определения степени укоренения *in vitro* микроклонов. Для реализации моделей нейронных сетей был использован язык программирования Python3, фреймворк TensorFlow и ряд специализированных библиотек для визуализации результатов (Pandas, Matplotlib и др.). Был разработан ряд оригинальных систем получения и предварительной обработки изображений, а также последующего формирования баз данных, необходимых для высокоэффективного обучения нейронных сетей. Всего было создано 4 группы платформ фенотипирования на основе нейронных сетей, отличающихся по техническим подходам, объекту и задачам. В первую группу входила платформа фенотипирования и соответствующие нейронные сети, анализирующие сортовидовую принадлежность декоративных растений. Для их разработки были созданы базы данных изображений растений, полученных в условиях адаптационных парников, открытого грунта и стерильных культур. Для обучения нейронных сетей было получено более 70000 изображений растений следующих родов: *Heuchera* sp., *Hydrangea* sp., *Potentilla* sp., *Hosta* sp., *Berberis* sp., *Betula* sp., *Cornus* sp., *Salix* sp., *Rubus* sp., *Physocarpus* sp., *Syringa* sp., *Spiraea* sp., *Forsythia* sp., *Philadelphus* sp., *Picea* sp., *Juniperus* sp., *Thuja* sp.. База данных была построена из 25 различных классов, каждый из которых соответствовал отдельному виду или сорту растения. Это позволило разработать сверточные нейронные сети (на основе модели InceptionV3) с точностью определения до 93% для открытого грунта и 92% для *in vitro* культур. Созданная феномная система и нейронные сети показали высокий уровень точности при сортовидовой верификацию декоративных растений, что может иметь практический выход в виде альтернативы более дорогостоящим генетическим анализам. Вторая из созданных платформ была направлена на определение уровня стрессированности (физиологической жизнеспособности) растений (широкая группа видов – от декоративных растений до основных сельскохозяйственных злаковых культур) с использованием нейронных сетей. Для этого была разработана специальная система полуавтоматической аннотации физиологического состояния растений, где каждому растению выставлялась отметка в диапазоне от 0 до 100, где 0 – мертвое растение, 100 – полностью живое без повреждений растение. Платформа также включала модуль нейронной сети для определения степени поражения специфическими патогенами, такими как септория, фитофтора, парша, ржавчина, черная гниль и др.. База данных физиологических состояний растений составила более 20000 изображений, база данных заболеваний насчитывала 45000 изображений. Точность определения нейронной сети была доведена до 86%, что является высоким показателем по сравнению с аналогичными зарубежными системами. Третий тип платформ был направлен на анализ растений в условиях *in vitro* (внутри стерильных культивационных сосудов). В данном разделе исследований пока отсутствуют опубликованные данные других групп. Также преодолевался ряд трудностей, связанных с искажением формы и цвета растений прозрачными стенками сосудов. В качестве параметра для анализа было выбрано развитие корневой системы. На данный момент на основе 15000 изображений создана нейронная сеть, которая с высокой точностью (95%) оценивает стадию корнеобразования *in vitro* (отсутствие корней; начальная стадия корнеобразования; стадия корнеобразования, оптимальная для перевода в нестерильные условия; поздняя стадия корнеобразования, непригодная для перевода в нестерильные условия). Четвертая из развитых феномных платформ предназначена для анализа роста корня модельных высших растений (*Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum*, *Pisum sativum* и др.) в вертикальных культивационных системах *in vitro* (чашки Петри) и *in vivo* (водные культуры). Разработанные системы позволили проводить автоматический анализ скорости роста корневой системы генетически отличных растений (природных экотипов, нокаутов по определенным генам и др.) в ответ на регуляторы роста, стрессоры и другие воздействия. Была продемонстрирована возможность использования разработанной феномной платформы для проведения массового скрининга как на поиск генов, определяющих ростовые ответы, так и на поиск новых биорегуляторов.

Современные образовательные технологии и их реализация как средство повышения качества подготовки бакалавров в курсе «Физиология и биохимия растений»

Ларикова Ю.С., Скороходова А.Н.

Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева. Тимирязевская улица, 49, Москва, Россия.
yu.larikova@mail.ru

Современное общество ставит перед выпускниками сельскохозяйственных ВУЗов достаточно сложную задачу – быстро адаптироваться к меняющимся ситуациям в жизни, где необходимо непрерывно самообучаться и самообразовываться и успешно применять их на практике. Необходимо помнить, что научный рынок труда крайне нуждается в квалифицированных специалистах. На кафедре физиологии растений РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева данные принципы выражаются в использовании проблемных и проектных технологиях, практические задачи перерастают в исследовательские работы. С первых занятий студенты включаются в проблемное исследовательское обучение. В процессе обучения возникает необходимость обсуждать новые исследования, понятия и термины, естественнонаучные открытия, отсутствующие в учебных и учебно-методических пособиях, но без которых совершенно невозможно понять современное развитие биологии. На лабораторных и семинарских занятиях преподаватель ставит проблему, даёт алгоритм задачи, а выход решения студент находит сам: учится чётко и ясно излагать материал, рассуждать логически, анализируя и сравнивая полученные результаты. Хотя на протяжении последних нескольких лет наблюдается проблемная ситуация, когда студент затрудняется передать содержание материала, по всей видимости, это издержки обучения в школе, где информационный материал повторяется в виде тестов. Безусловно, данное обстоятельство не может не отразиться на качестве излагаемого материала нынешнего студента. Преподавателю на занятиях необходимо чётко формулировать цели и задачи проводимой работы и доходчиво разбирать все её этапы. Одним из главных моментов на лабораторных занятиях - освоение методики исследования – а это фундамент физиологии и биохимии растений; изучается ход физиологических процессов в различных условиях внешней среды. В ходе обсуждения важно рассматривать возможность применения физиологии и биохимии растений в решении практических задач в области агрономии, защищённого грунта. Заключительный этап предмета «Физиология и биохимия растений» направлен на изучение комплексных сведений и приёмов регулирования хода физиологических процессов и биохимических реакций в процессе роста, развития сельскохозяйственных культур и формирования урожая с высокими показателями качества, функционирования в условиях загрязнения среды. Студенты в процессе обучения курсу «Физиология и биохимии растений» приобретают навыки сбора необходимой современной информации, выдвигают гипотезы, делают выводы и заключения. Все эти моменты обеспечивают готовность студентов к самостоятельной научной работе.

Создание биолюминесцентных растений

Митюшкина Т.Ю., Долгов С.В., Ямпольский И.В., Саркисян К.С.

Институт биоорганической химии им. акад. Шемякина М.М. и Овчинникова Ю.А. РАН,
ул.Миклухо-Маклая 16/10, Москва, Россия.
tatiana@planta.bio

Биолюминесценция – это способность живых организмов светиться за счет собственных биохимических процессов. В природе существует множество различных биолюминесцентных систем, которые независимо развивались у бактерий, членистоногих, грибов, но светящихся растений в природе не существует.

Попытки создать такие растения осуществлялись, начиная с 1980ых. Используя систему люциферин-люцифераза, в растения переносили ген люциферазы светлячка. Растения в этом случае светились только после обработки люциферин-люциферазой и зарегистрировать свечение можно было только с помощью специальной имиджинговой системы в течении непродолжительного времени. Эта система нашла применение в экспериментальных работах по изучению экспрессии генов и метаболизма растений. Позже, в 2010 году, группа исследователей под руководством проф. Цитовского создала автономно светящиеся растения, перенеся в пластиды табака шесть генов lux-оперона фотобактерий. Полученные растения имели сравнительно слабое свечение, но все же его можно было зафиксировать с помощью фотоаппарата на длительной выдержке.

В 2018 году нашей научной группой был описан ферментативный каскад биосинтеза люциферина из кофейной кислоты в грибе *Neonotopanus nimbi*. Всего четыре фермента принимают участие в этом процессе: кофейная кислота превращается в гиспидин с помощью гиспидинсинтазы (HispS), затем гиспидин окисляется гиспидин-3-гидроксилазой (H3H) с образованием люциферина грибов. Люцифераза грибов (Luz) с помощью молекулярного кислорода формирует высокоэффективное промежуточное соединение — эндопероксид, который испускает свет, распадаясь до оксилуциферина (каффеилпирувата). Оксилуциферин затем разлагается до кофейной кислоты с помощью каффеилпируватгидролазы (CPH).

В растениях кофейная кислота является одним из основных метаболитов, необходимых для биосинтеза лигнина, пигментов, летучих соединений. Именно этот факт позволил предположить, что гетерологическая экспрессия генов биосинтеза грибов может привести к созданию автономно светящегося растения.

Для проверки этого предположения мы создали генетическую конструкцию, несущую гены биосинтеза люциферина под конститутивным промотором 35S вируса мозаики цветной капусты. Кодированные последовательности были оптимизированы для экспрессии в растениях рода *Nicotiana*. Методом агробактериальной трансформации было получено 15 трансгенных линий *N.tabacum* и 5 трансгенных линий *N.benthamiana*.

Полученные линии испускали свет на протяжении всего жизненного цикла. Трансгенные линии, а также ткани растений отличались по уровню свечения. Растения демонстрировали изменение свечения на различных этапах жизненного цикла и в ответ на внешние воздействия (поранение, обработка метилжасмонатом). Также, несмотря на то, что все гены находились под контролем конститутивного промотора, мы наблюдали суточные циклы изменения светимости, что, вероятно, связано с уровнем метаболитов, являющихся субстратом в цикле биосинтеза люциферина.

Полученная нами, а также коллегами из лаборатории Дениела Войтеса в Университете Миннесоты, предварительные эксперименты показали, что грибная люминесцентная система может работать в растениях как репортерная система, позволяя наблюдать изменения динамики метаболизма в реальном времени. Такая система не требует дорогостоящего оборудования, позволяя фиксировать изменение свечения с помощью фотоаппарата или даже камеры смартфона.

Солнечные ячейки на основе тилакоидных мембран: эффект осмолитов.

Волошин Р.А.^{*}, Жармухамедов С.К.^{**}, Аллавердиев С.И.^{**}

^{*} Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.

^{**} Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Московская обл., Россия.
voloshinr@ifr.moscow

В настоящее время работа многих ученых связана с исследованием и разработкой альтернативных способов получения энергии. Это связано с экологическими проблемами, которые являются результатом использования традиционных источников энергии. Разработка и изучение гибридных преобразователей солнечной энергии на основе биологических пигмент-белковых комплексов – перспективное направление альтернативной солнечной энергетики. Фотосинтетический аппарат является эффективным и экологически чистым преобразователем солнечной энергии в энергию химических связей. Отдельные компоненты фотосинтетического аппарата могут использоваться в гибридных системах для генерации фототока. При конструировании биогридных солнечных ячеек требуется прежде всего создать биогридный фотоэлектрод, в котором выделенные компоненты фотосинтетического аппарата иммобилизованы на проводящей подложке. Основная проблема на пути построения такого фотоэлектрода – низкая стабильность и потеря активности фотосистем, изолированных из живого организма.

В нашей лаборатории были сконструированы биогридные солнечные ячейки на основе мезоскопического диоксида титана, сенсibilизированного тилакоидными мембранами. Данные ячейки способны генерировать ток при облучении видимым светом. Однако проблема данных ячеек в их очень низкой эффективности и коротком сроке службы. Одной из причин этого является высокая чувствительность компонентов фотосинтетического аппарата к агрессивным факторам внешней среды. Особенно быстро тилакоидные мембраны теряют функциональную активность при воздействии высоких температур и интенсивного света. Время жизни этих мембран и их термоустойчивость может быть увеличена за счет использования совместных осмолитов: глицин-бетаина, сахарозы и трегалозы. Ранее было показано, что эти соединения повышают активность кислород выделяющего комплекса изолированной ФС2 и позволяют снизить повреждения, наносимые в процессе обработки высокими температурами.

В данной работе продемонстрировано влияние осмолитов на активность ФС2 и ФС1 в изолированных тилакоидных мембранах при высоких температурах (до 50°C). Так же проведена аналогия между активностью первичных фотосинтетических процессов в этих мембранах и активностью солнечных ячеек на основе диоксида титана, сенсibilизированного этими мембранами. Показано, что в присутствии осмолитов повышается интенсивность фотосинтетических процессов в мембранах и эффективность солнечных ячеек на основе тилакоидных мембран.

Работа поддержана грантом РФФИ №19-14-00118.

Сортовые особенности активности ферментов антиоксидантной системы в листьях *Rosa × hybrida hort.*

Клемешова К.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур». Яна Фабрициуса ул., 2/28, Сочи, Россия.
klemeshova_kv@mail.ru

Сортовые особенности активности антиоксидантных ферментов будут использованы в диагностики физиологического состояния растений *Rosa × hybrida hort.* на ранних этапах интродукции, с целью выделить сорта, наиболее устойчивые к абиотическим и биотическим стрессорам влажных субтропиков России. Активность антиоксидантных ферментов изучалась в течение вегетационного периода (с III декады мая по I декаду октября), в сортовом разрезе. В исследованиях участвовали сорта *Rosa × hybrida hort.* из функциональных групп многоцветковые и почвопокровные розы, отличающиеся степенью устойчивости к основным грибным патогенам культуры в регионе (*Diplocarpon rosae* F.A. Wolf, *Podosphaera pannosa* (Wallr.) de Bary, *Botrytis cinerea* Pers., *Phragmidium mucronatum* (Pers.) Schltdl.). Сорта из функциональной группы многоцветковые розы – 'Centenaire de Lourdes' (контроль) и 'Eulalia Berridge' устойчивые, 'Crimson Meilandecor' среднеустойчивый, 'La Sevilana' неустойчивый; из функциональной группы почвопокровные – 'Hello' (контроль) и 'Heideschnee' устойчивые, 'Magic Meilandecor' среднеустойчивый, 'Rosy Cushion' неустойчивый сорт. Листья многоцветковых и почвопокровных роз характеризуются достаточно высокими значениями активности фермента каталазы ($186,1 \pm 7,4$ млО₂/г·мин) на протяжении всего вегетационного периода. Отличия по сортам в обеих группах несущественные (как внутри группы, так и при сравнении групп между собой, $V = 10,2$ %). Средний показатель каталазы у многоцветковых роз – $186,9 \pm 7,4$ млО₂/г·мин, у почвопокровных немногим ниже – $185,4 \pm 7,5$ млО₂/г·мин. В обеих группах минимальные значения характерны для сортов неустойчивых, в большей степени подверженных негативному воздействию фитопатогенной микрофлоры в условиях влажного субтропического климата сочинского Причерноморья, 'La Sevilana' $170,1 \pm 2,6$ млО₂/г·мин и 'Rosy Cushion' $169,9 \pm 3,7$ млО₂/г·мин. Максимальными значениями характеризуются сорта устойчивые, среди многоцветковых роз 'Centenaire de Lourdes' $194,5 \pm 22,1$ млО₂/г·мин, почвопокровных – 'Heideschnee' $192,7 \pm 22,7$ млО₂/г·мин. В зависимости от погодных условий менялась активность каталазы. В период исследований температура воздуха в активную вегетацию варьировала от $+23,8$ (май) до $+30,2$ °С (август) с последующим понижением к началу октября до $+19,6$ °С; относительная влажность воздуха в среднем держалась на уровне $71,4 \pm 8,0$ %, с минимальными значениями в августе ($62,0$ %) и максимальными в июне ($84,0$ %); освещенность составляла 16200–46640 Лк. Ежегодно в летние месяцы (преимущественно июль–август) наступает засушливый период с отсутствием атмосферных осадков до 1–2 месяцев, что позволяет на фоне повышенной температуры и низкой относительной влажности воздуха проводить исследования по влиянию погодных условий на ферментативную активность садовых роз. В благоприятный по гидротермическим условиям период (конец мая – начало июня) отмечена отрицательная зависимость между активностью каталазы и относительной влажностью воздуха ($r = -0,79$), и между активностью фермента и освещенностью ($r = -0,58$), что подтверждается ранее проведенными исследованиями на других сортах культуры в регионе. Одновременно с активностью фермента каталазы определяли активность гваяколпероксидазы. Значения активности фермента сильно варьировали по сортам ($V = 56,7$ %), существенные различия отмечались преимущественно в группе многоцветковых роз. В листьях сортов данной функциональной группы от $0,643 \pm 0,048$ до $1,919 \pm 0,195$ усл. ед./г·с, соответственно, у 'Eulalia Berridge' и 'Centenaire de Lourdes', устойчивых к биотическим стрессорам. У почвопокровных роз значения варьировали от $0,229 \pm 0,046$ усл. ед./г·с у среднеустойчивого 'Magic Meilandecor' (причём низкие показатели отмечаются в течение всего вегетационного сезона) до $0,970 \pm 0,089$ усл. ед./г·с у устойчивого 'Heideschnee'. Стоит отметить, что в листьях почвопокровных сортов не только наблюдается низкая активность гваяколпероксидазы, но и периоды, когда активность не фиксируется у всех сортов (III декада июля – I декада августа), или у некоторых из них (июнь, сентябрь). Причём низкой активностью фермента характеризуются розы, имеющие схожий с почвопокровными сортами характер роста (шпалерный тип роста, когда длинные плети располагаются в плоскости земли), например, 'Eulalia Berridge'. Отмечена обратная пропорциональная связь между активностью гваяколпероксидазы в листьях *Rosa × hybrida* и температурой воздуха ($r = -0,51$), что также подтверждает исследования прошлых лет (по функциональным группам кустовых и крупноцветковых роз $r = -0,63$). В целом по активности антиоксидантных ферментов установлено, что в начале вегетации в благоприятный по гидротермическим условиям период наблюдается средняя активность гваяколпероксидазы, с повышением её до максимальных значений к концу июня, затем отмечается резкое снижение показателя к середине сезона (с минимумом в августе), а в сентябре – начале октября при сокращении стрессовой нагрузки возвращение к средним значениям. Наибольшая активность фермента каталазы фиксируется с повышением температур в самом начале установления неблагоприятных погодных условий на побережье (июль), затем резко снижается до минимальных значений в августе, в остальные периоды держится на среднем уровне.

Состояние антиоксидантной системы проростков тритикале как маркер морозоустойчивости

Горелова Е.И. *, Колупаев Ю.Е. **

* Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, п/о Докучаевское-2, Харьков, Украина.

** Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина.
plant_biology.ukr.net

В настоящее время тритикале (*× Triticosecale* Wittm.) используется не только как ценная продовольственная культура, но и как источник биотоплива (McGoverin et al., 2011). Этот межродовой гибрид сочетает в себе высокую урожайность пшеницы и высокую морозоустойчивость ржи. Тем не менее, многие сорта этой культуры весьма чувствительны к действию отрицательных температур (Tshewang et al., 2017). В связи с этим изучение особенностей приспособления тритикале к гипотермии и поиск критериев для скрининга устойчивых генотипов являются актуальными.

В условиях гипотермии повышается вероятность акцептирования электронов от переносчиков электрон-транспортной цепи молекулярным кислородом с образованием активных форм кислорода (АФК). В связи с этим для выживания растений важное значение имеет функционирование антиоксидантной системы (АОС), которая предотвращает вторичные окислительные повреждения (Foyer, Noctor 2009; Нарайкина и др., 2014).

Однако функционирование АОС тритикале в связи с морозоустойчивостью изучено недостаточно. В ряде работ показано повышение активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, неспецифической пероксидазы и аскорбатпероксидазы при холодовой адаптации (Golebiowska, 2011; Szechynska-Hebda et al., 2015; Gawronska, Golebiowska-Pikania, 2016). В то же время детальное изучение изменений состояния АОС при адаптации к гипотермии разных генотипов тритикале до сих пор не проводилось.

Целью работы было изучение возможной связи между содержанием низкомолекулярных протекторов с антиоксидантными свойствами, активностью ключевых антиоксидантных ферментов, резистентностью к окислительному стрессу и морозоустойчивостью сортов тритикале.

Для исследований использовали сорта тритикале селекции Института растениеводства им. В.Я. Юрьева (Украина), различающиеся по морозоустойчивости: Букет и Раритет (озимые высокоморозоустойчивые) и Александра и Пидзымок харьковский (так называемые «двуручки» – слабо устойчивые). Холодовое закаливание 3-суточных этиолированных проростков проводили в холодильной камере при температуре 2–4°C (без освещения) в течение 6 суток. После закаливания проростки подвергали промораживанию в отсутствие света при температурах –7°C в течение 6 ч, снижая температуру со скоростью 1°C/ч.

В незакаленных и закаленных проростках определяли активность СОД, каталазы, гваяколпероксидазы, содержание сахаров, пролина, антоцианов и флавоноидов, поглощающих в области УФ-В. Также в проростках определяли содержание продуктов пероксидного окисления липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (в основном малоновый диальдегид).

Установлено, что после промораживания закаленных проростков при –7°C выживало более 50% образцов высокоморозоустойчивых сортов Букет и Раритет. Сорт Александра проявлял меньшую устойчивость (выживание – 22%), а у сорта Пидзымок харьковский в таких условиях выживало не более 15% проростков.

В отсутствие холодового закаливания четкой связи между изучаемыми показателями состояния АОС и морозоустойчивостью сортов не наблюдали.

После закаливания проростков при 2–4°C в течение 6 суток у высокоморозоустойчивых сортов Букет и Раритет повышалась активность СОД и каталазы, у менее устойчивых – Александра и Пидзымок харьковский – активность этих ферментов изменялась менее существенно. В то же время у этих сортов после закаливания более заметно возрастала активность гваяколпероксидазы. У закаленных проростков сортов Букет, Раритет и Александра содержание сахаров было значительно выше, чем у сорта Пидзымок харьковский. Содержание пролина в ответ на холодовое закаливание повышалось у всех сортов, при этом абсолютные значения у сортов Букет, Раритет и Пидзымок харьковский были существенно выше, чем у сорта Александра. Холодовое закаливание вызывало значительное повышение содержания антоцианов и флавоноидов, поглощающих в области УФ-В, у сортов Букет, Раритет и Александра, но не у сорта Пидзымок харьковский. Содержание продукта пероксидного окисления липидов малонового диальдегида после 6-часового повреждающего действия температуры –7°C повышалось у сортов Александра и Пидзымок харьковский и слабо изменялось у сортов Букет и Раритет.

В целом, обнаружена положительная связь между активностью АОС и морозоустойчивостью проростков тритикале в закаленном состоянии. Особо заметный вклад в антиоксидантную защиту вносят такие составляющие, как активность СОД, содержание флавоноидных соединений и отчасти (в зависимости от сортовых особенностей) количество пролина и сахаров. Вполне естественно, что для получения более однозначной картины функционирования АОС у тритикале при холодовом закаливании и связи ее состояния с морозоустойчивостью необходимо более полное изучение ее составляющих.

Сравнительная оценка некоторых физиологических процессов прутняка простертого при произрастании в аридных условиях Калмыкии в условиях культуры и естественных пастбищ

Волошина Т.В., Наранова Т.В.

Калмыцкий государственный университет им.Б.Б. Городовикова. Пушкина, 11, Элиста, Россия.
tat-vol.94@mail.ru

Для успешного ведения животноводства в Республике Калмыкия, являющейся сельскохозяйственным регионом, необходимо создание рациональной кормовой базы. В силу жестких природно-климатических условий, продуктивность естественных кормовых угодий довольно низка и аридные условия не позволяют возделывать большинство культур, произрастающих в других зонах, что резко сужает подбор видов и культур способных произрастать в данных условиях в силу своей адаптационной способности. Прутняк достаточно широко представлен в фитоценозах и агроценозах и является перспективным кормовым растением, отличающимся высокой продуктивностью и имеющим большое значение в фитомелиорации деградированных земель. Это растение издавна привлекало внимание многих исследователей, но физиологические особенности его изучены недостаточно. Поэтому было проведено сравнительное изучение пигментного фонда, водного режима и ростовых процессов прутняка простертого в условиях естественных пастбищ и в условиях культуры при произрастании в острозасушливых условиях Калмыкии.

Показано, что листовой аппарат прутняка простертого при произрастании в агроценозах и в условиях естественных пастбищ имел более высокий уровень зеленых пигментов в начале вегетации (начало бутонизации и цветения) по сравнению с завершением онтогенеза (на стадии образования семян). Установлено снижение содержания хлорофилла а и хлорофилла в и увеличение каротиноидов в течение вегетации. Обнаружены незначительные различия в количественном содержании пигментов у прутняка при произрастании в культуре, по сравнению с естественными пастбищами. Установлено, что прутняк простертый, произрастающий в агроценозах, характеризуется довольно интенсивной транспирацией в начале вегетации, снижающей к концу онтогенеза и довольно высоким для эуксерофитов уровнем общей оводненности листьев. В условиях естественных пастбищ потеря воды и оводненность данного вида была ниже. Показано, что изучаемые растения прутняка, произрастающие в условиях культуры, были более высокорослыми и высокопродуктивными по сравнению с соответствующими показателями этих растений при произрастании в условиях естественных пастбищ. Впервые проведенная сравнительная оценка функциональных изменений роста, продуктивности и водного статуса прутняка простертого в ответ на воздействие природных и антропогенных факторов выявила некоторые особенности при произрастании его на естественных пастбищах и в условиях культуры. Это расширяет наши представления о эколого-биологических особенностях данного кормового растения и способствует расшифровке механизмов адаптации этой культуры к экологическим стрессам.

Сравнительная характеристика коры *Spiraea beauverdiana* Schneid (сем. Rosaceae Juss.) в условиях поствулканической активности вулкана Головнина (остров Кунашир, Южные Курильские острова)

Вацерионова Е.О., Копанина А.В.

Институт морской геологии и геофизики ДВО РАН, Южно-Сахалинск, Россия.
katya.vatserionova.85@mail.ru

Растительный покров Курильских островов существует в сложных, неоднородных, весьма специфических условиях. Основные факторы, влияющие на растительный покров — это влияние холодных охотского моря и Тихого океана, современная вулканическая и поствулканическая активность. Древесные растения, обитающие в этих условиях имеют адаптивные жизненные стратегии. Одним из таких растений является *Spiraea beauverdiana* Schneid (сем. Rosaceae Juss.) - листопадный кустарник в высоту до 60 см. Вид часто встречается на Курильских островах, а также обитает на Сахалине. Кустарниковые тундры, каменистые осыпи и склоны, стланиковые заросли, редколесья и горные леса, нивальные лужайки - места обитания *S. beauverdiana*.

Целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение структуры коры разновозрастных стеблей *S. beauverdiana*, произрастающих под воздействием сольфатарных полей и типичных горных условиях в кальдере вулкана Головнина на острове Кунашир (Курильские острова). Образцы были собраны на территории центрального Восточного сольфатарного поля, которое расположено по берегам озера Кипящее. Термальные источники Центрального Восточного сольфатарного поля разного состава от субнейтральных до кислых. Температура источников здесь высокая (от 60°C до 95°C), с преобладанием H₂S и CO₂ в газовом составе. Образцы отбирали в максимальном приближении к газовым выходам. Образцы для сравнения были собраны в типичном для данного вида кустарниковом бамбучнике в кальдере вулкана Головнина на значительном удалении от сольфатарного поля.

Образцы *S. beauverdiana* фиксировали в день сбора в смеси 96% этилового спирта, затем были изготовлены постоянные и временные препараты стеблей. Микросрезы готовили из подготовленных фрагментов, толщиной 5–15 мкм на санном микротоме. Полученные микросрезы подвергают действию красителей: сафранина и нильского синего. С помощью светового микроскопа Axio Scope.A1, CarlZeiss и программного обеспечения ZEN 2 lite был выполнен анализ образцов, компьютерная обработка изображений микросрезов *S. beauverdiana* и измерения биометрических параметров тканей и клеток.

Сравнительные исследования структуры коры разновозрастных стеблей *S. beauverdiana* в контрастных экологических условиях позволили нам выявить ряд структурных особенностей. Установлено, в тканях коры в условиях сольфатарного поля происходят структурные перестройки, которые представлены отклонениями от нормального роста в значениях отдельных показателей тканей и зонами неспецифического аномального строения. Эти структурные изменения различной степени выраженности и локализации представлены на протяжении всего онтогенеза надземного стебля – от 1 до 12-15 лет. Нарушение в деятельности феллогена и камбия влечет за собой формирование многослойной феллемы и феллодермы, флоэмы с повышенным участием склерифицированной паренхимы. С возрастом наблюдается ряд изменений в структуре коры по сравнению с нормой: уменьшение диаметра стебля, ширины коры, ширины перидермы (между аномальными зонами), вторичной флоэмы (проводящей и непроводящей). Существенно преобразуется проводящая флоэма. Уменьшается по сравнению с нормой общее число клеток в радиальном ряду, радиальный и тангентальный размеры члеников ситовидных трубок. Сочетание таких экологических факторов в условиях сольфатарного поля – повышенные температуры в почве, высокое содержание в ней различных химических элементов, в том числе тяжелых металлов, насыщенность приземного слоя воздуха соединениями серы, ограничения доступности почвенной влаги, мы полагаем, могли вызвать такие нарушения. Таким образом, можно говорить о наличии структурного отклика древесного растения на комплекс экологических факторов поствулканической активности.

При поддержке РФФИ (15-04-04774) и в рамках госзадания ИМГиГ ДВО РАН.

Сравнительное исследование процессов старения детерминированных и недетерминированных клубеньков бобовых растений

Билова Т.Е.^{*,**}, Ким А.^{**}, Чанцева В.В.^{*}, Дорн М.^{**}, Лукашева Е.М.^{*}, Илинг К.^{***}, Мамонтова Т.В.^{*}, Чекина А.А.^{*}, Осмоловская Н.Г.^{*}, Шумилина Ю.С.^{*}, Романовская Е.В.^{*}, Гришина Т.В.^{*}, Балке Г.У.^{**}, Матаморос М.А.^{****}, Демченко К.Н.^{*****}, Цыганов В.Е.^{*****}, Вессйоханн Л.А.^{**}, Жуков В.А.^{*****}, Фролов А.А.^{*,**}

* Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб. 7/9, Санкт-Петербург, Россия.

** Лейбниц-Институт Биохимии Растений, Weinberg 3, 06120 Halle (Saale), Germany.

*** Институт фармации, Мартин-Лютер университет Галле-Виттенберг, Halle-Wittenberg, DE 06120, Halle/Saale, Germany.

**** Испанский Национальный Исследовательский Совет, Департамент Питания Растений, Apartado 13034, 50080 Zaragoza, Spain.

***** ФГБУН “Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН”, ул. Профессора Попова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия.

***** Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии, шоссе Подбельского, д. 3, Пушкин-8, Санкт-Петербург, Россия.

Поддержание высокой урожайности и качества сельскохозяйственной продукции является критически важным для национальной экономики. При этом, приоритетной задачей является получение высоких урожаев бобовых растений, характеризующихся высоким содержанием белка в семенах. Для обеспечения высокой продуктивности бобовых растений, необходимо продлить период функционального состояния (т.е. сохранение высокого уровня нитрогеназной активности) азотфиксирующих корневых клубеньков, которое прогрессивно снижается по мере увеличения их возраста и прекращается во время формирования плодов. Для решения этой задачи был привлечен комплекс методов протеомики и метаболомики, что позволило охарактеризовать молекулярные механизмы, лежащие в основе возрастных изменений в детерминированных и недетерминированных клубеньках сельскохозяйственно ценных растений, таких как фасоль (*Phaseolus vulgaris*) и горох (*Pisum sativum* L.), соответственно. Клубеньки собирались в фазах ювенильной, цветения, формирования первого плода. Эти фазы соответствовали следующим этапам развития клубеньков: функционально-зрелый, ранний и поздний этап процесса старения. Белки клубеньков, выделенные с помощью фенольной экстракции, подвергали ограниченному протеолизу трипсином. Полученные пептиды анализировали с помощью нанопоточной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения (nanoLC-ESI-Q-и LIT-Orbitrap-MS). Для анализа метаболома клубеньков применялись методы газовой (GC-MS), ультравысокоэффективной жидкостной обращённо-фазовой и ион-парной хромато-масс-спектрометрии (UHPLC-(IP)-RP-QqTOF- и QqQ-MS). В клубеньках растений фасоли и гороха был охарактеризован как растительный протеом, так и протеом симбиотических бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* и *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, соответственно. Показано, что, несмотря на формирование этими растениями клубеньков разного (детерминированные и недетерминированные) морфо-физиологического типа, в тканях стареющих клубеньков происходят сходные метаболические процессы, среди которых наиболее важным событием является резкое падение уровней содержания участников белкового метаболизма (белки рибосомальных 40S и 60S субъединиц, участники убиквитин-зависимой деградации поврежденных белков, а также шапероны, шаперонины и гистоны). В это же время в протеомах двух генотипов ризобий возрастали уровни участников центрального энергетического обмена, а также процессов синтеза и транспорта различных метаболитов. Интересно отметить, что в клубеньках гороха у *R. leguminosarum* bv. *viciae* возростала экспрессия некоторых белков нитрогеназного комплекса, тогда как в клубеньках фасоли у *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* происходило снижение уровней белков нитрогеназы.

Работа выполнена при поддержке гранта РФ (№17-16-01042) и РФФИ (№18-016-00190).

Сравнительное исследование эколого-физиологических особенностей фотосинтеза лиственницы Канады и Сибири

Максимов А.П., Максимов Т.Х.

Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, г. Якутск.
tcmx@mail.ru

Фотосинтетические характеристики *Larix laricina* (тамарак) в субарктической северной Канаде, измеренные на ранней стадии вегетационного периода, выявили незначительные отличия от таковых в тот же период для *Larix cajanderi* (лиственница Каяндера) в Восточной Сибири. Обнаружено близкое сходство в нетто- фотосинтезе как по моделям, так и по величинам, основными причинами которых являются проводимость мезофилла и температура листа в сочетании с дефицитом давления пара. Тем не менее, световые и биохимические ограничения нетто фотосинтеза у разных видов существенно различались. Проводимость листьев была значительно ниже для тамарака при более высокой эффективности использования воды.

В совокупности полученные данные фотосинтеза позволяют предположить, что *L. laricina* в лесотундровой зоне Северной Канады, явно отличаясь по морфологии и условиям произрастания от *L. cajanderi* в бореальном лесу Якутии, проявляет довольно сходную фотосинтетическую активность с учетом среды обитания и вегетационного периода. В целом, максимальный нетто-фотосинтез тамарака ниже, примерно в два раза, чем у якутской лиственницы.

Для оценки всего спектра изменчивости физиологических и биохимических особенностей процесса фотосинтеза для тамарака необходимы сезонные наблюдения в различные по гидротермическому режиму годы.

Сравнительный анализ белково-пептидных антимикробных пулов семян дикорастущих и культурных растений семейства Капустные (*Brassicaceae*) как фактор различной степени устойчивости к биотическим стрессовым факторам окружающей среды

Рогожин Е.А.^{*, **, ***}, *Барашкова А.С.*^{*}, *Садыкова В.С.*^{**}

* Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.
Миклухо-Маклая ул., 16/10, Москва, Россия.

** Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе.
Большая Пироговская ул., 11с1, Москва, Россия.

*** Институт экологической и сельскохозяйственной биологии, Тюменский государственный университет.
Володарского ул., 6, Тюмень, Россия.
rea21@list.ru

Хорошо известно, что растения имеют сложную многокомпонентную систему врожденного иммунного ответа на комплекс стрессовых факторов, возникающих в процессе их онтогенетического развития. Один из таких компонентов представлен разнообразными полипептидами с защитными функциями, преобладающая из которых антимикробная. Представители семейства Крестоцветные (*Brassicaceae*), как дикорастущие, так и культурные, широко распространены и являются богатыми источниками разнообразных антимикробных белков (АМБ) и пептидов (АМП), биосинтез целого ряда которых способен к индукции в ответ на аппликацию негативного фактора. Цель настоящей работы заключалась в проведении сравнительного анализа состава антимикробных полипептидов семян двух широко распространенных видов растений семейства Капустные (*Brassicaceae*) - ярового рапса (*Brassica napus* L.) и свербиги восточной (*Bunias orientalis*) растений с целью их комплексного анализа на предмет вклада в большую степень резистентности к биотическим стрессовым факторам окружающей среды, в первую очередь, к грибным и бактериальным фитопатогенам. На примере одного из широко возделываемых культурных видов, ярового рапса (*B. napus*) проведено скрининговое исследование качественного и количественного состава антимикробных белков и пептидов между сортами данного вида, значительно отличающихся между собой по уровню полевой устойчивости к болезням. Результат выявил, что десять из двенадцати образцов показали идентичные профили белково-пептидного состава, тогда как только по двум вариантам был обнаружен контраст, при этом наибольшая степень представленности полипептидов, как в сходных, так и в различающихся вариантах локализовалась в более низкомолекулярной области, в частности, пептидной (с молекулярными массами менее 10 кДа). Идентификация некоторых полипептидов методом автоматической деградации по Эдману из числа преобладающих полипептидов позволила установить их структурную принадлежность к семействам неспецифических 9 кДа липид-переносящих белков (группа nsLTP1), запасных белков 2S-альбуминов (группа напинов), а также гомологов ингибиторов трипсина горчицы (группа "mustard trypsin inhibitor-2"), относительное содержание которых на единицу сырой массы семян было определено сочетанием методов препаративного ДСН ПААГ-электрофореза и аналитической обращено-фазовой ВЭЖХ. Проверка антимикробной активности изучаемого разнообразия белково-пептидных экстрактов семян различных сортов рапса (*B. napus*) позволило выявить при действующей концентрации 2 мг/мл полное отсутствие ингибирующего действия на тестируемые культуры, в то время как повышение нагрузки до 8 мг/мл, помогло локализовать исключительно фунгистатический эффект на 4 экстрактах по отношению к *Candida albicans* и *Fusarium solani*. При сравнении белково-пептидных профилей семян типового и контрастного сортов рапса с близкородственным ему сорным растением – свербигей восточной (*Bunias orientalis*) выявлено, что качественный состав белков и пептидов сорного родственного растения – редьки дикой – кардинальным образом отличается от такового у рапса, главным образом отсутствием высокомолекулярных компонентов, предположительно запасных белков в виде многообразия изоформ. Кроме того, было проведено сопоставление репертуаров и представленности различных классов антимикробных пептидов между сравниваемыми видами растений. Так, с использованием исключительно аннотированных в интерактивные общедоступные базы данных GenBank, на основании совокупности геномных и транскриптомных последовательностей была предпринята попытка сравнения совокупности антимикробных полипептидов внутри семейства Капустные (*Brassicaceae*) между парами родственных видов из числа культурных и диких форм. Так, в результате использования двух независимых алгоритмов поиска были выявлены пулы АМП из семейств дефенинов, тионинов, липид-переносящих белков и снакинов, имеющие определенные особенности внутри каждого из сравниваемых семейств, но не дающие четкой закономерности между ними. Полученный промежуточный результат позволил выдвинуть предположение о том, что большинству анализируемых видов растений характерен определенный набор уникальных АМП из перечисленных выше структурных групп, при этом в каждом растении охраняется общая представленность тех или иных пептидов, относящихся к выбранным семействам.

Данное исследование поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 18-34-20058-мол_a_вед).

Сравнительный анализ накопления GFP белка в листьях транспластомных и трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana

Сидорчук Ю.В., Самодуров Д.Е., Загорская А.А., Белафин П.А., Розов С.М., Дейнеко Е.В.

Институт цитологии и генетики СО РАН. пр-т Лаврентьева, 10, Новосибирск, Россия.
sidorch@bionet.nsc.ru

Создание высокопродуктивной системы экспрессии на основе модификации пластомных геномов растений представляется весьма перспективной задачей современной биотехнологии. Транспластомные растения, по сравнению с ядерными трансформантами, обладают целым рядом преимуществ. Прежде всего это связано с возможностью направленной интеграции трансгенов в пластидный геном по принципу гомологичной рекомбинации, что позволяет избежать эффекта положения (генного сайленсинга) и перекрывания с собственными генами пластома. Интеграция искусственных оперонов в пластом дает возможность переносить в растительные клетки новые метаболические пути. Очень привлекательна способность транспластомных растений достигать высоких значений выхода рекомбинантного белка по сравнению с ядерной трансформацией, что обеспечивается чрезвычайно высокой копийностью пластома в клетках.

Несмотря на все преимущества транспластомных растений по сравнению с ядерными трансформантами, на пути их создания существует ряд трудностей, основными из которых являются крайне низкая эффективность трансформации и отбор высокопродуктивных гомопластидных трансформантов.

Для оценки уровня экспрессии и накопления рекомбинантного белка в модельных транспластомных растениях табака в лаборатории биоинженерии растений была создана генетическая конструкция pLastEx-GFP, которая содержала репортерный ген *gfp* и селективный маркер *aadA*, обеспечивающий устойчивость к антибиотикам спектиномицину (sp) и стрептомицину (st). Оба гена были поставлены под управление промотора 16S РНК (*PrnG10L*) и терминатора *TpsbA*. Для увеличения частоты трансформации и уровня экспрессии в качестве места инсерции в пластидный геном был выбран район между генами, кодирующими транспортные РНК изолейцина и аланина, располагающийся в инвертированном повторе. Согласно данным литературы выбранные регуляторные элементы и район инсерции способны обеспечивать высокий выход рекомбинантных белков в листьях транспластомных растений табака.

Исходные транспластомные растения (ChT₀) получали методом биобаллистики листовых эксплантов с последующим отбором регенерантов на среде с минимальным содержанием (100 мг/л) селективного агента (sp). Полученные транспластомные растения, устойчивые к антибиотику sp, адаптировали к условиям гидропонной теплицы, выращивали и получали семена от самоопыления. Полученные семена стерильно высевали на питательную среду МС с добавлением двух селективных агентов (sp+st) в максимальной концентрации 500 мг/л. Зеленые проростки адаптировали к условиям гидропонной теплицы и выращивали зрелые растения ChT₁. Для устранения химерности и гетеропластидности у 5-ти исходных ChT₀ транспластомных растений стерильно брали листья и из них в условиях селективного отбора (sp в концентрации 500 мг/л) регенерировали новые растения (ChR₁), цикл повторяли дважды. Регенеранты ChR₂ (5 групп по 3-7 растений) адаптировали к условиям гидропонной теплицы и выращивали зрелые растения. Для контроля по общепринятой методике были получены ядерные трансформанты NT₀, экспрессирующие тот же самый ген *gfp*, что и транспластомные растения. Определение количества рекомбинантного GFP (% от ОРБ) в листьях транспластомных растений поколения ChT₁ (13 растений), транспластомных растений после двух циклов регенерации в условиях селективного отбора ChR₂ (28 растений) и ядерных трансформантов NT₀ (22 растения) проводили флуориметрическим методом в 3-5 повторениях. На каждом этапе получения транспластомных растений проводили контроль GFP-флюоресценции хлоропластов с использованием конфокальной микроскопии.

Согласно полученным данным количество рекомбинантного GFP в поколении ChT₁ транспластомных растений в среднем составило 0,12±0,01%, в тоже время разброс изменчивости был минимальным от 0,09±0,004% до 0,16±0,01% от ОРБ. Аналогичная ситуация наблюдалась и у растений ChR₂ после двух циклов регенерации в условиях селективной отбора. В среднем накопление GFP в листьях этих растений составило 0,11±0,01%, а варьирование средних значений по группам составило от 0,08±0,02% до 0,14±0,003%. Максимальное же значение количества GFP в листьях проанализированных транспластомных растений не превышало 0,19±0,02%. Весьма интересно отметить, что количество GFP в листьях обычных ядерных трансформантов было в 4 раза выше, чем в листьях транспластомных растений, и в среднем составило 0,49±0,05%, а минимальное и максимальное значения определялись на уровне 0,07±0,02% и 1,01±0,04% от ОРБ, соответственно.

Таким образом, если уровень накопления рекомбинантного белка GFP и разброс изменчивости, выявленные в листьях ядерных трансформантов табака, являются нормой, то уровень накопления рекомбинантного белка GFP в листьях транспластомных растений оказался чрезвычайно низким вне зависимости от выбранного уровня селективного давления при отборе и расхимеривании. Особо следует отметить практически полное отсутствие вариабельности по данному признаку. Вероятно, это связано с тем, что при использованных методах отбора не был достигнут уровень полной гомопластомности хлоропластов. Однако это требует дальнейших исследований с использованием ПЦР в реальном времени в сочетании с детальным анализом трансформированных хлоропластов методами конфокальной микроскопии.

Работа поддержана бюджетным проектом 0259-2021-0010.

Стерильность пыльцы *Trifolium repens* и *Aquilegia vulgaris* из ближней зоны Чернобыльской АЭС

Макаренко Е.С., Волкова П.Ю.

ФГБНУ ВНИИ радиологии и агроэкологии, Киевское шоссе 109 км г., Обнинск, Россия.
makarenko_ek_obninsk@mail.ru

Адаптация популяций растений с разной радиочувствительностью к многолетнему хроническому действию ионизирующего излучения представляет особый интерес. Изучение репродуктивных качеств в популяциях травянистых растений, обитающих в течение многих поколений в условиях реально встречающихся в современной биосфере уровней хронического облучения, позволяет оценить отдалённые радиационно-индуцированные биологические эффекты и прогнозировать дальнейшую судьбу произрастающих на радиоактивно загрязнённых территориях растений. Поскольку пыльца несёт гаплоидный набор наследственной информации, то является более чувствительным звеном в отношении повреждающих факторов по сравнению с диплоидными клетками, имеющими большие возможности для репарации повреждений. Поэтому выбранный в данной работе показатель стерильность пыльцевых зёрен может изменяться под действием меньших доз и уровней техногенных факторов, в том числе радиоактивного загрязнения, на фоне других показателей, используемых в биологическом мониторинге.

Целью настоящей работы являлась оценка частоты стерильных пыльцевых зёрен у клевера ползучего и водосбора обыкновенного из ближней зоны Чернобыльской АЭС.

Исследование проводили на территории Полесского государственного радиационно-экологического заповедника (ПГРЭЗ) Республики Беларусь. Заповедник был создан в районах, сильно загрязнённых долгоживущими радионуклидами (^{137}Cs , ^{90}Sr , $^{238,239,240}\text{Pu}$, ^{241}Am) после аварии на Чернобыльской АЭС. Импактные популяции выбрали около бывших населённых пунктов Радин, Кулажин и Масаны, характеризующиеся разными уровнями радиоактивного загрязнения, а контрольные участки около Бабчин и Ломыш. На площадках определили мощность AMBIENTной дозы и плотности потока частиц, в отобранной почве удельную активность радионуклидов.

Изучали растения, принадлежащие к двум разным семействам, различающихся по радиорезистентности, определённой по ЛД₅₀ в фазе вегетации (доза острого облучения, вызывающая гибель половины облучённых организмов). Клевер ползучий (*Trifolium repens*) – семейство Бобовые (Fabaceae), средняя радиорезистентность (ЛД₅₀ ~ 250 Гр). Водосбор обыкновенный (*Aquilegia vulgaris*) – семейство Лютиковые (Ranunculaceae), радиочувствительны, ЛД₅₀ ~ 20 Гр. На площадках с клевером мощность AMBIENTной дозы составила 0.28, 0.33, 2.78, 3.80, 3.89 мкЗв/ч для участков Ломыш, Бабчин, Кулажин, Масаны, Радин, соответственно. На площадках с водосбором мощность AMBIENTной дозы составила 0.28, 0.33, 3.80, 5.27, 6.2 мкЗв/ч для участков Ломыш, Бабчин, Масаны, Радин, Кулажин, соответственно.

Для определения качества пыльцы клевера ползучего отобрали по 10 соцветий, а с водосбора обыкновенного по 12-13 цветков с участка, на каждом растении проанализировали не менее 1000 пыльцевых зёрен. Пыльцу окрашивали йодным методом и анализировали на микроскопе SK-14 при 240-кратном увеличении. Для определения значимости отличия от контроля использовали критерий Манна-Уитни (U-тест) в Statistica 8.0.

Средняя частота встречаемости стерильной пыльцы клевера ползучего в референтных популяциях Ломыш и Бабчин достигала 20.4±6.3% и 24.4±6.0%, соответственно, и различалась между собой незначимо. На радиоактивно загрязнённых участках частота стерильных пыльцевых зёрен достигала 26.5±7.6%, 25.0±5.1% и 50.9±2.5%, на участках Кулажин, Масаны и Радин, соответственно. Повышенная стерильность пыльцы клевера наблюдается только в популяции Радин (относительно Бабчин (p<0.01) и Ломыш (p<0.001)). Популяция Радин характеризуется не столько максимальным уровнем радиационного воздействия, сколько дополнительным нагревом, произрастая на открытом и засушливом участке, таким образом, комбинированное воздействие неблагоприятных факторов могло оказать модифицирующее, сенсibiliзирующее действие.

У водосбора обыкновенного средняя частота встречаемости стерильных пыльцевых зёрен на контрольных участках Ломыш и Бабчин составила 5.3±1.1% и 5.7±0.8%, соответственно. На радиоактивно загрязнённых участках частота стерильной пыльцы составила 2.5±0.3%, 7.3±1.0% и 5.5±0.7%, в популяциях Масаны, Радин, Кулажин, соответственно. При этом данный параметр значимо ниже в популяции Масаны, чем в контрольной популяции Бабчин (p<0.01). В отличие от клевера, водосбор обыкновенный является радиочувствительным растением и вынужден адаптироваться; возможно, относительно низкое радиоактивное загрязнение на участке Масаны позволило спустя десятки лет не снижать качество пыльцы или, что также вероятно, данные результаты обусловлены локальными условиями произрастания.

На основе полученных в настоящей работе результатов, можно сделать вывод о том, что наблюдаемый в ближней зоне Чернобыльской АЭС уровень радиационного воздействия оказался недостаточно высок для индуцирования устойчивого эффекта изменения частоты стерильности пыльцы *Trifolium repens* и *Aquilegia vulgaris*, либо он был модифицирован другими факторами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-34-20012).

Стеринный компонент мембран растений галофитов

Розенцвет О.А. *, Котлова Е.Р. **, Богданова Е.С. *, Нестеров В.Н. *, Сенник С.В. **, Шаварда А.Л. **

* Институт экологии Волжского бассейна – филиал Самарского ФИЦ, РАН, Тольятти, Россия.

** Ботанический институт, РАН, Санкт-Петербург, Россия.
olgarozen55@mail.ru

Стерины наряду с глицеролипидами и сфинголипидами являются обязательными компонентами мембран эукариот. Характерной особенностью растительных стеринов (фитостеринов) является их структурное и функциональное многообразие. Обычно фитостерины содержат 28 или 29 атомов углерода и одну или две двойные связи – в стерановом фрагменте и/или в алкильной боковой цепи. В зависимости от положения двойной связи в тетрациклической части молекулы различают Δ -5- и Δ -7-стерины. Фитостерины с насыщенным строением ядра (станолы), рассматриваются в качестве отдельной структурной группы фитостеринов. Фитостерины включают также эфиры стеринов, стерилгликозиды и ацилированные стерилгликозиды. Однако только свободные стерины являются неотъемлемой частью мембран, участвуя в регуляции их текучести и проницаемости.

Как структурные компоненты мембраны, стерины могут влиять на физическое состояние мембраны во время стрессов не только *посредством* изменений общего количества стеринов, но также и *посредством* изменения соотношения их молекулярных видов.

Особое значение придается стеринам в организации липидных рафтов как платформе для встроенных в липидный бислой транспортных систем и сигнальных молекул. Установлено, что в составе липидов рафтов преобладают стерины, сфинголипиды или цереброзиды, а также глицеролипиды с насыщенными жирными кислотами.

В настоящей работе изучен состав стеринов в мембранах 21 вида дикорастущих галофитов разных таксонов и экологических групп. Растения представлены 9 родами (*Anabasis*, *Artemisia*, *Atriplex*, *Salicornia*, *Suaeda*, *Halocnemum*, *Limonium*, *Tamarix*), разными жизненными формами (полукустарнички, травянистые одно- и многолетники), экологическими группами (эугалофиты, криногалофиты и гликогалофиты), а также растениями с разными путями фотосинтеза (C_3 и C_4 виды).

Анализ стеринов в экстракте общих липидов проводили методом GC-MS после процедуры силилирования (получение TMS-производных).

Доминирующей группой стеринов является триада Δ 5-стеринов, состоящая из β -ситостерина (в среднем ~ 50%), стигмастерина (содержание варьирует от 5 до 45% в зависимости от систематического положения растения) и кампестерина (~ 5-10%). Наряду с ними обнаружены холестерин (1-7%), Δ 5-авенастерин (до 7%), а у отдельных видов Δ 7-стерины (латостерин, 22-стигмастерин, спинастерин, Δ 7-ситестерин, Δ 7-авеностерин) и станолы (кампестанол, стигмастанол, ситостанол).

Установлена отчетливая зависимость состава стеринов от экологии галофитов. Криногалофиты отличались большим накоплением β -ситостерина в сравнении с глико- и эугалофитами, гликогалофиты – большим накоплением стигмастерина, а эугалофиты – максимальным количеством станолов. Состав СТ, по-видимому, мало связан с жизненной формой растений. Однако с увеличением оводненности листьев (суккулентности) отмечено снижение концентрации β -ситостерина и суммы Δ 5-стеринов на фоне увеличения концентрации Δ 7- и Δ 0-стеринов. Наибольшие различия в составе СТ у галофитов с разным типом фотосинтеза связаны с накоплением стигмастерина.

Показано также, что соотношение различных структурных типов стеринов в значительной степени зависит от приуроченности к определенным мембранам клетки, включая эндомембраны органелл. На примере двух C_3 -видов, контрастных по способности накапливать соли – эугалофите *S. perennans* и гликогалофите *A. santonica* – установлена специфичность состава стеринов в мембранах хлоропластов и митохондрий. Содержание станолов в мембранах хлоропластов *S. perennans* почти в 8 раз выше, чем у *A. santonica*. Противоположная картина обнаружена в составе стеринов мембран митохондрий. Доминирующее положение в составе стеринов рафтов обеих органелл занимает β -ситостерин (55-75% от суммы стеринов в хлоропластах и митохондриях, соответственно).

Сделан вывод, что соотношение молекулярных видов стеринов в значительной мере зависит от таксономии и экологии галофитов, природы мембранных структур, в том числе приуроченности к определенным органеллам, детергент-стабильным (рафты) и детергент-лабильным участкам мембран.

Стериновый статус генеративных особей *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (*Orchidaceae* Juss.)

Сечин Е.Н., Маракаев О.А.

Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, 150003, Советская ул., 14, Ярославль, Россия.
marakaev@uniyar.ac.ru

Фитостерины – класс биологически активных растительных веществ, относящихся к изопреноидным производным и насчитывающих более двухсот представителей. Свободные стериды, а также некоторые их гликозиды, являясь интегральными компонентами мембран, участвуют в регуляции ее проницаемости и обеспечивают внутриклеточный гомеостаз клетки. Все растения способны самостоятельно синтезировать стериды, при этом их качественный состав и количественное содержание в органах различаются. В настоящее время предполагается фундаментальная роль стеридов в регуляции роста и развития растений. Изучение содержания стеридов в различных органах растений является актуальной задачей в связи с недостаточностью и фрагментарностью имеющихся данных. Исследования состава стеридов у представителей семейства *Orchidaceae* единичны, а имеющиеся в них сведения касаются отдельных органов и не позволяют сформировать представление о стеридовом статусе растительных особей. Целью работы являлось определение стеридового статуса *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (пальчатокоренника пятнистого) – представителя семейства *Orchidaceae*, произрастающего в естественных условиях Центрально-Европейской части России. Исследовали растения генеративного возрастного состояния. Идентификацию и определение содержания фитостеридов проводили с помощью газового хроматографа с масс-спектрометрическим детектором с использованием библиотек масс-спектров, а также стандартных веществ.

В результате исследования в надземных и подземных органах *D. maculata* выявлено пять фитостеридов (циклоэукаленол, кампестерин, брассикастерин, β -ситостерин и стигмастерин), тритерпенол (циклоартенол), а также микостерин (эргостерин), обнаруженный в подземных органах растения и принадлежащий, по-видимому, грибному симбионту. В соцветиях присутствуют циклоартенол, циклоэукаленол, кампестерин и β -ситостерин, в листьях – циклоартенол, циклоэукаленол, β -ситостерин и стигмастерин, в стеблях – β -ситостерин, в придаточных корнях – циклоартенол, брассикастерин и β -ситостерин, в стеблекорневых тубероидах (и их окончаниях) – циклоартенол и β -ситостерин. Основным стеридом *D. maculata* является β -ситостерин (60 % от суммы всех стеридов), который представлен во всех органах. Это соединение является наиболее эффективным стеридом для стабилизации мембран, что определяет его наибольшую распространенность. Высоким содержанием отличается циклоартенол (21 % от суммы всех соединений стеридового ряда), отсутствующий в стеблях. Содержание остальных соединений существенно ниже. По уменьшению уровня они располагаются в следующем порядке: циклоэукаленол (8 %), стигмастерин (8 %), брассикастерин (2 %), кампестерин (1 %). Содержание фитостеридов в органах *D. maculata* различается в широких пределах: от 102,6 мкг/г сухой массы (стебли) до 1851,8 мкг/г сухой массы (листья). Относительно высокое суммарное содержание фитостеридов выявлено в листьях (32 %), придаточных корнях (26 %) и соцветиях (22 %). Пониженный уровень отмечен в стеблекорневых тубероидах и их окончаниях (5-8 %). Минимальным содержанием фитостеридов отличается стебель (2 %). Эргостерин, обнаруженный в придаточных корнях и окончаниях стеблекорневых тубероидов *D. maculata*, содержится в микоризообразующих грибах, вступающих с растением в симбиотические отношения. Содержание эргостерина в придаточных корнях в пять раз выше по сравнению с окончаниями стеблекорневых тубероидов. Это совпадает с данными о микотрофности *D. maculata*, свидетельствующими о более интенсивном развитии микосимбионта в придаточных корнях. Отмечается, что эргостерин может выступать биохимическим маркером (наряду со специфическими пигментами и хитином) для количественной оценки микосимбионта в органах растения.

Таким образом, в работе впервые для генеративных особей *D. maculata* – представителя семейства *Orchidaceae*, произрастающего в естественных условиях Центрально-Европейской части России, – определены состав и содержание стеридов в различных органах. Состав фитостеридов надземных органов более разнообразен, чем подземных. Различия в стеридовом статусе органов могут быть объяснены неодинаковой функциональной значимостью выявленных веществ для роста и развития *D. maculata*. Полученные данные свидетельствуют о разнообразии соединений стеридового ряда, их неодинаковом содержании и соотношении в подземных и надземных органах исследованного растительного объекта.

Структура и развитие интерфейса инфекционных нитей в бобово-ризобийном симбиозе

*Цыганова А.В. *, Brewin N.J. **, Цыганов В.Е. **

* Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии.
ш. Подбельского, 3, Пушкин-8, Санкт-Петербург, Россия.

** John Innes Centre. NR4 7UH, Norwich, UK.
avtsyganova@arriam.ru

Внутриклеточная инфекционная нить, инициированная в клетке корневого волоска, представляет собой уникальную структуру, связанную с бобово-ризобийным симбиозом. У большинства растений есть два типа растущих кончиком клеток: пыльцевые трубки и корневые волоски. Инфекционные нити представляют собой третий тип роста кончиком в результате отложения материала клеточной стенки. Инфекционная нить представляет собой растущую внутрь трубку, в которой полярный (апикальный) рост топологически инвертирован по сравнению с ростом кончиков корневых волосков или пыльцевых трубок. В отличие от роста корневых волосков и пыльцевых трубок, который обусловлен клеточным тургором, движущей силой роста инфекционной нити является синтез и направленная секреция материала внеклеточного матрикса в просвет инфекционной нити и деление бактерий внутри.

Инициирование и рост инфекционной нити являются следствием обмена сигналами с бактериями ризобиями и измененной транскрипционной активности в ядре клетки-хозяина. Помимо прочего, это приводит к синтезу и отложению новых белков в микродоменах плазматической мембраны инфекционной нити. Везикулы, происходящие из эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи (АГ), сливаются с плазматической мембраной на кончике инфекционной нити, высвобождая свое содержимое в стенку и внеклеточный матрикс, что контролируется рядом белков. Гликопротеины, белки и полисахаридные компоненты матрикса инфекционной нити включают следующие компоненты: арабиногалактанпротеин-экстензины (АГП-экстензины), богатые гидроксипролином белки, ранние нодулины, липоксигеназу, диаминоксидазу и рамногалактуронан II (РГ-II). Кроме того, H_2O_2 играет роль в перекрестном связывании АГП-экстензинов и изменении биофизических свойств матрикса инфекционной нити. Везикулы, транспортируемые из АГ, также содержат целлюлозосинтазы, ксиллоглюкан и пектины (гомогалактуронан (ГГ), РГ-I и РГ-II). ГГ синтезируется в высоко метилэтерифицированной форме и может транспортироваться вместе с комплексами пектинметилэстераз/ингибитора пектинметилэстераз. Все эти компоненты и другие ферменты ремоделирования клеточной стенки попадают в апопласт.

В формирующейся стенке инфекционной нити целлюлозосинтазы включаются в мембрану и синтезируют кристаллическую целлюлозу. На этом этапе ГГ с высокой степенью метилэтерификации является основным компонентом стенки инфекционной нити. В зрелой инфекционной нити основными полисахаридными компонентами являются: целлюлоза, ксиллоглюкан и ГГ с различной степенью метилэтерификации. ГГ с низким уровнем метилэтерификации связывается с ионами Ca^{2+} , увеличивая таким образом жесткость клеточной стенки. Стенка инфекционной нити также содержит экстензины, арабиногалактановые белки (АГБ) и экспанзины. Кроме того, каллоза и фенольные соединения, такие как суберин, могут накапливаться как проявление защитных реакций в ответ на неэффективный симбиоз. Многие ферменты участвуют в модификации и деградации клеточной стенки во время роста инфекционной нити и образования инфекционной капли. Полярный рост инфекционной нити опосредуется активным цитоскелетом, а микротрубочки создают формообразующий туннель для роста инфекционной нити. Внутри просвета инфекционной нити играют важную роль бактериальные компоненты симбиотического интерфейса.

На процесс клубенькообразования и эффективность симбиотической азотфиксации могут повлиять различные условия окружающей среды. При исследовании бобово-ризобийного симбиоза в стрессовых условиях было показано, что общей реакцией на различные воздействия (тяжелые металлы, засоление, фунгициды) является утолщение стенок инфекционных нитей, при этом клеточные стенки растения могут обнаруживать противоположную реакцию. Таким образом, различия в компонентном составе и механизмах моделирования клеточных стенок и стенок инфекционных нитей демонстрируют дифференцированный ответ на различные стрессоры.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2020-920 от «16» ноября 2020 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Структурные изменения флоэмы ствола *Betula ermanii* Cham. в условиях Южно-Сахалинского грязевого вулкана (о-в Сахалин)

Тальских А.И., Копанина А.В., Власова И.И.

Институт морской геологии и геофизики ДВО РАН, Южно-Сахалинск, Россия.
Anastasiya_talsk@mail.ru

Один из самым крупным и активным грязевым вулканом острова является Южно-Сахалинский грязевой вулкан (далее ЮСГВ). ЮСГВ – уникальное явление природы, которое в результате своей деятельности, извергая на поверхность разжиженные осадочные породы, оказывает непосредственное влияние на окружающую среду. В районе ЮСГВ засоленные почвы переувлажнены, незначительно изменен состав приземного воздуха за счет эмиссии газов из эруптивных центров и трещин. Специфическими условиями ЮСГВ являются щелочность почв с содовым засолением, наличие в них редкоземельных и тяжёлых металлов. Цель исследования изучение структурных особенностей флоэмы стволов *Betula ermanii* Cham, произрастающей на ЮСГВ и в типичных условиях.

Betula ermanii Cham. (сем. *Betulaceae* S. F. Grai.) – однодомное, листопадное, анемофильное дерево первой, второй, третьей величины или крупный кустарник, формирует как чистые, так и смешанные леса в горах и предгорьях, а также кустарниковые заросли – ерники, на морских побережьях и в высокогорьях. Она обладает широкой нормой реакции и высокой степенью адаптивности к самым различным местопроизрастаниям. Образцы со стволов берез взяты на северной границе активного грязевого поля ЮСГВ в березово-ольхово-ивовом высокотравном лесе (предгорье Южно-Камышового хребта, юг Сахалина). Деревья *Betula ermanii* высотой 20 м, возраст 56 лет. А также образцы взяты в типичных для вида условиях в пихтово-каменноберезовом кустарниково-разнотравном лесе (Сусунайский хребет, юг Сахалина). Высота деревьев 12–14 м, возраст 54 года. Отбор и фиксацию образцов для анатомического анализа проводили согласно стандартным методическим подходам и методическим рекомендациям по коре JAVA. Проанализировано 16 количественных показателей тканей коры. Объем выборки для каждого параметра составлял не менее 30 измерений. Для каждого параметра рассчитаны выборочное среднее и доверительный интервал для него (для доверительной вероятности 95 %).

Статистический анализ структурных показателей флоэмы ствольной части *Betula ermanii* позволил выделить зависимые от экологических условий признаки, которые отклоняются от нормы. Ширина флоэмы, в том числе непроводящей, в стволах с ЮСГВ меньше нормы на 34-36%. Такие показатели как: удельная площадь протофлоэмных волокон и склерейд, радиальные и тангентальные размеры ситовидных трубок, общее число флоэмных лучей имеют близкие к норме значения. Показатели флоэмы ствола в условиях ЮСГВ больше нормы: ширина проводящей флоэмы – на 19%, длина члеников ситовидных трубок – на 22%, число однорядных флоэмных лучей – на 27%, удельное число кристаллов в паренхиме непроводящей флоэме – в 4,7 раза. Мы полагаем, что эта совокупность структурных признаков проводящей флоэмы, представленная увеличением размеров проводящих элементов флоэмы и их сопряженности с паренхимой, направлена на усиление проводящей способности ситовидных трубок в дальнем транспорте углерода в стволах *Betula ermanii* в специфических геохимических условиях. Таким образом, отклонения, выявленные в результате статистического анализа структурных ствольной части флоэмы *Betula ermanii* в условиях грязевого вулкана, вероятно, имеет адаптивный характер.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 15-04-04774) и в рамках государственного задания ИМГиГ ДВО РАН.

Структурный базис адаптации и функции хлорофилла *f* в фотосистеме I.

*Коджи Като**, *Тошиюки Шинода*** , *Рио Нагао**, *Фузамичи Акита**, *Наоюки Миязаки**,
*Джиан-Рен Шен**, *Татсуя Томо*** , *Аллахвердиев С.И.****

* Национальный университет Окаямы, Окаяма 700-8530, Япония.

** Токийский университет науки, Токио 162-8601, Япония.

*** Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
suleyman.allakhverdiev@gmail.com

Хлорофиллы (Хл) играют ключевую роль в улавливании и переносе энергии и разделении зарядов. Среди Хл, принимающих участие в окислительном фотосинтезе, Хл *f* принадлежит к классу молекул, длинноволновый максимум поглощения которых наиболее сдвинут в красную область спектра. Впервые Хл *f* был обнаружен у цианобактерии *Halomicronema hongdechloris*. Расположение Хл *f* в фотосистемах и его функции до конца не выяснены. В настоящей работе мы провели анализ структур, относящихся к ядру фотосистемы I (ФС I) из клеток *H. hongdechloris*, выращенных при освещении дневным (белым) или дальним красным светом, с помощью криоэлектронной микроскопии высокого разрешения. Результаты анализа показали, что поглощающая дальний красный свет ФС I связывает 83 молекулы Хл *a* и 7 молекул Хл *f*, которые располагаются на периферии этой фотосистемы, но не в цепи транспорта электронов. Появление Хл *f* хорошо коррелирует с экспрессией генов ФС I, активированных дальним красным светом. Эти результаты указывают на то, что функция Хл *f* заключается в поглощении фотонов дальнего красного света, а мутации генов существенно влияют на связывание Хл *f*.

Работа поддержана совместным грантом JSPS-RFBR, №19-54-50002.

Тандемный вектор для анализа цис-регуляторных элементов в растениях

Тюрин А.А., Кабардаева К.В., Сухорукова А.В., Фридман В.А., Голденкова-Павлова И.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева РАН, Москва 127276.
alexjofar@gmail.com

Агроинфильтрация растений уже давно стала одним из основных подходов к тестированию генов и регуляторных элементов.

Цель данного исследования – создание бирепортогого вектора, содержащего тандемную связку системы внутреннего контроля и основной экспрессионной кассеты.

Для конструирования основной плазмиды применяли СРЕС (circular polymerase extension cloning). Агроинфильтрацию 4-хнедельных растений *N.benthamiana* проводили, используя *A.tumefaciens* (GV3101). Уровни экспрессии целевых генов оценивали по флюоресценции их продуктов. Статистическую обработку данных и их визуализацию проводили, задействуя библиотеки SciPy и Matplotlib для Python.

Бирепортерный вектор rIRF разрабатывался для тестирования трансляционных цис-регуляторных элементов. Основой для тандемного вектора послужила, ранее разработанная авторами, плаزمида pVIG-T, оптимизированная для транзientной экспрессии в растениях. Система внутреннего контроля представлена геном *gfp* под контролем промотора актина арабидопсиса, целевая экспрессионная кассета включает ген *rfp* и промотор SmAM430.

Для тестирования созданного вектора в базовую плазмиду в дальнейшем были интегрированы известные трансляционные энхансеры: растительного (AT30, AT65, AT100 и AT208) и вирусного (Ω) происхождения.

Главной идеей при разработке rIRF было то, что физическое сцепление двух репортерных систем даст линейную зависимость при их трансляции. Поэтому для анализа данных флюориметрии применяли линейную регрессию. Таким образом, уровни экспрессии исследуемых конструкций выражались наклоном регрессионной прямой относительно контрольного варианта.

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ № 18-14-00026; IVG-P.

Тетранитрозильный комплекс железа с тиосульфатными лигандами предотвращает изменения жирнокислотного состава мембран митохондрий в условиях стресса

*Жигачева И.В. *, Крикунова Н.И. *, Генерозова И.П. ***

* ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук,
ул. Косыгина, 4 Москва, Россия; E-mail: zhigacheva@mail.ru

** ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.
Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
igenerezova@mail.ru

Оксид азота (NO) является сигнальной молекулой, участвующей в регуляции физиологических процессов растений на всех этапах жизненного цикла. Экзогенный NO способен улучшить устойчивость растений к абиотическим стрессам, таким как засуха, засоление, экстремальные температуры и т.д. [Nabi R.B.S. et al, 2019]. В связи с этим довольно актуальна проблема поиска экологически безопасных препаратов-доноров NO. В своей работе в качестве объекта исследования мы выбрали нитрозильный комплекс железа с тиосульфатными лигандами - натрий μ 2-дитиосульфато-тетранитразилдиферрат тетрагидрат (ТНКЖ-тио). Выбор данного донора определяется тем, что нитрозильные комплексы железа являются структурными и спектроскопическими аналогами активных центров белков, содержащих негеминовое железо $[2Fe-2S]$, найденных во всех живых организмах от бактерий до млекопитающих. При обработке растений они могут быть более физиологичными и эффективными, чем синтетические. Целью нашего исследования было изучение влияния стрессовых воздействий (дефицита воды или теплового шока) и ТНКЖ-тио на функциональное состояние митохондрий 5 дневных этиолированных проростков гороха. Тепловой шок и дефицит воды приводили к активации свободнорадикального окисления в мембранах митохондрий этиолированных проростков гороха, о чем свидетельствует 2 - 3-кратный рост интенсивности флуоресценции продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Обработка семян гороха $10^{-6}M$ препарата предотвращала активацию ПОЛ, как в условиях дефицита воды, так и в условиях теплового шока. Перекисное окисление липидов вызывало изменение жирнокислотного состава мембран митохондрий. Наиболее значительные изменения наблюдались в содержании C_{18} и C_{20} жирных кислот (ЖК). Так в условиях теплового шока индекс ненасыщенности C_{18} ЖК снизился с $1,33 \pm 0,02$ до $1,17 \pm 0,01$, в то время как $\sum C_{18}$ ненасыщенных ЖК/ $C_{18:0}$ уменьшилось на 45% (с $3,45 \pm 0,03$ до $1,96 \pm 0,02$). При этом индекс ненасыщенности C_{20} ЖК почти не изменился, хотя $\sum C_{20}$ ненасыщенных ЖК/ $C_{20:0}$ возросло с $4,48 \pm 0,04$ до $6,56 \pm 0,02$. Этот рост обусловлен резким увеличением содержания эйкозодиеновой кислоты в липидах мембран митохондрий проростков, подвергнутых тепловому шоку. В условиях недостаточного увлажнения индекс ненасыщенности C_{18} ЖК почти не изменялся, а соотношение $\sum C_{18}$ ненасыщенных ЖК/ $C_{18:0}$ сократилось в 1,8 раза. Это снижение связано с 40% увеличением содержания стеариновой кислоты в липидах мембран митохондрий. При этом индекс ненасыщенности C_{20} ЖК уменьшился с $0,087 \pm 0,005$ до $0,013 \pm 0,003$ и $\sum C_{20}$ ненасыщенных ЖК/ $C_{20:0}$ сократилось на 11%.

Таким образом, в условиях дефицита воды более значительные изменения происходили в содержании ЖК с 20 атомами углерода, в то время как в условиях теплового шока заметные изменения происходили в содержании C_{18} ЖК.

Обработка семян гороха $10^{-6}M$ препарата предотвращала изменения жирнокислотного состава мембран митохондрий, как в условиях дефицита воды, так и в условиях теплового стресса. Предупреждая изменения в составе ЖК мембран митохондрий, препарат оказывал влияние и на физиологические характеристики, а именно на ростовые процессы. Дефицит воды тормозил рост проростков, что согласуется с данными литературы [Okçu G. et al., 2005]. Обработка семян гороха ТНКЖ-тио в этих условиях стимулировала рост корней проростков почти в 5 раз. При этом они были в 1,7 раза длиннее, чему у контрольных образцов, что имеет значение в повышении устойчивости растений в условиях дефицита воды.

Антистрессовые свойства нитрозильного комплекса железа с тиосульфатными лигандами (ТНКЖ-тио), по-видимому, обусловлены тем, что он является донором NO и определяется антиоксидантной активностью оксида азота, что подтверждается данными по сравнению антиоксидантных свойств ТНКЖ-тио с антиоксидантными свойствами растворенного в воде в таких же условиях NO [Смолина А.В. и др., 2019]. Предотвращая перекисное окисление липидов, препарат сохраняет пул C_{18} и C_{20} ненасыщенных жирных кислот в мембранах митохондрий, вероятно, способствуя поддержанию функционального состояния этих органелл, и таким образом, содействуя сохранению энергетического метаболизма клетки в условиях стресса.

Использованная литература.

Nabi R. B. S., Tayade R., Hussain A. et al. *Envir. Exper. Bot.* 2019. V. 161. P. 120-133.

Okçu G., Kaya M.D., Atak M. *Turk J Agric For.* 2005. V.29. P. 237-242.

Смолина А. В., Полетаева Д. А., Солдатова Ю. В. и др. *ДАН.* 2019. Т. 488 (5). С. 571-575.

Трансгенные растения томата в фиторемедиации

Вершинина З.Р., Хакимова Л.Р., Садыкова Л.Р.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Проспект октября 71, Уфа, Россия.
zilyaver@mail.ru

В настоящее время все более актуальной становится проблема загрязнения почв тяжелыми металлами, которые токсичны для всех живых организмов и вызывают тяжелые заболевания животных и человека. Одним из наиболее безопасных методов очистки загрязненных территорий является фиторемедиация. Главной задачей в фиторемедиации почв является поиск растений-гипераккумуляторов, которые способны накапливать большие концентрации тяжелых металлов. Для повышения фиторемедиационной эффективности подобных растений целесообразна их трансформация генами, кодирующими синтез металлсвязывающих пептидов. Обусловлено это тем, что при воздействии тяжелых металлов на растения начинают синтезироваться особые небольшого размера пептиды, которые выполняют строго определенные функции, связывая ионы металлов и транспортируя их к месту назначения. Одними из таких металлсвязывающих пептидов являются фитохелатины. Первичная структура фитохелатинов представляет собой небольшой, богатый цистеином пептид, способный связывать ионы тяжелых металлов через SH-группы. Кроме того, фитохелатины характеризуются наличием γ -пептидной связи, что усложняет их биосинтез в клетках. Ранее уже проводились эксперименты с химически синтезированными генами, кодирующими аналоги природных фитохелатинов с α -пептидной связью (псевдофитохелатины, *pph*), что позволяло им синтезироваться с участием рибосомного аппарата клетки. Детальные эксперименты показали, что эти пептиды связывают различные металлы так же, как и природные фитохелатины и нарабатываются в клетках в большем количестве.

Томат (*Solanum lycopersicum* L.) является одной из важнейших овощных культур в сельском хозяйстве многих стран. В связи с распространением загрязнения почв ТМ, в последние годы стали популярны исследования, посвященные накоплению ТМ в растениях томата, защите данной культуры от ТМ, а также потенциальному использованию томатов к фиторемедиации, в том числе совместно с бактериями или грибами - микросимбионтами. В данной работе были получены растения томата сорта Грунтовый Грибовский 1180, трансформированные искусственно синтезированным геном *pphb*, собранным из комплементарных блоков 5'ATGGAATGCGAATGTGAGTGCGAGTGCGAGTGCGAATGTGGCTAA3' и 5'TTAGCCACATTCGCACTCGCACTCGCACTCACATTCGCATTCCAT3'. После сшивки данных блоков, последовательность была клонирована в вектор для трансформации растений pCambia 1301 под регуляцией 35S промотора вируса мозаики цветной капусты и дополнительной последовательностью 6His. В дальнейшем полученная генно-инженерная конструкция была использована для трансформации растений томата с помощью бактерий *Agrobacterium tumefaciens* AGL0.

Для обнаружения пептида были использованы поликлональные мышиные антитела к 6His (Abscam, Великобритания). В качестве вторичных были использованы антитела козы против мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена HRP (Abscam, Великобритания). В качестве хромогена для диагностики был использован DAB (Cell Marque Corporation, США). **Эффективность трансформации растений составила 2%.**

Было выявлено, что продукт гена *pphb* повышает устойчивость растений к тяжелым металлам. В среднем на 20% повышалась сухая биомасса трансгенных растений при воздействии 100 мкМ Cd^{2+} и на 15% при воздействии 100 мкМ Ni^{2+} по сравнению с контрольными растениями. В дальнейшем планируется измерить содержание Cd^{2+} и Ni^{2+} в трансгенных растениях, чтобы сделать вывод о целесообразности использования *pphb* для повышения фиторемедиационной эффективности растений томата.

Работа была выполнена в рамках госзадания (тема № АААА-А16-116020350028-4) при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований №18-34-00033 мол_а.

Трансгенный табак с геном синтеза холиноксидазы приобретает повышенную толерантность к NaCl

Ралдугина Г.Н. , Евсюков С.В.* , Еилджи М.* , Алиихи А.* , Бурмистрова Н.А.* , Лунькова Н.Ф.* ,
Богоутдинова Л.Р.** , Карпычев И.В.* , Гулевич А.А.** , Баранова Е.Н.***

* Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.

** Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии,
Москва, Тимирязевская 42, Москва, Россия.
raldugina42@mail.ru

Повышение температуры на Земле приводит к ежегодному изменению уровня влагообеспечения и возрастанию воздействия абиотических стрессовых факторов, таких как засуха, засоление, резких температурных колебаний, включая кратковременные заморозки. Это приводит к смещению сроков развития растений, увеличению длительности стадий онтогенеза, и, в конечном счете, к падению урожайности. В настоящее время все больше культурных растений должны обладать устойчивостью к высокому осмотическому давлению почвенного раствора, характерному для недостатка влаги, быть способными к экономному потреблению воды, и вынужденному использованию засоленных почв в результате вторичного засоления или недостатка пресной воды. Проблема становится все более актуальной, так как затрагивает все новые и новые территории наиболее плодородных земель.

Несмотря на глобальные достижения зеленой революции, селекция растений в настоящее время столкнулась с ограничениями в дальнейшем увеличении продуктивности и повышении устойчивости традиционными методами. Между тем, диапазон использования еще пока что не выявленных генетических ресурсов растений далеко не исчерпан и все так же далек от оптимальной организации, как и тысячелетия назад. Простой и сложный отборы исчерпали лимит роста, однако у растений есть обширный скрытый потенциал запуска и регуляции механизмов, устойчиво обеспечивающих существование видов, произрастающих в экстремальных условиях, и возможно, утраченных или замолчавших у видов, длительное время культивированных в оптимальных условиях или использующих другие альтернативные модели защиты от стрессовых воздействий. Одним из эффективнейших и распространенных механизмов защиты от засухи и высокого содержания солей является увеличение и регуляция синтеза осмопротектантов (осмолитов). Одним из наиболее перспективных соединений такого типа наравне с пролином, является четвертичный амин, продуцируемый из холина рядом ферментов – глицинбетаин. Генетически детерминированный механизм ферментативной регуляции встречается практически у всех видов, однако биосинтез глицинбетаина наиболее эффективно приурочен к пластидному компартменту клетки, и у многих растений он, так или иначе, выражен весьма слабо.

Для изучения эффективности защиты от стресс-индуцированных повреждений мы создали конструкцию с полусинтетическим геном холиноксидазы, способствующую одноступенчатому процессу преобразования холина в глицинбетаин, в отличие от природно имеющейся у растений двухступенчатой системы синтеза. Снабженный сигнальной последовательностью фермент доставляется в пластиду и запускает процесс, приводящий к увеличению осмотического давления. Полученные в результате агробактериальной трансформации растения табака сорта Самсун были подвергнуты действию модельного 24-суточного засоления в водной культуре раствора Хогланда с добавлением 200 мМ NaCl. Если в норме исходные и трансгенные растения незначительно отличались по содержанию влаги, то при действии соли ожидаемо происходила потеря части воды, более выраженная у контрольной (исходной) линии. Этот процесс сопровождался уменьшением устьичной щели, тогда как у контрольных растений она была несколько больших размеров. У контрольных растений NaCl вызывал уменьшение содержания хлорофиллов а и b, в то время как у трансгенных растений количество этих хлорофиллов при воздействии соли не менялось или менялось незначительно. Интересно, что процесс действия хлоридного засоления сопровождался резким увеличением содержания пролина у контрольной линии, но практически не отмечен у трансгенных линий с внедренным геном холиноксидазы. Кроме того, характерный ответ в виде увеличения активности СОД, отмеченный у контрольных растений в ответ на соль, у трансгенов не отмечается, что вызвано, вероятно, и так повышенным уровнем активности этой группы ферментов почти до стрессового. Активность пероксидазы при этом двукратно возрастает у контрольной линии при действии засоления, в то время как трансгенные линии не показывают увеличения активности, как без воздействия, так и при культивировании с добавлением NaCl. В связи с этим остается не ясным совпадение в паттерне увеличения перекисного окисления липидов у всех исследованных растений как исходных, так и трансгенных.

В целом можно ожидать, что трансгенные растения с увеличенным пулом глицинбетаина будут демонстрировать большую устойчивость к засолению и в условиях полевых испытаний. Однако сохранение продуктивности и механизм обеспечения толерантности еще предстоит оценить.

Работа выполнена в рамках проекта РФФИ (грант 19-016-00207) и при частичной финансовой поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 0574-2019-002 и № АААА-А19-119080690056-3).

Транскрипционные факторы-стимуляторы соматического эмбриогенеза у *Medicago truncatula*

Творогова В.Е., Красноперова Е.Ю., Кудряшов А.А., Балтин С.М., Поценковская Э.А., Лутова Л.А.

Санкт-Петербургский Государственный Университет.
Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, Россия.
krubaza@mail.ru

Поиск регуляторов соматического эмбриогенеза является актуальной задачей биотехнологии растений, поскольку открывает новые возможности разработки протоколов трансформации и микрочлонального размножения видов и сортов растений с низкой способностью к регенерации. Наши исследования посвящены изучению транскрипционных факторов, регулирующих соматический эмбриогенез, на модельном объекте *Medicago truncatula*.

В предыдущих исследованиях мы показали, что сверхэкспрессия гена *MtWOX9-1*, кодирующего транскрипционный фактор из семейства *WOX*, приводит к увеличению способностей к соматическому эмбриогенезу у высокоэмбриогенной линии R-108 *Medicago truncatula*. В настоящей работе мы оценили регенеративные способности линии 108-1, предковой по отношению к линии R-108. Каллусы линии 108-1 в наших условиях культивирования не способны к соматическому эмбриогенезу, в то время как каллусы линии R-108 в аналогичных условиях формируют соматические эмбрионы в 100% случаев. Тем не менее, трансформация эксплантов 108-1 конструкцией для сверхэкспрессии *MtWOX9-1* сделала возможным прохождение соматического эмбриогенеза даже у данной неэмбриогенной линии. Эти данные позволяют предположить, что транскрипционный фактор *MtWOX9-1* способен не только количественно, но и качественно изменять регенеративные способности *Medicago truncatula*. Нашим следующим шагом будет попытка улучшения способностей к соматическому эмбриогенезу у других видов бобовых с помощью *MtWOX9-1* или его гомологов.

Поиск регуляторов соматического эмбриогенеза среди других генов семейства *WOX* показал, что трансформация листовых эксплантов люцерны конструкцией для сверхэкспрессии гена *MtWOX2* в некоторых случаях приводит к развитию из эксплантов каллусов увеличенного размера, которые, вероятно, вследствие этого образуют больше соматических эмбрионов. В следующих экспериментах мы также планируем сочетать сверхэкспрессию *MtWOX2* и *MtWOX9-1* для усиления их стимулирующего эффекта на регенерацию у *Medicago truncatula* и других видов бобовых.

Работа поддержана грантами РНФ 16-16-10011 и РФФИ 20-016-00124.

Трансмембранный поток воды через аквапорины в условиях разрушения тубулинового цитоскелета у *Solanum tuberosum*

Пузина Т.И., Макеева И.Ю., Щелкунова Ю.В.

Орловский государственный университет имени И.С.Тургенева. Комсомольская, 95, Орёл, Россия.
tipuzina@gmail.com

Элементы цитоскелета через ассоциированные белки образуют с мембранами цитоскелет-мембранный континуум. Поэтому структурное состояние цитоскелета должно быть важным условием для протекания мембранных процессов. Использование антискелетных агентов является фармакологическим стрессом, вызывающим образование активных форм кислорода, которые повреждают мембраны. Роль цитоскелета в регуляции трансмембранного потока воды является малоисследованной областью клеточной физиологии. Транспорт молекул воды через клеточные мембраны осуществляется как путём диффузии через липидный бислой, так и через водные каналы – аквапорины. Цель исследования заключалась в изучении транспорта воды через аквапорины в зависимости от структурного состояния тубулинового цитоскелета и влияния кофейной кислоты на данный процесс у *Solanum tuberosum*. Растения картофеля сорта Жуковский ранний выращивали в почвенной культуре в условиях вегетационного домика на агробиостанции Орловского госуниверситета. Обработку растений путём опрыскивания проводили через 15 суток после появления всходов 1 мМ раствором оризалина – деполимеризатора микротрубочек, 0.1 мМ раствором кофейной кислоты, а также совместно оризалином и кофейной кислотой в указанных концентрациях. Ранее на растениях картофеля нами было установлено, что кофейная кислота, относящаяся к фенилпропаноидам обладает антиоксидантными свойствами. Контрольные растения опрыскивали водой. Исследовали листья седьмого яруса срединной формации через семь суток после обработки растений. В качестве ингибиторов, блокирующих работу аквапориновых белков, использовали 0.1 мМ растворы хлорида ртути или азотнокислого серебра. Выявлено существенное ингибирование под влиянием $HgCl_2$ поступления воды через аквапорины в варианте с оризалином. Оно составило 60%, тогда как в контрольном варианте, где микротрубочки оставались целостными – 40%. Обогащение растений кофейной кислотой сдерживало торможение поступления воды через водные каналы под воздействием $HgCl_2$ по сравнению с контролем в 1.6 раза (процент ингибирования был равен 25%). Важно, что и в условиях разрушения микротрубочек, кофейная кислота на 29% уменьшила отрицательное действие оризалина на поступление воды через аквапорины (вариант оризалин+кофейная кислота). Закономерность в действии оризалина и кофейной кислоты при использовании $AgNO_3$ в качестве блокатора водных каналов была аналогична влиянию $HgCl_2$, однако эффект был менее выражен. Отрицательное действие разрушения микротрубочек на поступление воды через аквапорины может быть связано с нарушением транспорта белков аквапоринов и их встраивания в мембраны. В литературе имеются сведения, что микротрубочки и микрофиламенты участвуют в этих процессах. Транспорт воды через аквапорины зависит не только от их количества, но и от их активности, то есть открытости. Использование 0.1 мМ NaF, ингибитора фосфатазы, которая гидролизует сложно-эфирные связи в аквапоринах показало, что кофейная кислота повышает активность водных каналов мембран на 22% против контроля. В то же время, в условиях разрушения микротрубочек активность водных каналов была минимальной и составила 25%, тогда как в контроле – 67.4%. При совместном действии с оризалином кофейная кислота значительно повысила транспорт воды через фосфорилированные аквапорины. Таким образом, разрушение тубулинового цитоскелета снижает поток воды через аквапорины, кофейная кислота в этих условиях стабилизирует данный процесс.

Удвоенная атмосферная концентрация CO₂ смягчает негативное воздействие водного стресса на фотосинтез *Pisum sativum*

Воронин П.Ю., Маевская С.Н., Николаева М.К., Малиновский А.В.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
pavel@ippras.ru

Увеличение концентрации CO₂ атмосферы является одним из ведущих факторов современного быстрого изменения климата. В естественных условиях растение обычно встречается с комплексом неблагоприятных факторов. Поэтому оценка воздействия на растения удвоенной концентрации CO₂ как сама по себе, так и на фоне какого-либо традиционного в современных условиях стрессового фактора представляет научный и практический интерес. На примере C₃ вида *Pisum sativum* изучен физиологический и молекулярный ответы фотосинтетического аппарата растения на засуху в условиях повышенной концентрации атмосферной CO₂. В работе, выполненной в 2019 г, изучали влияния засухи при обычной и удвоенной атмосферной концентрации CO₂. Функцию фотосинтетического аппарата характеризовали величиной водного потенциала апопласта клеток мезофилла в подустьичной полости, активностью CO₂/H₂O-газообмена, содержанием углеводов, пролина, МДА и пигментов в листьях проростков гороха в контроле (63% от полной влагоёмкости почвы) и в опыте (3-х дневная засуха, 16% от полной влагоёмкости почвы). Водный потенциал апопласта подустьичной полости листа (Ψ_a) растений после 3-дневной засухи существенно зависел от атмосферной концентрации CO₂, при которой происходило выращивание растений. В листьях опытных растений скорость развития водного стресса замедлялась. После 3-дневной засухи величина водного потенциала апопласта Ψ_a листьев опытных растений, выращиваемых при повышенной концентрации CO₂, не отличалась от величины Ψ_a контрольных растений. В условиях засухи одновременно с накоплением растворимых сахаров в листьях опытных растений гороха увеличилось содержание пролина. После 3-х дневной засухи накопление МДА при атмосферной концентрации CO₂ в листьях опытных растений было на 40 % выше, чем при повышенной концентрации CO₂. Это показывает, что повышенная концентрация CO₂ в листьях опытных растений снижает повреждающее действие АФК, вызванное засухой, и оказывает защитный эффект. Засуха практически не повлияла на содержание хлорофилла и каротиноидов в листьях растений, подвергнутых засухе при атмосферной и повышенной концентрации CO₂, что свидетельствует об устойчивости систем синтеза пигментов в листьях на начальной стадии негативного действия засухи. Содержание редуцирующих сахаров в листьях опытных растений при атмосферной концентрации CO₂ превысило контрольный вариант на 256 %. В то же время повышенная концентрация CO₂ в опыте оказала незначительное влияние на их накопление (113 %). После 3-дневной засухи отмечено повышение содержания растворимых сахаров (сахароза + редуцирующие сахара) в листьях растений, выращиваемых как при атмосферной, так и при повышенной концентрации CO₂. Негативное влияние засухи на рост и развитие растений проявилось в 2.4 кратном снижении фотосинтеза, в 3-х кратном – транспирации листа у растений, выращиваемых при обычной концентрации CO₂. Растения, выращиваемые при удвоенной концентрации CO₂, страдали от засухи меньше. Их фотосинтетический CO₂ газообмен снизился в 1.8 раза, а транспирация только в 2.3 раза. По общему содержанию растворимых сахаров между собой листья опытных вариантов не отличались. Однако накопление редуцирующих сахаров в листьях растений, выращенных при атмосферной концентрации CO₂, значительно превышало их содержание в листьях растений, выращиваемых при повышенной концентрации CO₂. Снижение водного потенциала апопласта (Ψ_a) следовало за накоплением редуцирующих сахаров в листе. Поэтому, полученные данные свидетельствуют о том, что накопление редуцирующих сахаров специфично для формирования концентрационного градиента осмолитов между внутриклеточным компартментом и апопластами, а сахарозы - не специфично. Вероятно, увеличение содержания сахарозы в листьях растений, выращиваемых при удвоенной концентрации CO₂, по сравнению с растениями, выращиваемыми при обычной концентрации CO₂, отражает сравнительно большие экспортные возможности их листьев и большее поддержание связности донорно-акцепторных отношений растения в целом после 3-х дневной засухи. Растения, выращиваемые при удвоенной концентрации CO₂, меньше страдали от засухи, по сравнению с растениями, выращиваемыми при обычной концентрации CO₂. Увеличенная атмосферная концентрация CO₂ смягчала действие засухи. В пользу этого вывода свидетельствуют данные о меньшем накоплении редуцирующих сахаров (113 %), пролина (133 %) и МДА (148 %) в листьях растений, выращиваемых при удвоенной концентрации CO₂, по сравнению с вариантом выращивания при обычной атмосферной концентрации CO₂.

Универсальные стрессовые белки и их партнеры в регуляции прорастания *Arabidopsis thaliana*

Горшкова Д.С.* **, Пожидаева Е.С.*

* Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.

** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. Ленинские горы, 1, Москва, Россия.
stanisa-2002@yandex.ru

Универсальные стрессовые белки (Universal Stress Proteins, USP) были впервые описаны у прокариот в условиях абиотического стресса. USP-белки способны к связыванию и/или гидролизу адениловых нуклеотидов, к участию в белок-белковых взаимодействиях и в каскадах фосфорилирования. Это указывает на возможную регуляторную функцию белков данной группы.

Гомологи USP-белков широко представлены у растений. В настоящее время большинство исследований предполагает участие USP-подобных белков в формировании стрессоустойчивости. Однако нами ранее был описан представитель этого семейства у *Arabidopsis thaliana*, кодируемый геном *At3g58450*, с уникальной для этого семейства функцией фитогормон-зависимой регуляции покоя семени и его прорастания.

Свойства USP-домена предполагают наличие у белков этого семейства молекулярных партнеров. Согласно базе данных IntAct (<https://www.ebi.ac.uk/intact/>), основанной на результатах исследований белок-белкового взаимодействия методом двугибридного дрожжевого анализа, для белка AT3G58450 показано наличие потенциальных партнеров, также принадлежащих к семейству USP и кодируемых генами *At3g11930* и *At2g47710*. Последовательности этих белков содержат все характерные для USP-домена консервативные аминокислотные остатки и элементы вторичной структуры. Более того, эти белки являются ближайшими гомологами AT3G58450 и образуют вместе с ним отдельный кластер на филогенетическом древе всех USP-подобных белков *A. thaliana*. При этом белки AT3G58450 и AT3G11930 взаимодействуют только с AT2G47710, в то время как AT2G47710 имеет ряд других потенциальных партнеров, среди которых ферменты углеродного метаболизма и регуляторные белки, участвующие в передаче фитогормональных сигналов и в посттрансляционной модификации белков. Это является косвенным свидетельством важной роли белка AT2G47710 в USP-зависимой регуляции биологических процессов. Кроме того, профиль экспрессии гена *At3g11930* сходен с профилем экспрессии гена *At3g58450* с максимумом в сухих семенах, в то время как *At2g47710* экспрессируется на всех стадиях развития с максимумом в репродуктивных органах.

Поскольку ранее нами было показано участие AT3G58450 в регуляции прорастания семени, опосредованное фитогормонами абсцизовой кислотой (АБК) и гиббереллинами (ГК), мы проанализировали роль его потенциальных партнеров при прорастании в аналогичных условиях. Нами были охарактеризованы инсерционные линии, содержащие вставки Т-ДНК в генах *At3g11930* и *At2g47710*, при прорастании в присутствии АБК, ГК и ингибитора биосинтеза ГК паклобутразола. Однако в отличие от линии со сниженной экспрессией *At3g58450*, никаких отличий от дикого типа не было выявлено при прорастании этих линий в указанных условиях. Отсутствие фенотипических различий в данной модельной системе может свидетельствовать: а) об иной роли исследуемых белков, не связанной с АБК/ГК-зависимой регуляцией прорастания, при этом потенциальное взаимодействие с AT3G58450 может происходить в других процессах регуляции онтогенеза *Arabidopsis*; б) о функциональной взаимозаменяемости белков AT3G11930 и AT2G47710, в отличие от AT3G58450. Ответ на эти вопросы будет целью дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ «Аспиранты» №19-34-90017.

Устойчивость сортов персика к стрессовым факторам юга России

Абильфазова Ю.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Субтропический научный центр Российской академии наук» Россия, 354002 г. Сочи, ул. Яна Фабрициуса 2/28.
Citrus_Sochi@mail.ru

Персик – одна из ценнейших и перспективных культур с достоинствами: высокая продуктивность, скороплодность, крупный размер плодов, их красота и неповторимый вкус – делают необходимым его возделывание на юге России, но из-за возможности подмерзания в зимне-весенний период, прохладных и ливневых дождей весной, длительной летней засухи часто не реализуется его природный потенциал, как культуры. Во влажных субтропиках у стандартных сортов персика сроки созревания плодов ограничены всего лишь двумя месяцами (середина июня – конец августа), отсутствуют сверхранние и поздние сорта, крупноплодные нектарины, сорта консервного типа. Для создания форм с повышенной устойчивостью к биотическим и абиотическим факторам необходимо обновление коллекции разнообразным материалом из очагов естественного произрастания (Китай, Персия, Иран), а также привлечение как местной селекции, так и из республик Закавказья, Дагестана, Средней Азии с учетом природно-климатических условий.

Цель исследования: выявить наиболее устойчивые сорта персика к абиотическим факторам среды, обладающих стабильной урожайностью и высокими вкусовыми качествами.

Методы и объекты исследований

Коллекционное изучение сортообразцов проводится в соответствии с Программой и методикой сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур /Под ред. Н.Е. Седова, Г.П. Огольцовой. – Орел. ВНИИСПК. – 1999 – 608 с. Опыт заложен в открытом грунте на плантации ФИЦ СЦ РАН с площадью участка 0,5 га на высоте 50 – 70 м над уровнем моря. Схема посадки 5×2 м, 2004–2009 гг. закладки, с V-образной кроной. Физиолого-биохимические анализы проводятся в лаборатории физиологии и биохимии растений классическими методами: определение водного дефицита листьев персика; оводненность тканей листа; толщина листьев - экспресс-методом диагностики. Объектами изучения являются физиологически однородно вызревшие листья персика. Уникальность региона с нестабильностью погодных условий всегда привлекает исследователей для изучения культурных растений, в том числе и персик, выращиваемый во влажных субтропиках Краснодарского края. Для изучения физиолого-биохимических особенностей представлены интродуцированные сорта персика: Мэйкрест (*Mjejkrest*), Диксиред (*Diksired*), *Cezarini*, *Bolero*, *San Varana*, *Venus*, Файэт (*Fayette*), Редхавен (*Redhaven*) – контроль.

Результаты и обсуждение

Субтропическая зона Краснодарского края располагает большим разнообразием произрастающих культурных растений (тропические, субтропические, косточковые и т.д.), среди которых привлекает особое внимание из косточковых – персик. Благодаря высоким пищевым, лекарственным и декоративным особенностям персик заслуживает, чтобы его распространение было более масштабным в районах с наиболее благоприятными почвенно-климатическими условиями, которые способствовали бы его нормальному росту и плодоношению.

Исследованиями установлено, что растения персика ежегодно оказываются в экстремальных условиях из-за длительного отсутствия осадков (2,0–2,5 месяцев) и засухи (конец июня–август), что впоследствии отражается на функциональном состоянии растений (роста, развития и плодоношения). В период воздействия стрессоров у наиболее устойчивых сортов Файэт, Мэйкрест и *Bolero* водный дефицит в среднем составил 12,30 – 14,00 %, у менее устойчивых – *Cezarini*, *San Varana* и *Venus* он находился на уровне 15,74–16,44 %, что превышало в 1,3 раза контрольный вариант Редхавен. Высокая оводненность тканей листа была установлена у сортов Редхавен, Мэйкрест и Файэт (65,12–68,06 %), низкая – у *Cezarini*, *San Varana* и *Venus*, что в сравнении с контролем оказалась значительно ниже в 1,2–2,9 раза. Отмечена максимальная толщина листовых пластинок у сортов *Bolero*, Мэйкрест, Редхавен и Файэт (0,16–0,19 мм), что подтверждает наименьшую потерю тургора листьями персика и высокую устойчивость к дестабилизации погодных условий субтропиков России. Минимальная толщина листьев персика установлена у сортов *Cezarini*, *San Varana* и *Venus* (0,12–0,14 мм), что свидетельствует о низкой устойчивости указанных сортов к засухе влажных субтропиков России.

Выводы. Результатами полученных данных установлено, что физиолого-биохимические показатели водного дефицита, оводненности тканей и толщины листа находятся в тесной зависимости с устойчивостью растений к неблагоприятным факторам влажных субтропиков России, и что эти величины можно использовать в качестве диагностических критериев в оценке адаптивного потенциала разных сортов персика при интродукции, а также в селекционной работе.

Публикация подготовлена в рамках реализации ГЗ ФИЦ СЦ РАН № 0492-2021-0008 и № 0492-2021-0007.

Устойчивость ярового ячменя к абиотическим стрессам

Быковская И.А., Осипова Л.В., Курносова Т.Л.

ФГБНУ «Всероссийский НИИ агрохимии имени Д.Н. Прянишникова». 127550,
ул. Прянишникова, д.31А, Москва, Россия.
bykovskaya_irina@bk.ru

В современных условиях погодно-климатических изменений, устойчивость полевых культур является важнейшим фактором, определяющим зерновую продуктивность.

У сортов ярового ячменя определяли поглотительную способность корневой системы используя метод изотопной индикации. Низкие дозы меченого азота (^{15}N) добавляли в среду культивирования, при проращивании семян в лабораторных экспериментах и в критический период закладки зачаточного колоса главного побега в вегетационных опытах. Скорость поступления ^{15}N в растения оценивали при действии стрессоров, индуцированных засухой и алюминиевой токсичностью. Интенсивность поглощения ^{15}N корневой системой сорта использовали, как индикатор стрессовой нагрузки и эффективности применения агрохимических приемов, снижающих её негативное влияние на рост, развитие и продуктивность ячменя. Сортоспецифику устойчивости оценивали по пороговой концентрации стрессоров, прекращающей поступление ^{15}N в растения.

Установлены оптимальные концентрации биогенных элементов селена и кремния для предпосевной обработки семян, повышающее реализацию адаптивного потенциала сортов ячменя.

Участие TOR/S6K1 сигнальной системы в регуляции экспрессии генов α -амилазы и прорастание зерна пшеницы

Бисенбаев А.К., Алыбаев С.Д., Смекенов И.Т., Кольбаева Г.А.

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, 050040, пр. Аль-Фараби 71, Алматы, Казахстан.
amangeldy.bisenbaev@kaznu.kz

Известно, что прорастание зерна и ранние стадии роста зародыша являются существенными условиями для инициации нового жизненного цикла растений. Прорастание зерна требует координацию роста клеток за счет регуляции анаболических и катаболических процессов, включая мобилизацию запасных питательных веществ эндосперма. На ранней стадии прорастания гибберелловая кислота (ГК) активирует транскрипционный фактор GAMYB в клетках алейронового слоя и эпителия щитка эмбриона, способствуя *de novo* синтезу и секреции изоформ α -амилазы. α -Амилаза катализирует гидролиз запасенного крахмала эндосперма до простых сахаров, обеспечивая тем самым питание зародыша для активного роста и деления клеток. Сбои в молекулярной сигнализации во время мобилизации эндосперма могут стать причиной не только пониженной продуктивности сеянца, но и значительных потерь урожая в предуборочный период. TOR киназа (target of rapamycin) - это серин/треониновая протеинкиназа, которая была открыта как мишень действия антибиотика рапамицина, обнаруженная у всех эукариот, начиная от дрожжей и заканчивая человеком. В настоящее время TOR сигнальная система рассматривается как один из важнейших регуляторных белков, находящихся на пересечении разных сигнальных путей, контролирующих большое количество метаболических процессов. Известно, что рапамицин, высокоспецифичный аллостерический ингибитор TOR, эффективен в клетках дрожжей и животных, но неэффективен для большинства высших растений, вероятно, из-за структурных различий в повсеместно распространенном рецепторе рапамицина FKBP12. Однако, показано, что кукуруза (*Zea mays*) и томаты (*Solanum lycopersicum*) чувствительны к рапамицину. Можно предположить, что чувствительность растений к рапамицину зависит от вида, и необходимы более подробные исследования, чтобы определить, почему растения проявляют разные реакции на рапамицин.

В настоящей работе рапамицин в дозе 0.1–1.0 μ M вызывал относительно слабое ингибирование прорастания зерна. Значительное замедление появления корешков наблюдалось в присутствии 5 и 10 μ M рапамицина через 2 дня. Хотя семена, обработанные рапамицином, прорастали через 4 дня, мы наблюдали сильное замедление роста проростков в присутствии 10 μ M рапамицина, что привело к значительному снижению сырой массы проростков, а также длины корней и побегов ($P < 0,01$). Мы обнаружили, что подавляющий эффект АТФ-конкурентного ингибитора торин1 на прорастание зерна пшеницы был более сильным по сравнению с эффектами рапамицина. В присутствии 5 μ M торин1 наблюдалось существенное уменьшение длины побега (91%) и длины корня (86,76%) по сравнению с контролем. Рапамицин и торин1 значительно тормозили эффект ГК на экспрессию генов α -амилазы и GAMYB. При этом, ингибиторы TOR не влияют на экспрессию зависимого от абсцизовой кислоты гена ABI5. Наиболее изученная мишень TOR сигнальной системы – серин/треониновая протеинкиназа p70-S6 киназа 1 (S6K1). Уровень фосфорилирования этого белка является индикатором активности TORC1 комплекса в клетках. Нами показано, что в ходе прорастания зерна ГК индуцирует фосфорилирование S6K1 пшеницы (TaS6K1) по серину в положении 467 (S467) в гидрофобном мотиве. Более того, фосфорилирование TaS6K1 по S467 зависело от TaTOR киназы и ингибировалось рапамицином и торинином1. Показано, что ингибитор биосинтеза гиббереллина (паклбутразол) блокирует не только экспрессию гена α -амилазы, но и фосфорилирование TaS6K1 в зародышах пшеницы.

Таким образом, можно предположить, что в клетках зародыша пшеницы действие ГК прямо или косвенно может опосредовать активацию TOR киназы, запуская фосфорилирование TaS6K1 по TOR-специфическому остатку S467 в гидрофобном мотиве, что способствует индукции синтеза α -амилазы и, следовательно, последующему росту проростков.

Участие белка мембранных нанодоменов AtFlot1 (At5g25250) в везикулярном трафике H⁺-АТФазы плазмалеммы и Na⁺-гомеостатировании клеток *Arabidopsis thaliana* в условиях солевого стресса

Сергиенко О.В., Халилова Л.А., Карпычев И.В., Мясоедов Н.А., Балнокин Ю.В.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
balnokin@mail.ru

Через микро-/нанодомен (НД)-зависимый эндоцитозный путь белок AtFlot1 вовлечен в регуляцию интегральных белков плазмалеммы (ПМ) (Li et al., 2011; Nao et al., 2014) и этим вносит вклад в устойчивость растений к стрессовым факторам среды. В настоящей работе исследовали участие AtFlot1 (AT5G25250.1/FLOTILLIN) в везикулярном трафике H⁺-АТФазы Р-типа *A. thaliana*. О предполагаемом участии Flot1 в трафике H⁺-АТФазы судили по различиям в ее относительном содержании в ПМ, выделенной из органов растений *A. thaliana* Col-0 дикого типа (ДТ) и мутантов по гену *AtFlot1*: мутанта GK-467G04 с повышенной экспрессией *AtFlot1* в корнях (*Atflot1_{ns}*) и нокаут-мутанта SALK_205125C (*Atflot1_{нок}*). О предполагаемом вовлечении везикулярного трафика в ионное гомеостатирование и процессы, ответственные за солеустойчивость растений, судили, сопоставляя влияние NaCl (100 мМ, 12 часов) на относительное содержание H⁺-АТФазы в ПМ и способность растений поддерживать Na⁺, K⁺-гомеостаз и рост в условиях засоления. Препараты ПМ из корней и листьев растений разных генотипов, выращенных на средах, содержащих или не содержащих NaCl, получали методом разделения мембран в двухфазной системе полимеров (Трофимова с соавт., 2011). Относительное содержание H⁺-АТФазы Р-типа в ПМ оценивали с помощью вестерн-блот анализа с поликлональными антителами к H⁺-АТФазе (*Agrisera*, Швеция) по интенсивности иммуно-реактивных полос на блотах. Мутант с повышенной экспрессией гена *AtFlot1* в корнях (*Atflot1_{ns}*) обнаружил более устойчивый к засолению фенотип (более интенсивный в условиях засоления рост, более низкое содержание Na⁺ и более высокое содержание K⁺ в органах по сравнению с ДТ). Ростовые характеристики, а также содержание Na⁺ и K⁺ в органах у *Atflot1_{нок}* практически не отличались от таковых растений ДТ, как в нормальных условиях, так и в условиях засоления среды. При отсутствии NaCl в среде (контроль) обе мутации привели в корнях к одному и тому же эффекту, а именно к существенному (в 5–7 раз) увеличению содержания H⁺-АТФазы в ПМ по сравнению с таковым у ДТ. Внесение NaCl в среду и в том, и в другом случае привело к снижению содержания H⁺-АТФазы в ПМ до уровней контрольных вариантов ДТ. В листьях при отсутствии NaCl в среде эффекты двух мутаций различались. Мутация *flot1_{ns}* практически не оказала влияния на содержание H⁺-АТФазы в ПМ, тогда как мутация *flot1_{нок}* привела в существенному увеличению содержания этого белка в ПМ. Добавление NaCl к среде вызвало в ПМ листьев мутанта *Atflot1_{ns}* незначительное повышение содержания H⁺-АТФазы, тогда как в ПМ листьев мутанта *Atflot1_{нок}* привело к резкому его снижению. При этом уровни экспрессии генов двух изоформ H⁺-АТФазы Р-типа *A. thaliana*, *HA1* (At2g18960) и *HA2* (At4g30190), характеризующиеся наибольшей представленностью транскриптов, по сравнению с другими изоформами этого белка, у обоих мутантов не отличались заметно от таковых растений ДТ. Из этого следует, что изменения в содержании H⁺-АТФазы в ПМ, вызванные мутациями, опосредованы, скорее всего, везикулярным трафиком, а не изменениями в экспрессии генов. Следует отметить, что внесение NaCl в среду активировало эндоцитоз в клетках корней мутанта *Atflot1_{ns}*, о чем свидетельствует ускорение поглощения эндоцитозного маркера FM4-64. Однонаправленные изменения в содержании H⁺-АТФазы в ПМ в ответ на разные мутации могут объясняться разными зависимостями скоростей экзоцитоза и эндоцитоза от содержания Atflot1 в мембране. По-видимому, как при повышенном, так и при пониженном содержании Atflot1 (мутации *Atflot1_{ns}* и *Atflot1_{нок}*, соответственно,) имело место превышение скорости экзоцитоза над скоростью эндоцитоза. Наблюдавшееся и в том, и в другом случае повышение относительного содержания H⁺-АТФазы, в свою очередь, привело к одинаковым у двух мутантов эффектам NaCl (резкое снижение содержания H⁺-АТФазы в мембране). При отсутствии повышенной экспрессии *AtFlot1* (у ДТ в корнях и листьях; у мутанта *Atflot1_{ns}* в листьях) и при “нормальном” в этих случаях содержании H⁺-АТФазы в ПМ внесение NaCl в среду не привело к снижению ее содержания, указывая на регуляторный эффект NaCl. В целом полученные данные свидетельствуют об участии везикулярного трафика в регуляции содержания H⁺-АТФазы Р-типа в ПМ клеток *A. thaliana* в условиях солевого шока и о вовлечении в этот процесс AtFlot1. Мутации по гену *AtFlot1*, по-видимому, приводят к нарушению баланса между секреторным путем, доставляющим H⁺-АТФазу в ПМ и эндоцитозом, переносящим ее из ПМ в эндосомы. Принимая во внимание вовлечение H⁺-АТФазы Р-типа в механизмы ионного гомеостатирования цитоплазмы, регуляции содержания этого белка в ПМ посредством везикулярного трафика следует отнести ключевую роль в солеустойчивости растений *A. thaliana*.

Участники соматического эмбриогенеза среди генов семейства *WOX*

Красноперова Е.Ю., Творогова В.Е., Лутова Л.А.

Санкт-Петербургский государственный университет. Университетская наб., 7-9-11, Санкт-Петербург, Россия.
eliz.krasnoperova@gmail.com

Соматический эмбриогенез – это один из способов вегетативного размножения и регенерации растений, при котором зародыши образуются не из генеративных, а из вегетативных тканей. В биотехнологии этот процесс широко применяется для трансформации растений.

Регуляторами соматического эмбриогенеза зачастую являются те же гены, которые участвуют и в зиготическом эмбриогенезе, например - представители семейства гомеобокс-содержащих генов *WOX*, которые кодируют транскрипционные факторы. Основной функцией этих генов является регуляция пролиферации и дифференцировки клеток в различных процессах, связанных с развитием растений.

Для *Medicago truncatula*, нашего модельного объекта, ранее уже было показано участие некоторых генов *WOX* в соматическом эмбриогенезе. Так, например, сверхэкспрессия гена *MtWOX9-1* приводит к увеличению эмбриогенности каллусной ткани и изменению уровней экспрессии ряда генов, участвующих в соматическом эмбриогенезе.

Сейчас мы ведём поиск участников соматического эмбриогенеза среди не исследованных ранее генов семейства *WOX*. Нами было обнаружено повышение уровня экспрессии в ходе соматического эмбриогенеза для некоторых из этих генов, в том числе *MtWOX2*. В наших планах провести транскриптомный анализ каллусов со сверхэкспрессией этого гена, поскольку для них замечено повышение эмбриогенности.

Известно, что экспрессия генов семейства *WOX* может регулироваться пептидными гормонами из семейства CLE по механизму положительной или отрицательной обратной связи. Мы предположили, что гены *MtCLE06* и *MtCLE18* также могут являться мишенями транскрипционного фактора *MtWOX9-1*, поскольку результаты транскриптомного анализа показали, что при сверхэкспрессии *MtWOX9-1* изменяется уровень экспрессии этих генов. Для проверки этой гипотезы мы используем метод EMSA.

Феномика растений: современное состояние проблемы и опыт фенотипирования модельных объектов

Демидчик В.В.

Белорусский государственный университет, пр. Независимости 4, 220030, Минск, Беларусь.
dzemidchuk@bsu.by

Новый раздел физиологии растений – феномика растений, фокусируется на выявлении закономерностей организации и анализе изменений *фенотипов* растений. Феномика дополняет классический молекулярный и физиолого-биохимический анализ детальным и статистически значимым фактологическим материалом о фенотипах. Регистрация и анализ данных о фенотипах в феномике именуется *фенотипированием*. В особенности, широко внедряется так-называемое *высокопроизводительное фенотипирование*, обеспечивающее цифровой анализ больших выборок данных. Бурный прогресс в области фенотипирования растений обусловлен развитием высокоточных и доступных систем регистрации изображений в различных областях спектра, развитием стандартизированных подходов культивирования растительных объектов, появлением новых сенсорных технологий и робототехники, а также методов обработки и анализа данных с применением подходов *компьютерного зрения* и *машинного обучения*. Предполагается, что феномика в ближайшем будущем позволит создать цифровые модели процессов жизнедеятельности и «формирования» продуктивности растений на организменном уровне в связи с динамикой транскриптомов, протеомов, метаболомов и др. показателей. Высокопроизводительное фенотипирование активно развивается как в лабораторных условиях, так и на открытых площадках, лесных массивах и природных фитоценозах. Наша работа нацелена на создание систем автоматизированного фенотипирования ряда декоративных растений и важнейших модельных видов (*Arabidopsis thaliana* и *Triticum aestivum*) с использованием RGB/HSV-имиджинга, спектрального анализа, методов машинного зрения и сверточных нейронных сетей. Разработаны и апробированы три мини-платформы для цифрового фенотипирования высших растений на базе SLR-камер. С их использованием протестировано воздействие ряда регуляторов роста и стрессоров на рост и развитие растений различных генотипов. В частности, впервые продемонстрировано участие редокс-сенсоров калиевых каналов GORK в ростовом ответе корня высших растений на солевой, осмотический и окислительный стресс, выявлены особенности ответа ростовых показателей корня на экзогенный аскорбат, присутствие различных brassinosterоидов, ауксинов, ионов никеля и меди, низких значений pH, различных химических форм алюминия и бора. Получены и проанализированы цифровые спектральные характеристики изображений декоративных растений на разных стадиях их роста и развития в нестерильных условиях, а также системах *in vitro* и *ex vitro*.

Фенотипические эффекты генетической трансформации тополя берлинского геном *AtGA20ox1*

Павличенко В.В., Протопопова М.В.

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН. ул. Лермонтова, 132, Иркутск, Россия.
vpavlichenko@gmail.com

Рядом публикаций было показано, что отдельные гены, кодирующие ключевые ферменты биосинтеза гиббереллинов, могут быть эффективно использованы для генетической трансформации и получения фенотипа, характеризующегося ускоренным ростом и развитием растения. Настоящим исследованием мы демонстрируем еще одну успешную генетическую трансформацию геном гиббереллин-20-оксидазы, выраженную в специфическом фенотипе растения реципиента генетической информации.

В качестве объекта генетической трансформации был выбран тополь берлинский (*Populus berolinensis* C. Koch) - гибрид тополя лавроволистного (*P. laurifolia*) и тополя черного (*P. nigra*).

Агробактериальная генетическая трансформация осуществлялась с использованием бинарной векторной системы pBI121 несущей открытую рамку считывания гена гиббереллин-20-оксидазы из *Arabidopsis thaliana* (*AtGA20ox1*). В качестве растительных эксплантов для кокультивации с агробактерией использовались сегменты междоузлий. Для регенерации и микроклонального размножения тополя использовали твердую питательную среду на основе ½ MS с полной нормой микроэлементов и хелата железа, а также с добавлением тиамина (1 мг/л), пиридоксина (0,5 мг/л), никотиновой кислоты (0,5 мг/л), сахарозы (20 г/л) и агара (7 г/л). Кислотность среды доводили до pH 5,7. Для регенерации трансгенных растений использовали только один тип питательной среды с добавлением бензиладенина (0,2 мг/л), тидиазурина (0,02 мг/л), нафтилуксусной кислоты (0,01 мг/л). В результате регенерации на селективной питательной среде, содержащей канамицин (50 мг/л) и цефотаксим (250 мг/л), было отобрано 15 различных трансгенных линий тополя берлинского. Отсутствие контаминации растений *A. tumefaciens* проверяли инкубацией частей листьев на питательной среде YEB. Трансгенез был подтвержден укоренением в присутствии канамицина в питательной среде (50 мг/л) и посредством ПЦР на гены *nptII* и *AtGA20ox1*.

Все полученные трансгенные растения тополя берлинского характеризуются небольшими узкими листьями, длинными и тонкими междоузлиями и как минимум на 300% более быстрым ростом по сравнению с контрольными растениями. Несколько трансгенных линий выделялись крайне мягким стеблем, не способным поддерживать вертикальное положение растения. В отдельных случаях стебель извивался, образуя спирали. Данные трансгенные линии несомненно представляют научный интерес и требуют дальнейшего изучения, но вряд ли смогут найти применение на практике, в связи с невозможностью культивирования таких растений без опоры в виде стенок культуральных сосудов или пробирок. Среди отобранных трансгенных линий особо выделялись две линии, у которых сразу после укоренения погибала верхушечная почка и засыхала большая часть ствола. Не смотря на такие повреждения, данные линии были способны снова давать побеги из оставшихся пазушных почек, но при попытке их последующего срезания и укоренения, снова наблюдалась гибель верхушечной части. Остальные отобранные трансгенные линии сохраняют полученный фенотип после срезания и укоренения, имеют устойчивый вертикальный стебель, но отличаются более бледными по сравнению с контролем листьями.

Все отобранные трансгенные линии требуют дальнейшего изучения, включая измерение уровня активных гиббереллинов, определение степени экспрессии трансгена, а также микроскопию тканей на предмет обнаружения морфологических изменений.

Ферментативный характер дегидратазной карбоангидразной активности фотосистемы 2. Условия проявления, кинетика реакции

Шитов А.В., Терентьев В.В.

Институт фундаментальных проблем биологии РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН. Институтская ул., 2, Пушкино, Россия.
aleksshitow@ Rambler.ru

Для оптимальной работы фотосистемы 2 (ФС-2) важно наличие ионов бикарбоната, а, следовательно, должна быть обеспечена высокая скорость следующих преобразований $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$, называемая карбоангидразной активностью (КА-активность). Прямое направление реакции (слева-направо) называют гидратазным, обратное – дегидратазным. ФС-2 обладает как гидратазной (при pH 8,0 – 8,3 она довольно низка – около 12-15 ед. W-A/мг Хл, но измеряется точно и достоверно), так и дегидратазной КА-активностью (измерялась с помощью разных способов и при pH 5,5; 6,7; 7,5; 8,0). По некоторым данным, уровень этой активности в ФС-2 был ниже, чем в гидратазном направлении. В связи с этим, у многих исследователей были сомнения по поводу ферментативного характера КА-активности в ФС-2.

Опираясь на полученные нами данные о взаимосвязи карбоангидразной и фотосинтетической активностей в ФС-2 мы оптимизировали pH-метрический метод определения дегидратазной КА-активности (описанный Shingles and Mgoney, 1997) для pH 6,5 (оптимального для фотосинтетической активности этого комплекса), и с достаточно высокой точностью её определили (167 ± 33 ед. W-A/мг Хл). При pH 6,5 дегидратазная активность была в 8 раз выше гидратазной. Полученная зависимость активности ФС-2 от концентрации субстрата описывается уравнением Михаэлиса-Ментен, что позволило впервые определить кинетические параметры реакции: $K_m = 2.7$ мМ, $V_{\max} = 2.74 \cdot 10^{-2}$ мМ/сек, $k_{\text{cat}} = 1.16 \cdot 10^3$ сек⁻¹, $k_{\text{cat}}/K_m = 4.1 \cdot 10^5$ М⁻¹ · сек⁻¹.

В этих же условиях данные параметры определили для известной высокоактивной карбоангидразы II из эритроцитов быка (Sigma, USA, Cat. № C3934). Полученные результаты ($K_m = 25,7$ мМ, $V_{\max} = 61 \cdot 10^{-2}$ мМ/сек, $k_{\text{cat}} = 3.5 \cdot 10^4$ сек⁻¹, $k_{\text{cat}}/K_m = 1.4 \cdot 10^6$ М⁻¹ · сек⁻¹) согласуются с литературными данными и свидетельствуют о применимости оптимизированного метода для определения высоких скоростей карбоангидразной реакции. Число оборотов фермента (k_{cat}) и константа специфичности (k_{cat}/K_m) в ФС-2 отличаются от таковых для карбоангидразы из эритроцитов не более, чем на порядок. Было доказано, что такая высокая эффективность не обусловлена наличием примесных карбоангидраз. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о ферментативном характере карбоангидразной активности ФС-2, а также о высокой эффективности катализа карбоангидразы в этом комплексе.

**Физиолого-биохимические реакции растений *Nicotiana tabacum*
на длительную обработку ионами Cu^{2+}**

Тугбаева А.С., Ермошин А.А., Киселева И.С.

Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина. Мира, 19, Екатеринбург, Россия.
anastasia.tugbaeva@urfu.ru

Проблема загрязнения почвы ионами меди, остается актуальной. Известно, что их фитодоступность зависит от состава и pH почвы. Добавление перлита, вермикулита в субстрат для выращивания растений способствует связыванию ионов меди и снижению ее доступных форм. Известно, что корневая система аккумулирует значительное количество ионов тяжелых металлов, ограничивая их дальний транспорт и создавая барьер для их проникновения в другие органы растений. Фенотипически негативное действие Cu^{2+} проявляется в виде побурения апикальной меристемы и ризодермы корня, уменьшения линейных размеров органа, нарушения в образовании корневых волосков и др. На биохимическом уровне отмечают увеличение количества активных форм кислорода и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), изменение активности антиоксидантных ферментов. Известно, что часто растения способны восстанавливаться после стресса. Эффективность восстановления зависит от типа органа и экологической группы растений, а также вида металла, его концентрации и продолжительности воздействия.

Растения *Nicotiana tabacum* L. сорта Petite Havana линии SR1 культивировали на субстрате – смесь перлит : вермикулит в соотношении 1 : 1 на среде Кнопа с добавлением воды (контроль) или растворов CuSO_4 в концентрации 100 и 300 μM до достижения возраста 40 дней (длительная обработка). Вторую группу растений в течение первых 20 дней после появления всходов поливали растворами Кнопа с добавлением 100 и 300 μM Cu^{2+} , следующие 20 дней – только раствором Кнопа (период восстановления). Растения выращивали в условиях фотопериода 16/8 и температуры 23°C. Все измерения выполнены для растения возраста 40 дней.

Содержание ионов меди в субстрате (доступная и валовая) и растительных тканях измеряли с помощью атомно-эмиссионной спектроскопии (ICP-AES, iCAP 6500 Duo, Thermo Fisher, США) после озоления материала HNO_3 .

Спектрофотометрически определяли содержание продуктов ПОЛ по Uchiyama и Mihara (1978). В грубом экстракте тканей корня в 0.05 M Tris-HCl буфере (pH 7.0) определяли количество H_2O_2 по Bellincampi (2000); активность гваяколовой пероксидазы (ГПО, КФ 1.11.1.7) и каталазы (КАТ, КФ 1.11.1.6) по Chance и Maehly (1955), супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) по Beauchamp и Fridovich (1971), аскорбат-пероксидазы (АПО, КФ 1.11.1.11) по Nakano и Asada (1981). Содержание белка определяли по Bradford (1976). Измерения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 («Shimadzu», Япония) и Tecan Infinite 200 series («Tecan», Австрия). Статистическую обработку данных проводили в программе STATISTICA 10 с применением *U*-критерия Манна-Уитни при $p < 0.05$.

Субстрат эффективно связывал ионы меди в среде при pH 5.3. В случае внесения растворов 100 и 300 μM Cu^{2+} ее валовое содержание было в 3,9 и 10 раз больше в сравнении с контролем, а количество доступной меди не превышало 0,2% от ее валового содержания.

В корнях *N. tabacum* в 20-дневный период восстановления содержание меди составило 312 ± 17 мкг/орган и 736 ± 37 мкг/орган в вариантах с 100 μM и 300 μM Cu^{2+} , соответственно. В случае 40-дневной обработки растений растворами Кнопа с ионами меди ее количество в корнях составило, соответственно, 8173 ± 409 и 10274 ± 514 мкг/орган, против 15 ± 1 мкг/орган в контроле.

В период восстановления в корнях растений, предобработанных 100 μM Cu^{2+} , содержание H_2O_2 и продуктов ПОЛ было сопоставимо с уровнем в контрольных растениях. Для растений, предобработанных 300 μM Cu^{2+} , двадцатидневного периода восстановления было недостаточно, т. к. количество H_2O_2 в тканях выросло на 42%, продуктов ПОЛ на 21% относительно необработанных растений. В условиях 40-дневной обработки 100 μM Cu^{2+} количество этих стрессовых маркеров снижалось в сравнении с контролем, при этом активность ферментов антиоксидантной защиты возрастала. Напротив, в варианте с длительной обработкой растений 300 μM Cu^{2+} отмечали выраженное увеличение количества перекиси на 59%, продуктов ПОЛ на 18% относительно контроля. Активность ГПО существенно возрастала при предобработке растений 300 μM и в случае длительной обработки 100 и 300 μM Cu^{2+} , также как и активность СОД. Напротив, тотальная активность каталазы снижалась при длительной обработке растений *N. tabacum* 300 μM Cu^{2+} , а активность АПО снижалась во всех вариантах опыта.

Мы предполагаем, что субстрат активно связывал ионы меди, поэтому, существенных изменений в антиоксидантном статусе растений в вариантах с обработкой 100 μM Cu^{2+} не было отмечено. Однако, при внесении в субстрат 300 μM Cu^{2+} , увеличение их содержания в тканях корня превышало адаптивные возможности ферментных систем антиоксидантной защиты *N. tabacum*, стимулировало развитие окислительных процессов, что привело к снижению активности АПО и каталазы. Обнаруженные эффекты свидетельствует о неполном восстановлении растений в течение 20 дней после прекращения их обработки растворами ионов меди.

Физико-химические подходы в оценке защитных реакций растений (от клетки до экосистем)

Гончарова Э.А. *, Мурашов С.В. **, Мотылева С.М. ***

* Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова. Б. Морская 42, 44, Санкт-Петербург, Россия.

** Национальный исследовательский университет ИТМО. Кронверкский пр., 49, Санкт-Петербург, Россия.

*** Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства.

Загорьевская, 4, Москва, Россия.

e.goncharova@vir.nw.ru *, s.murashev@mail.ru **, motyleva_svetlana@mail.ru ***

Генетические ресурсы культурных растений являются одним из важнейших компонентов растительного биологического разнообразия, так как имеют фактическую или потенциальную ценность для производства продуктов питания, устойчивого развития экологически безопасного сельского хозяйства, создания полноценного сырья для промышленности.

Проведенные многолетние эксперименты на представителях различных ботанических семейств и видов растений позволили нам впервые сформулировать ряд принципиально важных положений, характеризующих транспорт веществ у растений в разных (оптимальных и экстремальных) условиях среды. Так, потоки разных веществ (воды, органических и неорганических соединений) проходят путь корень – стебель – лист – плод. Последнее достоверно было показано в наших экспериментах с помощью радиоизотопных меток (^3H , ^{14}C , ^{36}Cl). Аттрагирующая способность плодов, как концевое двигателя транспорта к ним пластических веществ, определяется интенсивным синтезом высокомолекулярных соединений (белка, крахмала и т.д.) и создаваемым вследствие этого градиентом концентрации транспортных форм ассимилянтов (сахарозы, аминокислот и т.д.). Донорно-акцепторные связи вегетативных и генеративных органов, проявляющиеся в конкретных взаимоотношениях и аттрагирующей деятельности, являются ведущими механизмами в адаптации растений к разным экологическим стрессам (засуха, жара, дефицит питания и др.).

Возникла необходимость разработки технологии получения высококачественной плодовой продукции, способной к её длительному сохранению. Одним из инновационных приемов явилось использование препарата глицина, способствующего формированию урожая с наиболее длительным сроком хранения и с сохранением качества продукции. Разработана и запатентована технология использования глицина в качестве регулятора роста применительно к плодовым и ягодным растениям. Обнаружено что повышенное содержание фенольных соединений и органических кислот в плодах создает химический барьер на пути инфицирования, что положительно влияет на увеличение сроков хранения и качества плодовой продукции в условиях криоконсервации.

Генетико-селекционные исследования в Центральной зоне пловодства России обнаруживают частые вспышки клястероспориоза, что приводит к значительному снижению количества и качества плодовой продукции. В связи с этим, поиск биохимических маркеров у садовых растений, с целью выявления устойчивых генотипов для интродукции и селекции, несомненно, важен. В результате проведенных исследований обоснованы новые физиолого-биохимические подходы к оценке устойчивости генотипов сливы (Род *Prunus* L.) к клястероспориозу с использованием GC/MS анализа.

Физиологические и молекулярные механизмы адаптации хвойных к засухе

Иванов Ю.В.^{*}, Злобин И.Е.^{*}, Карташов А.В.^{*}, Ставрианиди А.Н.^{**}, Сарвин Б.^{**}, Паиковский П.П.^{*},
Ванкова Р.^{***}, Добрев П.^{***}, Креславский В.Д.^{****}, Кузнецов Вл.В.^{*}

* Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.

** Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет.
Ленинские горы, 1, стр. 3, Москва, Россия.

*** Институт экспериментальной ботаники Чешской академии наук. Розвоёва ул., 263, Прага, Чехия.

**** Институт фундаментальных проблем биологии РАН. Институтская ул., 2, Пушкино, Россия.

ivanovinfo@mail.ru

Увеличение частоты и интенсивности экстремальных погодных явлений (засух, жары и пр.) являются основной причиной снижения устойчивости лесных экосистем и даже гибели лесов (Právělie, R., 2018). Основными лесообразующими видами хвойных лесов в умеренном и бореальном климате, различающихся по требовательности к влажности почвы, являются сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) и ель европейская (*Picea abies* (L.) H.Karst). В докладе будут представлены результаты многолетних исследований реакции этих видов растений на ПЭГ-индуцированный водный дефицит (осмотическое давление питательного раствора: 0,15, 0,5 и 1,0 МПа) – удобной системы для изучения механизмов адаптации хвойных древесных растений.

Ростовые процессы в условиях водного дефицита более были устойчивыми у семян сосны, а поддержание водного баланса – у семян ели. Поддержание водного баланса клеток семян ели обеспечивалось существенным повышением их водоудерживающей способности. Водный баланс семян сосны сильнее изменялся в условиях водного дефицита, однако при этом поддерживалась высокая интенсивность ростовых процессов за счет сохранения тургора вследствие изменения эластичности клеточной стенки.

Водный стресс вызывал значительное дозозависимое снижение содержания углеводов в корне сосны, коррелировавшее с уровнем смертности семян. Это указывает на ведущую роль углеродного голодания, как причины смертности сосны при продолжительном водном дефиците. Напротив, у ели не отмечалось значительных изменений в содержании углеводов в условиях водного дефицита различной интенсивности. Преобладающим сахаром у сосны и ели является сахароза. Среди сахароспиртов у обоих видов растений доминировали циклические сахароспирты (мио-инозит, секвоит, пинит), однако в условиях водного дефицита значительно возрастало содержание нециклических сахароспиртов – маннита, сорбита, ксилита и рибита.

У семян сосны функционирование ФСII поддерживалось без ограничения переноса электронов от ФСII к ФСI. В результате не наблюдалось увеличения доли закрытых реакционных центров (excitation pressure, 1-qP) в ФСII, и снижение квантовой эффективности ФСII происходило за счет устойчивого нефотохимического тушения (sustained NPQ), а не за счет фотоинактивации ФСII. Напротив, у семян ели в условиях водного дефицита значительно сокращался поток электронов от ФСII к ФСI, что способствовало поддержанию высокой степени окисленности ФСI, однако повышенная доля закрытых реакционных центров в условиях длительного водного дефицита приводило к фотоинактивации ФСII. Для обоих видов растений было характерно координированное снижение содержания фотосинтетических пигментов, которое, вероятно, было обусловлено снижением общего числа фотосистем, т.к. соотношения между хлорофиллами *a* и *b* сохранялись на постоянном уровне. Наряду со снижением квантовой эффективности ФСII это могло способствовать снижению поглощения световой энергии растениями в условиях водного дефицита. С поддержанием высокой фотохимической эффективности ФСI у обоих видов могло быть связано предотвращение развития окислительного стресса, т.к. не наблюдалось роста содержания малонового диальдегида и 4-гидроксиалкеналя в хвое.

Водный дефицит приводил к стресс-зависимому увеличению содержания АБК, более выраженному у сосны в корнях, а у ели – в хвое. Увеличение содержания АБК в условиях водного дефицита происходило, преимущественно, за счет ее синтеза *de novo* и не было напрямую связано с уровнем экспрессии основных генов её биосинтеза. Содержание салициловой кислоты и жасмонатов не обнаруживало выраженной реакции в ответ на водный дефицит у обоих видов. Напротив, изменения содержания цитокининов и 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (предшественник этилена), вызванные дефицитом воды, сопровождалась дифференциальной регуляцией генов, участвующих в метаболизме этих гормонов.

Обнаруженные различия физиологических и молекулярных механизмов адаптации семян сосны и ели к водному дефициту связаны с различиями стратегий адаптации данных видов к водному дефициту в естественной среде. Благодаря использованию внутренних резервов и поддержанию темпов роста корневой системы сосна в природных условиях достигает влажных горизонтов почв и избегает действия стресс-фактора. Напротив, ель переходит к резкому снижению расходования воды и торможению ростовых процессов, переживая неблагоприятный период. Таким образом, эффективность каждой из стратегий определяется продолжительностью водного дефицита.

Данная работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект No. 16-14-10224).

Физиологические особенности ранних этапов прорастания у ели колючей

Клименко Е.С., Брейгина М.А., Евменьева А.А.

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова. Ленинские горы, 1, Москва, Россия.
kleo80@yandex.ru

Важность исследования механизмов, регулирующих рост пыльцевой трубки, обусловлена тем, что результатом этого процесса является оплодотворение и образование семян, что также во многом зависит от успеха межклеточной коммуникации (пыльца ↔ спорофит). Физиологические изменения, происходящие в пыльцевых зёрнах при выходе из покоя, до перехода к полярному росту (активация) были изучены сотрудниками лаборатории в 2002-2009 годах на табаке, кроме того, в литературе есть данные об отдельных аспектах активации у оливы, лилии и некоторых других видов цветковых растений (Dickinson, 1965; Rodriguez-Rosales et al., 1989; Брейгина et al., 2009; Матвеева et al., 2003, 2002). Однако по поводу голосеменных информации практически не было, кроме единичного графика дыхания у сосны (Nygaard, 1969). В связи с этим мы поставили задачу исследовать процессы активации метаболизма и запуска полярного роста в пыльце ели *Picea pungens* (хвойного растения с типичным способом опыления).

Одним из основных показателей активации метаболизма является уровень дыхания. Поглощение кислорода пыльцевыми зёрнами ели не регистрировалось после 30 минут инкубации, незначительно возрастало после 2 часов, сильно возрастало после 6 часов и достигало пика после 9 часов, а далее несколько снижалось, оставаясь на уровне 6 часов. Таким образом, наибольшего потребления кислорода требует процесс выхода пыльцевой трубки из зерна, когда образуются крупные разрывы и происходит запуск полярного роста.

Параллельно с активацией дыхания у ели происходят изменения рН цитоплазмы. К сожалению, измерить внутриклеточный рН до появления разрывов нам не удалось, поскольку красители не проникают через сплошную экзину, но окрашивание позволило оценить изменения, которые происходят после появления первых разрывов. Оказалось, что после 6 часов рН еще находится далеко в кислой области (6.0), но к 9 часам происходит существенное защелачивание, и после 9 и 14 часов рН достигает 7.2 и 7.0, соответственно, т.е. значений, типичных для цитоплазмы растительной клетки в состоянии активного метаболизма.

Поскольку параллельно с защелачиванием цитоплазмы H^+ -АТФаза плазмалеммы создает и мембранный потенциал, мы предполагали увидеть гиперполяризацию, которая проходила бы в тех же временных рамках. Действительно, оказалось, что в пыльцевых зернах в процессе активации происходит гиперполяризация плазмалеммы: 6 часов – первая точка, которую удалось измерить из-за разрывов в экзине, – соответствовала -46 мВ, на 9 часов потенциал уже достигал -73 мВ, после 14 часов составлял -82 мВ. Сопоставив наблюдаемую динамику с изменениями внутриклеточного рН, мы можем заключить, что если потенциал возрастает в интервале 9-14 часов, то рН уже не меняется, а дыхание даже несколько снижается в этот период. Интересная закономерность, которая также наблюдается у табака и лилии, по-видимому, свидетельствует о комплексном характере регуляции мембранного потенциала, который представляет собой сумму активностей целого ряда ион-транспортных систем, одной из которых, по крайней мере, в пыльце цветковых растений, являются анионные каналы.

Внутренним изменениям, типичным для активации метаболизма, предшествовали изменения ионного статуса. С помощью внеклеточного флуоресцентного индикатора MEQ был обнаружен выход анионов из пыльцевых зерен, предшествующий активации: через 30 минут уровень внеклеточных анионов был уже существенно выше, а после 2 часов инкубации возрастал еще в 2 раза, и далее не изменялся. Таким образом, у ели, как и у табака, выход анионов завершается задолго до начала прорастания.

Авторы выражают благодарность Российскому Фонду фундаментальных исследований, при поддержке которого была проведена работа (19-04-00282а).

Физиологические реакции и аккумуляция селена растениями и почвенными грибами в ответ на селенит и нуль-валентный селен

Мшенская Н.С., Крутова Н.Ю., Синецына Ю.В., Стручкова И.В., Веселов А.П.

Институт биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, пр. Гагарина, 23, г.Н.Новгород, Россия.
tasya.mshanka@yandex.ru

Нижегородская область относится к регионам с низким содержанием селена в почвах и водах. Одним из подходов в решении проблемы селенодефицита в пище является внесение селена под сельскохозяйственные культуры, в виде селенита натрия как наиболее дешевого соединения или в виде нуль-валентного селена, стабилизированного различными органическими полимерами. При этом возникают вопросы об эффективности аккумуляции селена различными растениями в хозяйственно-ценных органах, его воздействии на жизнедеятельность растения и влиянии его внесения на микроорганизмы ризосферы и фитопатогены, в том числе - микроскопические грибы. В связи с этим, целью данной работы было выявление специфики физиологического ответа и аккумуляции селена растениями гороха и овса, а также пятью видами почвенных микроскопических грибов при выращивании организмов на средах, содержащих разные формы селена – Se^0 и Na_2SeO_3 .

Растения гороха посевного сорта Альбумен и овса посевного сорта Борец, грибы *Alternaria alternata*, *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Trichoderma virens* культивировали на соответствующих средах с добавлением 0,1мМ Se^0 и 0,1мМ Na_2SeO_3 , контролем служила среда без Se-добавок. Содержание суммы гидроперекисей в растениях исследовали FOX-методом, активность пероксидаз определяли по реакции с тетраметилбензидином. Для грибов оценивали морфологию и скорость роста колоний, сухую массу 12-дневного мицелия. Содержание селена в воздушно сухих образцах растений и микромицетов определяли методом «мокрого» сжигания с дальнейшей реакцией с 2,3-диаминонафталином.

Показано, что в присутствии Na_2SeO_3 селен преимущественно накапливался в корневой системе растений – в среднем в 10 раз больше, чем в листьях. При выращивании растений овса на растворе Se^0 также обнаружили преимущественное накопление селена корнями и небольшое содержание в листьях. В отличие от этого, в растениях гороха, выращенных на растворе Se^0 , было выявлено равномерное распределение селена - около 0,08 мкмоль/мг сухого веса. Наличие селена снижало суммарное содержание гидроперекисей в листьях гороха: Se^0 - на 40%, Na_2SeO_3 - на 15%. Однако, в листьях овса ни одна из форм селена не вызвала статистически значимого изменения содержания гидроперекисей по сравнению с контролем. В то же время, присутствие селена почти не повлияло на пероксидазную активность в листьях гороха, тогда как в листьях овса вызвало значительные изменения ферментативной активности: в случае Se^0 она возросла в 4,5 раза, а Na_2SeO_3 – вдвое снизилась.

Как Na_2SeO_3 , так и Se^0 ингибировали рост колоний микроскопических грибов, но степень воздействия зависела от вида организма и вида вносимого селенсодержащего соединения. Ингибирование роста колонии при внесении Na_2SeO_3 усиливалось в ряду *A. alternata* - *A. niger* - *F. moniliforme* - *T. virens* - *A. terreus*; при внесении в форме Se^0 - в ряду *A. alternata* - *A. terreus* - *T. virens* - *F. moniliforme* - *A. niger*. Под действием Na_2SeO_3 сухая масса мицелия 12-суточных культур снижалась у *A. terreus* (на 80%), но возрастала у *A. niger* (почти на 60%). Под действием Se^0 достоверно снижалась масса мицелия лишь у *A. terreus* (на 30%). Присутствие селена 0,1 мМ в среде роста вызывало покраснение субстратного мицелия, свидетельствующее об отложении в нем частиц Se^0 , у всех видов грибов, за исключением *A. alternata*. Аккумуляция селена в мицелии у четырех видов из пяти примерно одинакова – 0,03-0,04 мкмоль/мг сухой массы и не зависит от его формы, у *A. niger* в присутствии Na_2SeO_3 и Se^0 – 0,09 и 0,05 мкмоль/г сухой массы соответственно.

Таким образом, молодые растения овса преимущественно накапливали селен в корнях и слабо транспортировали его в листья. Проростки гороха оказались способны транспортировать селен в листья при выращивании на среде с нуль-валентным селеном. Ответ на селен прооксидантно-антиоксидантной системы зависел как от вида исследуемого растения, так и от формы селеновой добавки. Селен подавлял рост и развитие почвенных микромицетов. Самым устойчивым видом, как по отношению к селениту натрия, так и к нуль-валентному селену, явился гриб *A. alternata* – известный фитопатогенный вид. Все эти обстоятельства необходимо учитывать при поиске высокоэффективных и экологически безопасных путей использования селена в сельскохозяйственном растениеводстве, не допускающих нежелательных изменений микоценозов почвы.

**Физиолого-биохимические параметры вечнозеленых видов семейства
Oleaceae в условиях криостресса**

Губанова Т.Б., Палий А.Е., Палий И.Н.

ФГБУН «Никитский ботанический сад-Национальный научный центр РАН». 298648,
Никитский спуск, 52 Ялта, Россия.
Gubanova-65@list.ru

В условиях ЮБК вечнозелёные виды семейства Oleaceae L. различаются как по степени морозостойкости, так и по срокам достижения её максимума. Наиболее высокая морозостойкость у видов рода *Ligustrum* отмечена в конце декабря – начале января, а у генотипов *Olea europaea* L. - во второй декаде января. Относительно устойчивы к отрицательным температурам вид *L. lucidum* и сорт *O. europaea* 'Никитская'. Для *O. europaea* subsp. *cuspidata* сорта *O. europaea* 'Кореджиоло' и *L. compactum* характерна низкая морозостойкость. В рамках изучения механизмов морозостойкости представителей семейства Oleaceae получены первичные данные о степени потенциальной морозостойкости видов рода *Osmanthus*. Установлено, что для *Osmanthus x fortunei* Carriere, характерна более высокая устойчивость, чем для *O. fragrans*.

Исследования сезонной динамики накопления биологически активных веществ и изменения активности окислительно-восстановительных ферментов в листьях ряда сортов маслины европейской и подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata* с различной степенью морозостойкости, показали, что повышенный температурный фон в холодный период способствует увеличению активности каталазы и более интенсивному накоплению фенольных веществ. В результате анализа влияния условий, необходимых для прохождения стадий закаливания на морозостойкость вечнозеленых видов семейства Oleaceae установлено, что температура -8°C в сочетании с кратковременной закалкой при 0°C способствует снижению квантового выхода фотосинтеза и эффективности его световой фазы у всех изучаемых генотипов. Однако, индекс жизнеспособности в пределах нормы остался только у генотипов рода *Olea*. У морозостойкого вида *L. lucidum* значение этого параметра свидетельствовало о начале необратимых нарушений в работе фотосинтетического аппарата. Наличие условий, необходимых для прохождения второй стадии закаливания, способствует сохранению нормальной работы фотосинтетического аппарата у вида *L. lucidum*, но оказывает негативное влияние на процессы фотосинтеза у генотипов *O. europaea*. У сортов *O. europaea* в таких условиях отмечены значительные снижения максимальной и вариабельной флуоресценции, что свидетельствует о рассеивании энергии возбуждения в виде тепла, а также возможном нарушении структуры тилакоидов.

В контролируемых условиях, были изучены изменения активности окислительно-восстановительных ферментов и содержания протекторных веществ. Установлено, развитие низкотемпературного стресса сопровождается специфическими изменениями как в работе ферментов, так и в концентрации фенольных соединений и пролина. В результате действия температуры, близкой к значению абсолютного минимума на ЮБК -15°C наблюдалось снижение активности каталазы у всех генотипов, за исключением морозостойкого сорта Никитская. У слабостойких сортов Раццо, Кореджиоло и *O. europaea* subsp. *cuspidata*, такие условия привели к необратимым нарушениям в работе фотосинтетического аппарата, что проявилось в снижении коэффициента спада флуоресценции ниже витальной нормы. Изменение активности полифенолоксидазы в опытных вариантах происходило разнонаправленно. Подобные изменения полифенолоксидазной активности в условиях действия критических температур, связаны как с индивидуальными сортовыми особенностями, так и со степенью криорезистентности. Воздействие отрицательных температур приводило к снижению уровня пролина на 17-55% в листьях всех исследуемых генотипов, а содержание фенольных соединений снижалось у слабоморозостойких сортов и *O. europaea* subsp. *cuspidata*. Полученные данные свидетельствуют об участии этих веществ в первичных неспецифических реакциях на действие стрессора.

В результате сравнительного исследования фенольных соединений листьев четырёх сортов и одного подвида маслины установлено, что доминирующим компонентом сортов маслины является олеуропеин, а подвида *O. europaea* subsp. *cuspidata* – рутин.

При действии отрицательных температур (-8°C ...-10°C) у видов родов *Osmanthus* и *Ligustrum* отмечено возрастание активности каталазы – в листьях *L. lucidum* и *O. x fortunei*, а у *L. compactum* – снижение. Полифенолоксидазная активность возрастала, как у видов *Ligustrum*, так и у *O. x fortunei*, а максимальный рост активности данного фермента наблюдался в листьях *L. compactum*. Воздействие низкотемпературного фактора также приводило к увеличению содержания пролина в листьях представителей рода *Ligustrum*, и его снижению в листьях *O. x fortunei*.

Развитие низкотемпературного стресса сопровождалось снижением уровня максимальной флуоресценции и эффективности световой фазы фотосинтеза. В реализации первичных стресс-реакций значительная роль принадлежит активности окислительно-восстановительных ферментов и пролину. Однако, при различной интенсивности низкотемпературного воздействия, наличия либо отсутствия необходимых для закаливания условий, реакции вечнозеленых представителей семейства Oleaceae носят родо- и видоспецифичный характер.

**Формирование агроценоза на основе мискантуса китайского
(*Miscanthus sinensis*): аллелопатический аспект**

Анисимов А.А., Медведков М.С., Скороходова А.Н.

Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева.
Ул. Тимирязевская, 49, Москва, Россия.
anisimov_a@grau-msha.ru

Мискантус китайский (*Miscanthus sinensis*) – это многолетнее корневищное травянистое растение семейства *Poaceae*. Область применения данной культуры весьма широка. Из надземной биомассы представителей рода мискантус можно получать биотопливо (как жидкое, так и твёрдое), композитные материалы, строительные материалы.

Мискантус китайский способен более 20 лет произрастать на одном месте, формируя при этом свой агроценоз и занимая в нём доминирующее положение. Доминирование мискантуса в агроценозе достигается рядом различных путей. Прежде всего, это интенсивное накопление биомассы (на максимальный уровень продуктивности растения выходят на 3-4 год жизни), которая задерживает значительное количество световой энергии (до уровня почвы может доходить 10% и менее). Тем самым происходит подавление роста у сорных растений, которые произрастают непосредственно в проекции наземной части растения мискантуса. Однако особенность роста мискантуса китайского заключается в том, что корневища данного растения за один вегетационный период не распространяются от материнского растения дальше, чем на 3-5 см. Тем самым формируются достаточно плотные и компактные куртины, и при рекомендуемой схеме посадки (70 x 70 см) отдельные растения не смыкаются между собой даже спустя 10 лет. В междурядьях мискантуса китайского уровень освещенности на уровне почвы может доходить до 40-50% от общего количества световой энергии, которое падает на ценоз. Такой уровень освещенности позволяет произрастать большинству групп сорных растений.

Однако в наших опытах на полевой станции РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева в рамках многолетнего эксперимента по изучению различных видов и форм мискантуса, а также других биоэкономических культур, мы отметили существенные различия в видовом и количественном составе сорных растений. В посадках мискантуса в начале вегетационного периода 2018 и 2019 года, до возобновления роста весной, число всходов сорных растений семейства астровые оказалось ниже на 81% по сравнению с междурядьем и на 63% ниже по сравнению с посадками горца Вейриха. Сорные растения семейства капустные в посадках мискантуса китайского отсутствовали полностью, в то время как на площади, примыкающей к делянкам, за тот же период обнаруживалось от 15 до 22 всходов сорных растений семейства капустные. В то же время различий по числу сорных растений семейства мятликовые в посадках мискантуса, горца Вейриха и пространстве между делянками выявлено не было.

Подобные наблюдения косвенно свидетельствовали о том, что растения мискантуса китайского подавляют рост растений семейства капустные при помощи аллелопатических взаимодействий. Один из потенциальных источников аллелохимикалий у растений мискантуса китайского – это обильный листовой опад, который оставляет после себя наземная часть растения (листья мискантуса очень ограничено используются для хозяйственных нужд). При этом доля листовых пластинок в суммарной наземной биомассе у мискантуса китайского может доходить до 40%, что является существенной величиной, с учётом потенциальной урожайности на широте Москвы, достигающей до 12 тонн сухого вещества с гектара.

В листовых пластинках мискантуса китайского содержатся вторичные метаболиты, для которых характерна потенциальная аллелопатическая активность. Это, прежде всего, такие флавоноиды, как трисин, фриделин, лулеол, ацетат лулеола, фриенол и изоарборинол.

С целью выявления аллелопатического воздействия веществ, содержащихся в листовых пластинках мискантуса китайского, на растения семейства капустные, был заложен лабораторный эксперимент. В качестве тест-растений был выбран редис (сорт 18 дней). Из воздушно-сухих листьев китайского 7 года жизни (собранных после завершения вегетации растений и отмирания наземной биомассы) готовили водные вытяжки путём настаивания 10 г листовых пластинок в 100 мл дистиллированной воды в течение 3-х дней. Растения редиса проращивали согласно методики ГОСТ для определения всхожести. Семена проращивали в дистиллированной воде (контроль), неразбавленной вытяжки из листьев мискантуса, а также при разбавлении вытяжки дистиллированной водой в соотношении 1:1. Была обнаружена корреляция между концентрацией вытяжки и всхожестью семян редиса – в контроле всхожесть составила 98%, при разбавлении 1:1 – 65%, в случае концентрированной вытяжки – 15%. Кроме того, у проростков, выращенных в концентрированной вытяжке при разбавлении 1:1 на момент определения всхожести отмечено подавление ростовых процессов – соответственно снизилась длина наземной и подземной части проростка. У проростков редиса, выращенных в неразбавленной вытяжке, отмечено ослизнение и отмирание апикальной меристемы корня.

Таким образом, было показано наличие аллелопатического воздействия веществ в листьях мискантуса гигантского на представителя семейства капустные, что позволяет нам говорить о том, что для растений мискантуса китайского характерно наличие аллелопатических механизмов взаимодействия с другими растениями, изучение которых продолжается.

Формирование урожая посевов риса и мониторинг их состояния

Скаженник М.А. *, Чижиков В.Н. *, Петрушин А.Ф. **, Киселев Е.Н. ***, Метрофанов Е.П. **, Пиеницына Т.С. *

* Федеральный научный центр риса п. Белозерный, 3, Краснодар, Россия.

** Агрофизический институт, Гражданский пр., 14, Санкт-Петербург, Россия.

*** Кубанский государственный университет, ул. Ставропольская, 149, Краснодар, Россия.

sma_49@mail.ru

В последние годы приобретают интерес исследования, которые проводятся в различных регионах России, позволяющие дать прогноз урожайности сельскохозяйственных культур. Поэтому необходимы исследования, раскрывающие специфику взаимосвязи продуктивности растений с данными дистанционного зондирования. Фотосинтетическую деятельность растений интенсивных и экстенсивных сортов риса на разных фонах минерального питания изучали по количественным параметрам признаков: листовой поверхности посевов, фотосинтетического потенциала, чистой продуктивности фотосинтеза, биомассы растений с единицы площади. Результаты этих исследований показали, что на среднем фоне питания ($N_{12}P_6K_6$) из-за недостатка азота растения слабо кустились, посевы имели пониженную площадь листовой поверхности и не полностью поглощали падающую на них энергию ФАР, что привело к уменьшению фотосинтетического потенциала и к снижению образования биомассы ценоза у исследуемых типов сортов риса. На оптимальном и высоком фонах минерального питания ($N_{24}P_{12}K_{12}$ и $N_{36}P_{18}K_{18}$) параметры изучаемых признаков фотосинтетической деятельности растений значительно возросли, однако их связь с величинами хозяйственного урожая сортов на одном фоне минерального питания не наблюдалась. Она хорошо проявлялась у изучаемых генотипов с ростом уровня минерального питания растений. В связи с этим параметры признаков, характеризующие фотосинтетическую деятельность растений на разных фонах NPK, имеют важное значение при оценке уровня обеспеченности посевов риса элементами минерального питания. Малые сортовые различия по продуктивности фотосинтеза, накопления общей биомассы растений интенсивных и экстенсивных сортов риса на оптимальном и высоком фонах NPK связаны с тем, что после образования у посевов листовой поверхности, площадью 4-5 м²/м² и выше, практически вся энергия ФАР поглощается растительной массой, что является лимитирующим фактором, при котором продуктивность фотосинтеза у генотипов злаков остается одинаковой. При образовании сомкнутого посева, когда приход энергии ФАР и концентрация CO₂ в воздухе лимитируют образование биологического урожая (общей биомассы), характер распределения ассимилятов по органам растения и побега является основным физиологическим механизмом формирования разной урожайности интенсивных и экстенсивных сортов риса и их устойчивости к полеганию и воздействию неблагоприятных факторов внешней среды. С наступлением фазы цветения различия по массе метелки и стебля побегов у интенсивных и экстенсивных генотипов риса весьма значительны. Они были использованы нами при оценке этих типов сортов на потенциальную продуктивность, устойчивость к полеганию и к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды. Более значительная часть ассимилятов экстенсивных сортов использовалась на образование массивных стеблей, что обусловило повышенную устойчивость их посевов к полеганию и привело к понижению уборочного индекса и урожайности этих генотипов. Проведены исследования по изучению оптических свойств ценозов сортов и их связи с морфофизиологическими признаками растений и урожайностью для мониторинга состояния их посевов. Показано, что величина вегетационного индекса имеет положительную связь с признаками фотосинтетической деятельности растений и их азотным статусом. Получены уравнения линейной регрессии, позволяющее оценить степень связи урожайности с вегетационным индексом NDVI. Установленные связи позволят с большей достоверностью получать информацию о физиологическом состоянии и продукционном процессе посевов риса, используя данные дистанционного зондирования. Кроме того, проведена верификация оптико-биологических свойств растений на тестовом поле № 7 (площадь 13,75 га, ОПУ «ФНЦ риса») для оптимизации продукционного процесса риса (с помощью БПЛА с мультиспектральной камерой и данных спутника). Предварительно растровые данные по вегетационному индексу и урожайности были совмещены в единой таблице, где каждая строка содержит информацию о географических координатах текущего пиксела, значения NDVI (3 срока) по данным БВС, спутника Sentinel и информацию об урожайности. Наши ожидания близости форм гистограмм, отражающих распределение NDVI и урожайности, подтвердились. Анализ корреляционной матрицы переменных NDVI показал статистически среднюю связанность пространственных распределений исследуемых переменных. Апробацию экспериментальной методики мониторинга посевов в 2019 г., опирающейся на средства дистанционного зондирования тестовых участков, набор исходных пространственных данных, средства геоинформационного моделирования и статистический аппарат следует, на наш взгляд, признать удовлетворительной. Полученные результаты позволяют совершенствовать методику мониторинга состояния посевов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 19-416-230021.

Открытие фотопериодизма растений Гарнером и Аллардом в 1920 году (Garner W.W., Allard H.A., 1920) ознаменовало начало эпохи экспериментального изучения этого, одного из наиболее важных приспособительных свойств растений. В связи с этим целесообразно проанализировать основные результаты изучения закономерностей фотопериодической реакции растений, полученные российскими и зарубежными исследователями. В первую половину XX-го столетия в бывшем Советском союзе главным результатом исследований была гормональная теория развития растений, сформулированная академиком М.Х. Чайлахяном, по которой цветение растений индуцируется веществом гормональной природы – флоригеном. Он представляет собой двухкомпонентный комплекс, состоящий из гиббереллина и гипотетического антезина. В условиях благоприятной для цветения продолжительности дня первый индуцирует образование стебля растений, а второй – цветков (Чайлахян, 1937, 1958, 1964, 1988). Это теоретическое положение обусловило развитие исследований гормональной регуляции фотопериодической реакции растений, хотя химическая природа флоригена до начала XXI столетия не была идентифицирована. В настоящее время теория флоригена нашла некоторое подтверждение в том, что у ряда растений, в том числе у *A.thaliana*, был идентифицирован белок, который является продуктом экспрессии гена Flowering Locus T (FT). Этому белку, как считают, свойственны функции флоригена, постулированные М.Х. Чайлахяном (Zeevaart Jan A.D., 2006; Corbesier L. et al., 2007). Несмотря на значительные достижения в исследованиях фотопериодизма, они, на наш взгляд, имели существенный недостаток методологического характера, который не позволял окончательно решить главный вопрос биологической природы фотопериодизма растений – почему длиннодневные растения зацветают быстрее в условиях длинного дня, короткодневные – в условиях короткого, а фотопериодически нейтральные цветут одновременно при любой продолжительности дня. Суть этого недостатка в том, что практически все исследователи ставили вопрос так – зацветут или не зацветут растения разных фотопериодических групп в тех или иных фотопериодических условиях. Однако этот подход, по нашему мнению, не учитывал сущность биологической природы фотопериодизма растений. Она состоит в том, что длиннодневные и короткодневные растения зацветают в благоприятных фотопериодических условиях в те сроки, в которые в данном конкретном районе их произрастания складываются наиболее благоприятные условия для цветения и плодоношения. Это главное, необходимое и достаточное условие для поддержания существования определенного вида в конкретных экологических условиях, так как только в этом случае может обеспечиваться образование достаточного количества жизнеспособных плодов и семян и, следовательно, потомства. Исходя из этого, необходим подход, при котором следует решать вопрос – ускорят (замедлят) переход к цветению растения при разной продолжительности фотопериода. Такой подход был использован при изучении роли питания в регуляции темпов развития растений разных фотопериодических групп в условиях разной длины дня, которое было начато в 60-е годы прошлого столетия в Украине. При этом питание растений рассматривалось как сложный процесс накопления, оттока и превращения продуктов ассимиляции. Было показано, что в благоприятных фотопериодических условиях (у длиннодневных растений на длинном, а у короткодневных на коротком дне), в которых растения развивались ускорено, интенсивность трофических процессов была выше, чем в неблагоприятных фотопериодических условиях при замедленном их развитии. На основании этого были сформулированы трофические закономерности фотопериодизма растений, суть которых состояла в следующем. В условиях благоприятной длины дня у растений обеих фотопериодических групп при более интенсивных трофических процессах точки роста лучше обеспечены питательными веществами в количественном и качественном отношении, что обуславливает большую скорость морфогенетических процессов и более ранний переход в генеративное состояние, чем в неблагоприятных фотопериодических условиях (Цыбулько, 1978, 1998). В дальнейшем трофическое направление в исследовании фотопериодизма было развито и сформулирована концепция о системности регуляции темпов развития растений. Она состоит в том, что темпы развития растений в условиях разного фотопериода определяются не самим по себе характером (интенсивностью) только трофических или только фитогормональных, или только энзиматических процессов. Их регуляция осуществляется комплементарной системой этих процессов, в которой каждый из них функционирует в определенном оптимальном соотношении с другими, что характерно для благоприятных фотопериодических условий. Под влиянием неблагоприятных фотопериодических условий происходит нарушение этого соотношения, что обуславливает замедление развития растений (Жмурко, 2009). Результаты дальнейших исследований, полученные в опытах с использованием в качестве модельных объектов изогенных по генам *PPD* линий пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) и по генам *EE* сои культурной (*Glycine max* (L) Merr.) с разной фотопериодической чувствительностью, показали, что эффекты этих генов на темпы развития реализуются посредством их участия в регуляции трофических, фитогормональных и энзиматических процессов, что расширило представления о системности регуляции темпов развития растений в разных фотопериодических условиях и, следовательно, о биологической природе фотопериодизма растений (Жмурко и др., 2016, 2017).

Фотосинтез и устойчивость к десикации у сортов риса дальневосточной селекции

Синенко О.С. *, Киселева И.С. *, Бурундукова О.Л. **

* Уральский федеральный университет им. Первого Президента России Б. Н. Ельцина,
ул. Мира 19, Екатеринбург, Россия.

** Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток, Россия,
Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток.
olga_sinenko@list.ru

Рис является важной сельскохозяйственной культурой и очень требователен к условиям возделывания. Он произрастает на затопляемых землях и очень плохо переносит засуху, поэтому изучение засухоустойчивости сортов риса и отбор перспективных форм представляет большой интерес, особенно в связи с тенденциями аридизации климата. В России рис возделывается преимущественно на Дальнем Востоке и в Краснодарском крае. В нашей работе изучались растения риса (*Oryza sativa* L.) дальневосточной селекции – сорта «Каскад», «Дальневосточный», «Ханкайский» и предок культурного риса *Oryza nivara*. Растения выращивали в вегетационных сосудах в тепличных условиях с естественной сменой дня и ночи, температура воздуха поддерживалась в пределах 24-28°C. В качестве субстрата использовали смесь, в составе которой содержалась почва, обогащенная перегноем, кокосовый койр и речной песок в соотношении 1:1:0,1. Вегетационные сосуды были помещены в резервуары с водой для имитации условий выращивания риса. Долив воды осуществляли ежедневно. Измерение фотосинтетической активности проводили с помощью инфракрасного газоанализатора Li-COR 6400 (США). Условия проведения измерений – ФАР 1600 мкмоль/м² с, температура 25°C внутри камеры, естественный уровень влажности и содержания углекислого газа. Содержание фотосинтетических пигментов определяли спектрофотометрически в 80% ацетоновом экстракте, используя планшетный спектрофотометр Infinity 200 pro (Tecan), расчет содержания пигментов проводили по Lichtenthaler (1987).

Для моделирования условий засухи растения подвергали десикации. Навески листьев помещали в чашки Петри с водой в качестве контроля и без нее в опыте. Экспозиция составляла 5 часов. Уровень ПОЛ в контрольных и опытных вариантах определяли спектрофотометрически по количеству ТБК-реагирующих продуктов. Измерения проводили в 5-6 биологических повторностях.

Самый высокий уровень фотосинтетической активности обнаружен у *Oryza nivara* (16±1,5 мкмоль/м²*с), а самый низкий у сорта «Дальневосточный» (7,5±1,1 мкмоль/м²*с). Два других сорта обладали примерно одинаковой интенсивностью фотосинтеза («Каскад» 9,5±1,6 и «Ханкайский» 10,2±1,1 мкмоль/м²*с). Содержание хлорофилла а было наименьшим у сорта «Каскад» (4,4±0,3 мг/г сух.массы), у сортов Дальневосточный и Ханкайский составило 5,4±0,3 и 5,1±0,1 мг/г сух.массы, соответственно, а у дикого предка в 2 раза больше, чем у культурных сортов – 10,2±1,83 мг/г сух.массы. Содержание хлорофилла b и каротиноидов у сортов почти не отличалось.

Культурные формы риса обладали большей устойчивостью к засухе, чем их предок. Количество продуктов ПОЛ у дикого вида после десикации составило 40 мкМ ТБКРП/г сыр.массы. Самым устойчивым оказался сорт «Дальневосточный» – 20 мкМ ТБКРП/г сыр.массы. Сорта Каскад и Ханкайский оказались менее засухоустойчивыми (24 и 30 мкМ ТБКРП/г сыр.массы, соответственно).

Так дикий предок риса, обладающий большей фотосинтетической активностью и содержащий больше пигментов, оказался менее устойчив к засухе, чем культурные сорта. Рис сорта «Дальневосточный», проявивший устойчивость к десикации, напротив, обнаруживал низкую фотосинтетическую активность. Такая тенденция хорошо известна селекционерам – отбор на продуктивность и высокую фотосинтетическую активность часто ухудшает устойчивость растений, и наоборот.

Фотосинтетические пигменты: эволюция, функционирование и экология

Дымова О.В., Головки Т.К.

Институт биологии ФИЦ Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук.
Коммунистическая ул., 28, Сыктывкар, Россия.
dymovao@ib.komisc.ru

Исследования фотосинтетических пигментов имеют 200-летнюю историю. Согласно современным представлениям пигменты занимают центральное место в фотосинтезе, без них невозможно поглощение и запасание световой энергии. Хлорофилл *a* присутствует у всех известных эукариотических фотосинтетиков, среди прокариот обнаружен только у цианобактерий. Хлорофилл *b* — дополнительный пигмент высших растений и водорослей, является основным светособирающим пигментом большинства эукариот, за исключением красных и бурых водорослей. Наша планета буквально покрыта хлорофиллом, встроенным в сопрягающие мембраны фотосинтезирующих клеток. Ежегодно на планете трижды обновляется 300 млн.т хлорофилла, синтезируется около 100 млн.т каротиноидов. В тилакоидных мембранах хлоропластов они образуют пигмент-белковые комплексы, объединенные в светособирающие антенны, функционально сопряженные с реакционным центром фотосистем. К настоящему времени исследованы спектральные свойства, пути биосинтеза и функции фотосинтетических пигментов, разработана концепция пигмент-белковых комплексов, выявлены защитные и фотопротекторные свойства каротиноидов. Осуществляемая с участием ксантофиллового цикла тепловая диссипация энергии способствует поддержанию баланса между поглощением и использованием энергии в фотосинтезе, предотвращает развитие фотоокислительного стресса и фотодинамического повреждения фотосинтетического аппарата (ФСА). Количественная оценка содержания и качественный состав пигментов, изменение их соотношения являются важным и чувствительным показателем физиологического состояния растений и их ФСА, направленности приспособительных реакций при воздействии стресс-факторов. Пластичность и адаптивность пигментного аппарата — существенный фактор устойчивости растений, которые выработали в процессе эволюции несколько линий защиты от повреждения ФСА и нарушения баланса между световыми реакциями и фотосинтетическим метаболизмом углерода. К защитным механизмам относятся изменения ориентации листьев и хлоропластов, мезоструктуры, числа антенных пигментов и локализации светособирающих комплексов, синтез фотозащитных пигментов.

На наш взгляд, перспективы дальнейших исследований лежат в области изучения молекулярно-генетических механизмов регуляции биосинтеза, особенностей структурно-функциональной организации пигмент-белковых комплексов (ПБК) фотосинтезирующих организмов, стоящих на разных ступенях эволюции (от бактерий до разных таксонов растений). Особый интерес представляют экологические аспекты, связанные с выявлением нарушений и/или адаптивных изменений пигментных систем под влиянием стресс-факторов разной природы, глобальных и региональных климатических изменений. Внимание следует уделить дальнейшей разработке методов, основанных на применении пигментных индексов для оценки стока углерода, дистанционной оценки состояния растительного покрова, прогнозирования урожайности. Далеко не исчерпаны возможности биотехнологии пигментов, их применения в качестве биологически активных соединений для поддержания здоровья и активного долголетия, использования пигментов и их производных как фотосенсибилизаторов в диагностике и лечении заболеваний. Нельзя исключить в будущем создания искусственных систем, способных реализовать фотофизический и фотохимический этапы фотосинтеза, где ключевую роль сыграют синтетические аналоги пигментов. Все это требует продолжения углубленных исследований растительных пигментов.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственных заданий ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН (регистрационный номер АААА-А17-117033010038-7).

Фуллеренол повышает устойчивость растений *Cucumis sativus* к недостатку цинка

Битюцкий Н.П. *, Яконен К.Л. *, Семенов К.Н. **

* Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, Россия.

** Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,
ул. Льва Толстого, 6-8, Санкт-Петербург, Россия.
bityutskii@mail.ru

Цинк (Zn) необходим для роста и развития растений. Этот микроэлемент – компонент или активатор множества ферментов/структур, участвующих в разнообразных метаболических процессах. Цинк вовлечен в интеграцию мембран, белковый синтез, фотосинтез, регуляцию транскрипции и трансляции, передачу сигналов, обмен ауксинов, защиту клеток от окислительного стресса. Заторможенный рост, короткие междоузлия, хлороз и крапчатость листьев – типичные визуальные симптомы недостатка цинка у растений. Дефицит цинка у сельскохозяйственных культур снижает урожай и качество растениеводческой продукции. Заболевание широко распространено, особенно у растений, произрастающих на супесчаных и карбонатных почвах с характерным для них низким содержанием доступных форм цинка. Поэтому разработка способов повышения устойчивости растений к недостатку цинка – актуальная задача физиологии растений и агрохимии.

Фуллеренол (гидроксильированная форма фуллерена) представляет собой углеродный наноматериал с уникальными свойствами. Биологический потенциал фуллеренола обусловлен его способностью присоединять радикалы, проникать через клеточные мембраны и модулировать транспорт ионов. Однако роль фуллеренола в оптимизации минерального питания растений практически не изучена. Цель работы – охарактеризовать влияние фуллеренола на устойчивость растений к дефициту цинка.

Растения огурца (*Cucumis sativus* L.) выращивали в условиях гидропоники при искусственном освещении. Дефицит цинка ($-Zn$) создавали путем исключения его источника (сульфата цинка, 1 мкМ/л) из состава питательного раствора после предварительного выращивания растений в течение 7 дней на растворе с цинком. Обработку растений фуллеренолом [$C_{60}(OH)_{22-24}$] осуществляли двумя способами. Первый способ (оценка последствий): фуллеренол вносили в питательный раствор на этапе предобработки растений цинком и исключали из раствора на этапе моделирования условий дефицита цинка. Второй способ (оценка действия): внесение фуллеренола в питательный раствор на этапе моделирования условий дефицита цинка. Конечные концентрации фуллеренола в растворах – 1 и 2 мг/л. Контролируемые параметры: сухая масса листьев, стеблей и корней; содержание хлорофилла в листьях (SPAD); показатели флуоресценции хлорофилла (F_v/F_m , F_v/F_m' , ETR); концентрация цинка в ксилемном соке, концентрация различных макро- и микроэлементов в органах растений. Интенсивность пероксидного окисления липидов (ПОЛ) в листьях оценивали по концентрации малонового диальдегида (МДА). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета SPSS (версия 27), апостериорный критерий – SNK, $P < 0,05$.

Исключение цинка из состава питательного раствора вызывало появление у растений типичных симптомов дефицита этого микроэлемента: заторможенный рост, дисбаланс элементов питания, хлороз и пятнистость листьев, снижение в листьях скорости транспорта электронов и увеличение концентрации МДА. После добавления в питательный раствор фуллеренола заболевание протекало в более легкой форме. По сравнению с контролем ($-Zn$) у обработанных фуллеренолом растений ксилемный транспорт цинка из корней в побег усиливался, сухая биомасса побегов возрастала, содержание в молодых листьях хлорофилла увеличивалось, а МДА уменьшалось. Последствие фуллеренола (первый способ внесения) проявлялось в уменьшении вызываемых недостатком цинка окислительных повреждений липидов в листьях. При этом другие показатели растений существенно не менялись, возможно, из-за чрезмерно низкого содержания в корнях остаточных количеств фуллеренола, адсорбированных в период предобработки проростков. С одной стороны, положительные эффекты фуллеренола могут быть обусловлены его стимулирующим влиянием на ремобилизацию цинка в корнях. В водных растворах мы регистрировали образование отрицательно заряженных ассоциатов фуллеренола с цинком. В корнях такая ассоциация с фуллеренолом могла ослаблять связи цинка с клеточными стенками и увеличивать его мобильность до заметного на фоне недостатка этого микроэлемента уровня. С другой стороны, фуллеренол – антиоксидант, он мог прямо или же косвенно через усиление антиоксидантной защиты самого растения уменьшать уровень окислительного стресса, возникавшего у огурца при недостатке цинка.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта № 19-016-00003а.

Функциональная активность мха *Sphagnum riparium* в ранневесенний период вегетации

Марковская Е.Ф., Грищенков Д.С.

Петрозаводский государственный университет. пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия.
volev10@mail

Работа выполнена на болотной территории побережья о. Чапай-ламба, Пряжинский район, Карелия. Цель работы: исследовать фотохимическую активность фотосинтетического аппарата побегов в ранневесенний период (апрель) у широко распространенного вида *Sph. riparium*. Метод – исследование флуоресценции хл. а полевым прибором – РАМ-3. Исследовали световые кривые интенсивности флуоресценции хл а при температуре 14°C в диапазоне освещенности от 60 до 1150 мкмоль. Всего было сделано около 150 измерений и только на 35 растениях значение потенциального квантового выхода флуоресценции (F_v/F_m) оказалось выше 0.60 и эти условия позволили получить световые кривые. Из 150 измеренных побегов оказалось, что только около 30% растений находится в оптимальном функциональном состоянии и значения максимальной квантовой эффективности находятся в оптимальном для этих условий диапазоне (0.60-0.73). Работа выполнена на веточных побегах, которые оказались наиболее активны в местах перехода побега текущего года жизни и предыдущего. Первичная обработка данных показала, что от 60 до 20% поглощенной энергии уходит на процесс фотосинтеза (фотохимическую работу (qp) и эта величина зависит от освещенности (при высокой освещенности 1150 мкмоль – снижается до 20%, а при низкой – мб и 80%). Процесс фотосинтеза коррелирует с таким показателем как скорость транспорта электронов (ETR) и эта величина в зависимости от интенсивности света может варьировать (от 8 до 50, а в единичных случаях до 100 мкмоль; максимальные значения так же различаются (от 20 до 100), то есть отдельные растения могут формировать ассимиляционный аппарат разной активности, что зависит от условий. Очень важное место занимает нефотохимическое тушение – та часть интенсивности света, которая не идет на фотосинтез, а излучается в виде тепла. Мы получили, что у мхов эта величина меньше 1 даже при высоких освещенностях (0.3-0.7) и только у 6 наиболее активно фотосинтезирующих растений были получены более высокие значения (1.1-1.7). Этот результат свидетельствует о высокой продуктивности фотосинтеза в этот ранневесенний период у растений основной моховой дернины. Поглощенный свет с высокой эффективностью тратится на фотосинтез. Работа моховых растений в этот период разнонаправленная – нужно вырастить новую часть растения, сформировать новый ассимиляционный аппарат и сформировать репродуктивные органы. Полученные в работе данные свидетельствуют о высокой эффективности работы растений мха *Sph. riparium*, которая прежде всего зависит от условий его произрастания.

Функциональная роль EST микросателлитных маркеров *Pinus sylvestris* L.

Гуляева Е.Н., Тарелкина Т.В., Галибина Н.А.

Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук».
Пушкинская ул., 11, Петрозаводск, Россия.
gln7408@gmail.com

Микросателлиты или SSR - тандемные ДНК повторы, состоящие от одной до шести пар нуклеотидов. Данные повторы широко распространены в кодирующих и не кодирующих белок областях генома эукариот и используются в качестве генетических маркеров для молекулярно-генетического картирования, маркер-контролируемой селекции, исследований генетического разнообразия и филогении близкородственных таксонов, в связи с их высокой скоростью мутаций. Наибольший интерес представляют SSR маркеры, разработанные с помощью EST библиотек, находящиеся в генах, кодирующих белки. Известно, что присутствие SSR в кодирующих областях, приводит к аминокислотным изменениям, что может вызывать либо усиление, либо потерю функции, в то время как расположение их в нетранслируемых областях (5'UTR и 3'UTR) может оказывать влияние на трансляцию и сплайсинг. Таким образом, EST-SSR, расположенные в кодирующих генах могут дать функциональную информацию об областях генома, связанных с изменениями признаков, что может быть полезно для изучения эволюционного, фенотипического и функционального разнообразия видов и популяций.

На сегодняшний день для *Pinus sylvestris* L. известно около 70 ядерных микросателлитных маркеров, из которых 49 относится к ядерным EST-SSR маркерам. Однако комплексных исследований по идентификации потенциальной функциональной роли и их местоположению в гене не проводилось. Цель данного исследования - определить потенциальную функцию известных в литературе EST-SSR маркеров *Pinus sylvestris*.

Для анализа были отобраны 44 EST-SSR маркера, которые широко применяются для внутривидовых, популяционных и филогенетических исследований *P. sylvestris*. Поиск генов *P. sylvestris*, в которых находятся микросателлитные последовательности, проводили с помощью базы данных GenBank по присвоенному для них коду. Полученные гены были использованы в качестве поискового запроса BLASTX для выравнивания всех возможных транслятов нуклеотидной последовательности против банка аминокислотных последовательностей по базам данных PLAZA Gymnosperms, Congenie.org и Phytozome database. Был проведен поиск аминокислотных последовательностей белков *P. sylvestris*, а также *Pinus taeda* L., *Picea abies* (L.) H.Karst. и *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. для поиска гомологичных последовательностей. Значение E было ограничено до $1E-3$. Филогенетический анализ был проведен с использованием программы MEGA 7. Множественное выравнивание было выполнено с помощью ClustalW. Филогенетическое древо конструировали с помощью метода присоединения ближайшего соседа (Neighbor-Joining method) на основе модели коррекции Пуассона с 1000 повторами bootstrap. Определение процента идентичности/сходства белков *P. sylvestris*, *P. taeda*, *P. abies* и *A. thaliana* было выполнено в EMBOSS Needle.

Было обнаружено, что тридцать две нуклеотидные последовательности генов, содержащие SSR, кодируют аминокислотные последовательности белков для *P. sylvestris*. Эти последовательности продемонстрировали гомологию с белковыми последовательностями из *P. taeda*, *P. abies* и *A. thaliana*. Для двадцати пяти аминокислотных последовательностей белков были определены потенциальные функции. Потенциальные функции были в основном связаны с ионной связью, окислительно-восстановительными процессами и др. Таким образом, полученные данные могут внести вклад в изучение внутривидовой и популяционной изменчивости *P. sylvestris*, произрастающей в естественных и искусственных насаждениях.

Исследование выполнено за счет средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН.

Функционирование фотосинтетического аппарата томатов при фузариозном увядании

Пишбытко Н.Л.

Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, Минск, Беларусь.
pshybytko@bsu.by

Исследованы механизмы патогенеза растений томата после заражения *Fusarium oxysporum*. Установлено, что гибель растений при фузариозном увядании наступает в результате окислительного стресса, индуцированного водным дефицитом и токсинами *Fusarium oxysporum*. Выявлена как сигнальная, так и деструктивная функции пероксида водорода при данном виде стресса, повышение уровня которого активизирует накопление протекторных веществ и PR-белков.

Показано два типа подавления фотосинтетической активности растений томата при фузариозном увядании. При медленном увядании наблюдалось изменение протекания как световой, так и темновой стадий фотосинтеза: падала эффективность реакций светосбора, разделения зарядов в реакционном центре ФС2, подавлялся электронный транспорт на акцепторной стороне ФС2, снижалась активность РБФК. В случае быстрого увядания наблюдалось подавление фотохимической активности хлоропластов. При этом снижение скорости линейного электронного транспорта в листьях томатов было обусловлено, главным образом, ингибированием электронного потока на акцепторной стороне ФС2, изменением редокс-состояния пластохинонового пула.

Корневая предобработка растений томата H_2O_2 в малых концентрациях приводит к повышению уровня эндогенного пероксида водорода и повышает устойчивость растений к *Fusarium oxysporum*, препятствуя развитию водного дефицита, снижая скорость деструктивных процессов и активизируя протекторные системы и синтез защитных белков. Показана взаиморегуляция уровня пероксида водорода и редокс-состояния пластохинонового пула при развитии патогенеза и предобработки растений пероксидом водорода.

Характеристика фотосинтеза растений *Arabidopsis thaliana*, с нокаутом хлоропластной альфа-карбоангидразы 2

Надеева-Журикова Е.М., Игнатова Л.К., Руденко Н.Н., Ветошкина Д.В., Найдов И.А., Иванов Б.Н.

Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований РАН» – обособленное подразделение Институт фундаментальных проблем биологии РАН.
Институтская ул., 2, Пушкино, Московская область, Россия.
zhurikova-alena@yandex.ru

Карбоангидраза (КА) представляет собой цинксодержащий фермент, который катализирует обратимую гидратацию углекислого газа $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. Функции многих КА растительной клетки до сих пор неясны. В тилакоидной мембране было обнаружено несколько источников КА активности (Игнатова и др. 2007). Мы предполагаем, что одну из этих активностей проявляет альфа-КА2, отсутствие которой значительно влияет на параметры фотосинтеза *Arabidopsis thaliana*. Наша работа посвящена определению функции и местоположения альфа-КА2 в растительной клетке.

Эксперименты проводили на растениях *A. thaliana* дикого типа (ДТ) и мутантных растениях с нокаутированным геном *At2g28210*, кодирующим альфа-КА2 (две гомозиготные линии 9-11 и 8-3). Растения выращивали с 8-часовым фотопериодом при интенсивности света 50 мкмоль квантов/м²с и концентрации CO_2 400 ppm.

Для оценки эффективности функционирования фотосинтетической электрон-транспортной цепи растений, мутантных по альфа-КА2, при краткосрочном действии света разной интенсивности (23, 435 и 833 мкмоль квантов м²/с) с помощью Dual-PAM были измерены параметры флуоресценции хлорофилла *a* неотделенных листьев и окислительно-восстановительное состояние P700 в сравнении этих параметров с параметрами растений ДТ. Регистрировали все параметры, подавая вспышку насыщающего света на 40, 60 секундах освещения действующим светом, а также перед выключением света на 7-ой минуте освещения. При освещении 23 мкмоль квантов м²/с эффективный квантовый выход ФС2 (YII) в первую минуту освещения у обеих линий мутанта по альфа-КА2 был выше, чем у ДТ. Нефотохимическое тушение (НФТ) (NPQ) у мутанта было значительно ниже, чем у ДТ, в первую минуту освещения. При стационарном фотосинтезе разница в показателях YII, NPQ между мутантом и ДТ исчезала. Возможно, НФТ у мутантов медленнее развивается, чем у ДТ, в начале освещения светом низкой интенсивности. Отличий в эффективном квантовом выходе ФС1 YI мутанта от ДТ не было выявлено. При интенсивности света 435 мкмоль квантов м²/с YII у мутанта был значительно больше, чем у ДТ и в первую минуту освещения, и при достижении стационарного фотосинтеза. При этом NPQ у мутанта в первую минуту освещения было выше, чем у ДТ, а к концу освещения становилось таким же, как и у ДТ. При 833 мкмоль квантов м²/с YII у мутанта был несколько выше, чем у ДТ в течение всего освещения, а NPQ мутанта и ДТ не отличалось. Интересно, что при 435 и 833 мкмоль квантов м²/с YI при стационарном фотосинтезе у мутанта был на 10-20% выше, чем у ДТ. Эти данные хорошо согласуются с уже опубликованными данными по скорости ассимиляции CO_2 листьями – после 7 минут освещения 460 мкмоль квантов м²/с у мутанта она была на 30-50% выше, чем у ДТ (Журикова и др. 2016). Вероятно, альфа-КА2 важна для поддержания оптимального протекания фотосинтеза именно в начале освещения, когда ферменты цикла Кальвина-Бенсона ещё не полностью активированы и возникает необходимость в регуляции содержания протонов в люмене тилакоидов.

Измерение параметров ОЛР кинетики показало, что параметр Sm, характеризующий емкость пула пластохинона, у мутанта был выше на 15-20%, чем у ДТ. Параметр delta(Ro) отражающий вероятность, с которой электрон от переносчиков между двумя фотосистемами восстанавливает крайние акцепторы электрона на акцепторной стороне ФС1, у мутанта был выше, чем у ДТ на 15-20%, что может свидетельствовать о том, что относительный уровень восстановления пула пластохинона у мутанта ниже, из-за более интенсивного оттока электронов к ФС1. При этом параметр Pi total, показатель функциональной активности ФС 2, ФС 1 и цепи переноса электронов между ними, был у мутанта выше, чем у ДТ.

Для того чтобы оценить влияние отсутствия альфа-КА2 на состояние других КА в клетке, нами был измерен уровень экспрессии цитоплазматических – бета-КА2 и бета-КА3, стромальных – бета-КА1 и альфа-КА1, тилакоидной – альфа-КА4 и люменальной – бета-КА5 в мутантных растениях по альфа-КА2. Обнаружено, что отсутствие альфа-КА2 почти не сказывается на уровне экспрессии цитоплазматических КА, при этом уровни экспрессии стромальной альфа-КА1 и тилакоидной альфа-КА4 были значительно выше в мутанте, чем в ДТ, а уровни экспрессии стромальной бета-КА1 и люменальной бета-КА5 значительно ниже в мутанте, чем ДТ.

Влияние отсутствия альфа-КА2 на уровень экспрессии других хлоропластных КА и параметры фотосинтеза позволяет предполагать не только функциональную связь между ними, но и присутствие ее в хлоропластах. Повидимому, альфа-КА2, альфа-КА1 и альфа-КА4 функционируют взаимосвязано, участвуя в подстройке фотосинтетического аппарата к постоянно изменяющимся внешним условиям.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-14-01371

Хитиназа-подобные белки в корнях гороха, индуцируемые салициловой кислотой

Егорова А.М.

Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ Казанский научный центр РАН,
Лобачевского ул., 2/31, Казань, Россия.
egorova@kibb.knc.ru

Салициловая кислота (СК) – фитогормон, являющийся одним из ключевых факторов фитоимунитета. При атаке патогенов в тканях растений происходит повышение содержания СК, запускается СК-зависимый сигнальный каскад, приводящий к изменению экспрессии генов и синтеза белков. Хорошо изучен ответ надземных органов и тканей растений в ответ на действие СК. Показано, что СК в надземных органах вызывает синтез защитных белков, одними из которых являются хитиназы и глюканазы, действие которых направлено непосредственно против патогенов.

Ответ корней растений на действие СК изучен в меньшей степени, не смотря на их важнейшую роль в жизни растений. Кроме того, корни находятся в постоянном контакте с микроорганизмами ризосферы и проблема взаимоотношений растений с почвенными микроорганизмами представляет чрезвычайный интерес как для теории, так и для практики. СК участвует в этих взаимоотношениях и получение информации об изменении белков корней под влиянием СК представляется важной задачей. Индукция хитиназ СК была охарактеризована у многих видов растений, но, главным образом, на примере их надземных органов. Лишь в нескольких работах в корнях показана индукция хитиназ салицилатом.

Ранее нами были выявлены и идентифицированы белки корней гороха, содержание которых изменяется при действии СК. Белками, синтез которых активируется СК уже через 12 ч действия и содержание которых наиболее значительно повышается при действии СК в корнях гороха являются четыре белка с мол массой 34-35 кДа и pI 4.4-4.7. Использование меченых ¹⁴C-аминокислот позволило выяснить, что СК активирует синтез этих белков, поскольку именно в эти белки происходило включение практически 1/3 всех меченных ¹⁴C аминокислот.

В этих СК-индуцируемых белках были идентифицированы пептиды, которые позволили отнести их к хитиназам гликозид гидролаз семейства 18, к которым принадлежат также хитиназы из других представителей бобовых – нута (*Cicer arietinum*), люцерны (*Medicago truncatula*). Поиск по базе данных транскриптов гороха (<https://urgi.versailles.inrae.fr/blast/>) на основе идентифицированных пептидов позволил выявить транскрипт Psatlg147600, который, по всей вероятности, кодирует по крайней мере один из этих белков.

Биоинформационный анализ первичной структуры белка кодируемого Psatlg147600 показал, что он имеет мол массу 33.5 кДа и pI 4.76, что соответствует данным, полученным нами с использованием двумерного электрофореза. Анализ доменной организации белка в NCBI Conserved domain показал, что белок, кодируемый транскриптом Psatlg147600 относится к GH18-хитиназа-подобному суперсемейству белков. GH18 хитиназы описаны в грибах, бактериях, вирусах, растениях и насекомых и участвуют в защитных реакциях, патогенезе, морфогенезе. Кроме того, белок, кодируемый Psatlg147600 имеет сходство с глобулинами – запасными белками семян бобовых. Анализ экспрессии гена, кодирующего этот белок показал, что его активация происходит уже через 6 часов действия СК и многократно повышается при ее продолжающемся действии. Анализ хитиназной активности показал, что исследуемые нами белки не проявляют хитиназную активность в отношении использованного субстрата - гликоль хитина. Это может быть связано с аминокислотной заменой в каталитическом центре белка, что позволяет отнести их к хитиназа-подобным белкам.

Следует отметить, что в специально проведенных опытах мы не обнаружили СК-индуцируемых хитиназ подобных гороховым в корнях однодольных растений риса и пшеницы и в корнях двудольных бобовых растений сои и фасоли. Таким образом, нами были выявлены и идентифицированы не известные ранее СК индуцируемые хитиназа-подобные белки в корнях гороха. То, что синтез выявленных нами белков многократно возрастает именно при действии СК, участвующей в защитных реакциях растений, говорит об их важной роли в ответе корней растений гороха.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 20-016-00238а.

Хроническое облучение приводит к изменению работы антиоксидантной системы популяций травянистых растений, произрастающих в зоне отчуждения ЧАЭС

Казакова Е.А., Манухина Я.А., Подобед М.Ю., Шестерикова Е.М., Пишенин И.А., Волкова П.Ю.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии».
Киевское шоссе, 109 км, Обнинск, Россия.
elisabethafeb19@gmail.com

Одним из важных шагов, которые приведут к сохранению стабильного существования природных экосистем, является изучение механизмов адаптации популяций растений к существующим в настоящее время уровням антропогенного загрязнения. Сегодня, популяции травянистых растений, произрастающие на территориях, загрязнённых радионуклидами в результате аварии на Чернобыльской АЭС, подвергаются хроническому облучению. Изучение ответа антиоксидантной системы таких популяций на хроническое низкодозовое радиационное воздействие поможет понять, как они адаптируются к сложившимся условиям произрастания. Летом 2019 года в зоне отчуждения ЧАЭС в Полесском радиационно-экологическом заповеднике Республики Беларусь были заложены три экспериментальных и два контрольных участка. Для всех участков оценена радиационная обстановка (мощность амбиентной дозы, плотность потока β -, α -частиц, удельные активности радионуклидов ^{137}Cs , ^{90}Sr , ^{241}Am в почве). Проведён расчёт поглощённых растениями доз. Для анализа ферментной и неферментной компонентов антиоксидантной системы на каждом участке были отобраны листья *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik., *Trifolium repens* L., *Taraxacum officinale* (L.) Webb., *Dactylis glomerata* L. и *Aquilegia vulgaris* L.

Установлено, что экспериментальные участки в зоне отчуждения ЧАЭС заложены на контрастных по уровню и спектру радиоактивного загрязнения территориях. Рассчитанные поглощённые растениями дозы на загрязнённых участках варьируют от 36 до 301 мкГр/сут, в контролях от 4,8-14,7 мкГр/сут.

В изучаемых популяциях травянистых растений спектрофотометрическим методом проведена оценка активности антиоксидантных ферментов каталазы (CAT), глутатионпероксидазы (GPX), аскорбатпероксидазы (APX), гваяколовой пероксидазы (POX), супероксиддисмутазы (SOD); методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии определены концентрации низкомолекулярных антиоксидантов: глутатиона окисленного (GSSG), глутатиона восстановленного (GSH), аскорбиновой кислоты (AsA), а также маркера окислительного стресса малонового диальдегида (МДА). По полученным результатам для каждого вида растений построены обобщающие схемы работы антиоксидантной системы. Выяснено, что выраженность и направленность установленных изменений зависела от исследуемого вида, мощности поглощённой дозы и, вероятно, спектра дозообразующих радионуклидов.

В популяциях *T. repens* выявлена самая выраженная реакция антиоксидантной системы в отличие от других изучаемых видов растений. Наряду с повышением клеточного уровня AsA на двух загрязнённых участках (121 и 131 мкГр/сут) по сравнению с контролем (6,9 мкГр/сут) ($p=0,049$), в изучаемых популяциях клевера возростала активность APX на загрязнённом участке (121 мкГр/сут) по сравнению с контрольным участком (4,8 мкГр/сут) ($p = 0,009$). Установлено, что CAT, POX и GPX, поддерживающие баланс клеточного пероксида водорода в растениях, статистически значимо ($p < 0,5$) увеличивают свою активность на радиоактивно загрязнённом участке (131 мкГр/сут) по сравнению с контролями. Интересно, что на этом участке (131 мкГр/сут) в момент пробоотбора, наблюдалось снижение тургора листьев растений клевера из-за высокой температуры, что не было отмечено для других популяций. При этом на описываемом участке отмечены достаточно высокие по сравнению с контролями уровни загрязнения и существует корреляция некоторых показателей (POX и GSSG) с мощностью поглощённой дозы. Следовательно, можно предположить, что облучение, внесло значительный вклад в модуляцию работы антиоксидантной системы этой популяции *T. repens*.

В популяции *D. glomerata* выявлено статистически значимое по сравнению с контролями снижение работы GSH, POX, SOD ($p < 0,05$). Только активность GPX на загрязнённом участке (106 мкГр/сут) значимо увеличилась по сравнению с контролем (6,9 мкГр/сут) ($p=0,047$). В популяции *T. officinale* обнаружено увеличение активности ферментов CAT, POX на загрязнённом участке (193 мкГр/сут), увеличение концентрации МДА характерно для участков 106 мкГр/сут и 193 мкГр/сут ($p < 0,05$). В популяциях *C. bursa-pastoris* наблюдалось повышение концентраций МДА и снижение активности GPX на загрязнённом участке (36 мкГр/сут) по сравнению с контролем (6,9 мкГр/сут) ($p < 0,05$). В популяциях *A. vulgaris* из всех изучаемых показателей выявлено только увеличение активности GPX на загрязнённом участке (219 мкГр/сут) в сравнении с контролем (6,9 мкГр/сут).

Таким образом, хроническое облучение приводит к изменению работы антиоксидантной системы популяций травянистых растений, произрастающих в зоне отчуждения ЧАЭС. Полученные в этой работе данные в совокупности с нашими текущими исследованиями популяций травянистых растений с применением омикс-технологий позволят выяснить механизмы действия хронического облучения на популяции растений, что поможет разработать методы биологического мониторинга, позволяющие сохранить среду обитания человека.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-20012.

Цветок лилии (*Lilium L.*): факторы развития и сохранения декоративных качеств

Панфилова О.Ф., Пильщикова Н.В.

Российский государственный аграрный университет-МСХА имени К.А. Тимирязева.
Тимирязевская ул., 49, Москва, Россия.
Panfilova.of@yandex.ru

Одним из приоритетных направлений современной биологии является физиология продовольственных и цветочных культур в послеуборочный период и ее приложение к решению практических задач. Особое значение имеет сохранение качества цветочной продукции. При этом на первый план выходит скрытое качество – продолжительность жизни цветов в срезке. Это связано с удлинением цепи распределения цветочной продукции. Неблагоприятными последствиями нарушения целостности растения являются отсутствие поступления питательных веществ, закупорка сосудов, изменение гормонального баланса и метаболизма. Качество срезки цветов определяется сохранением декоративных качеств цветков и листьев. Лепестки являются уникальной и слабо еще используемой модельной системой изучения процессов старения и запрограммированной смерти растительной клетки. Изучение механизмов регуляции жизни цветка имеет практическое значение для разработки путей сохранения декоративных качеств срезанных цветов.

Исследования проводили на облиственных цветущих побегах лилии (*Lilium L.*) азиатской группы гибридов Kindom с белыми цветками, Tribal Kiss и Marlene с нежно-розовыми цветками, Golden stone и Monaco с звездчатыми желтыми цветками, в центре густо усыпанными вишневыми крапинками. Для синхронизации изучения цветков их развитие разделено на 7 стадий. У цветка 1 стадия соответствует плотному бутону с пигментацией внешнего кольца околоцветника, 2 – открыванию бутона, 3 и 4 – открыванию пыльников внешнего и внутреннего колец при полном открытии околоцветника, 5 и 6 – появлению и развитию видимых признаков старения околоцветника, 7 – осыпанию лепестков. Взятие проб осуществляли на 1, 3, 4, 5, 6 стадиях развития цветка.

Существует строгий временной контроль развития цветка. У изученных гибридов лилии из очень плотных зеленых с окружностью 4-4,5 см бутонов в течение 8-10 дней формируются готовые лопнуть ярко окрашенные бутоны с длиной окружности 8-9 см. Открывшийся цветок имеет диаметр 12-14 см с более ярко окрашенными лепестками наружного кольца. Развитие цветка сопровождается изменением его формы. Воронковидные и звездчатые цветки к 6 этапу делаются более плоскими, окраска бледнеет, лепестков утончаются и закручиваются вниз. При этом лепестки внутреннего и наружного кольца различаются по темпам накопления и разрушения пигментов, изменению массы. Лепестки наружного кольца более крупные и ярко окрашены до полного открытия околоцветника. На белых лепестках на 5 стадии появляются прозрачные пятна. Опадают целиком прозрачные лепестки. Цвет окрашенных лепестков усиливался до 3-4 стадий развития цветка. Это свидетельствует о накоплении флавоноидов, обладающих антиоксидантной активностью. После 5-6 стадий на желтых и розовых лепестках наблюдалось появление бледных пятен, что связано с разрушением каротиноидов и хромопластов, нарушением тонопласта и выходом антоцианов из вакуолей. Наблюдаемое утончение лепестков при старении связано с запрограммированной гибелью клеток мезофилла. Клетки эпидермиса, особенно нижнего, дольше сохраняют жизнеспособность. Более ускоренное старение мезофилла по сравнению с эпидермисом, вероятно, связано с ремобилизацией веществ. Установлено, что клетки мезофилла и эпидермиса принадлежат к различным многоклеточным доменам, только внутри которых клетки связаны плазмодесмами. Более раннее старение мезофилла может быть объяснено различием во времени сигнала старения в разных доменах. Время от раскрытия цветка до старения является для конкретного вида очень постоянным, что указывает на жесткий временной контроль, который может быть связан с циркадными часами. У этилен чувствительных растений запуском процесса старения является сигнал опыления, но это дополнительный уровень управления. Первичным, вероятно, является регулирование ремобилизации веществ и сохранение тонопласта. Наблюдаемое усиление выхода веществ на 3-4 стадии развития цветка, когда нет еще видимых признаков старения лепестков, свидетельствует о важной роли тонопласта в запрограммированной гибели клеток. Видимые признаки ухудшения декоративных качеств у Kindom с белыми цветками появляются на 8-9 день, у цветков с окрашенными лепестками – на 10-12 день. Они проявляются в увядании лепестков, которое, как правило, отражает гибель клеток эпидермиса. Начинаются увядание и другие симптомы старения с кончиков и прогрессирует к основанию лепестков. Происходит это при снижении сухой массы на 30-32 %, что свидетельствует о неполной ремобилизации веществ. Развиваемые представления указывают на сложность интерпретации данных исследования процессов начала и прогресса старения, которые обычно проводятся на уровне целых лепестков, включающих в себя клетки, которые находятся в различных стадиях старения. Это более заметно на крупных лепестках лилии. В лепестках, также как и в листьях, вблизи флоэмы клетки остаются живыми в течение значительно более длительного времени. Более точные данные о регуляции и ходе процессов можно получить путем анализа клеток, которые находятся на одной стадии старения. Желательно также, чтобы детальный анализ состава и свойств мембран, содержания и распределения сахаров, активных форм кислорода включал уровень оргanelл.

**Цитогенетические исследования семенного потомства *Pinus sylvestris* L.
в растительных сообществах Северо-запада России**

Игнатенко Р.В., Раевский Б.В., Прокопюк В.М.

Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук».
Пушкинская ул., 11, Петрозаводск, Россия
ocean-9@mail.ru

Основной лесообразующей породой в бореальных фитоценозах Северо-запада России является сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.). Благодаря широкой экологической пластичности данный вид дерева способен расти в разнообразных почвенно-климатических условиях. Однако воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды может привести к различным нарушениям в организме. Одним из самых эффективных и чувствительных способов оценки влияния неблагоприятных экологических факторов на организм считается цитогенетический анализ. Он позволяет проводить контроль цитогенетической системы и ее изменений при спонтанном и индуцированном мутагенезе.

Объектом исследования являлась *Pinus sylvestris*, произрастающая в растительных сообществах среднетаежной подзоны Республики Карелия: природные популяции Хаутаваарского участкового лесничества (Суоярвский район) и Лахденпохского участкового лесничества (Лахденпохский район) (возраст деревьев 100-120 лет), а также на территории деревни Киндасово Пряжинского района (возраст деревьев 20-25 лет); искусственные насаждения – Петрозаводская лесосеменная плантация (ЛСП), располагающаяся в Прионежском районе (возраст деревьев 35-40 лет).

Для цитогенетического анализа использовали меристематические ткани кончиков корешков проросших семян. Исследуемый материал фиксировали в спиртово-уксусной смеси (3:1) в течение суток. Для подсчета числа хромосом перед фиксацией материал обрабатывали 1% водным раствором колхицина в течение 5 ч, окрашивали ацетогематоксилином и готовили давленные препараты по стандартным методикам. Просмотр препаратов осуществляли при помощи микроскопа «Микмед-5» (Ломо). Частоту и типы патологий митоза учитывали в метафазе, анафазе и телофазе. Данные флюоресценции изолированных ядер детектировали при помощи проточного цитофлуориметра Attune NxT (Thermo FS). В качестве стандарта для определения относительного содержания ДНК *Pinus sylvestris* использовали изолированные ядра *Triticum aestivum* L. сорт Chinese spring с известным содержанием ДНК $2C = 30,5$ пг.

Исследование корневой меристемы семенного потомства деревьев, растущих на ЛСП и в естественных фитоценозах, показало, что в диплоидном наборе содержится 24 хромосомы. У изученных растений были обнаружены единичные анеуплоидные клетки ($2n=23$; $2n=25$).

Относительное содержание ДНК у растений из естественных фитоценозов, располагающихся на территории Хаутаваарского и Лахденпохского участковых лесничеств, в среднем составило $42,6 \pm 0,72$ пг и $42,2 \pm 0,04$ пг, соответственно; у особей из д. Киндасово – $42,9 \pm 0,07$ пг. У проростков *Pinus sylvestris* с ЛСП средний уровень относительного содержания ДНК был равен $42,3 \pm 0,45$ пг.

Результаты исследования уровня хромосомных нарушений в соматической ткани показали, что наиболее высокая цитогенетическая изменчивость представлена в потомстве деревьев из природных популяций. Так, в среднем частота патологий митоза у растений из Хаутаваарского участкового лесничества составила $3,7 \pm 0,47\%$, Лахденпохского участкового лесничества – $3,3 \pm 0,46\%$, д. Киндасово – $3,1 \pm 0,48\%$, ЛСП – $2,0 \pm 0,25\%$.

Выявлены 7 типов патологий митоза: забегание хромосом, фрагментация хромосом, обособление хромосом, отставание хромосом, мосты, многополюсность, микроядра. У большинства особей наиболее распространенной патологией являлось забегание хромосом, доля которых в общем спектре патологий митоза составляла 82%. Важно отметить, что отрыв отдельных хромосом от ахроматинового веретена может способствовать потере хромосомного материала делящейся клетки.

Таким образом, из полученных данных следует, что изученные растения имеют диплоидный набор хромосом, а доля цитогенетических аномалий в клетках корневой меристемы проростков низка и не превышает пределов нормальных значений уровня спонтанного мутирования.

Исследование выполнено за счет средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН.

Цитоскелет: логистика и полярный рост растительной клетки

Медведев С.С. *, Пожванов Г.А.**

* Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, Россия.

** Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, ул. проф. Попова, 2, Санкт-Петербург, Россия.
s.medvedev@spbu.ru

Р.И. Бутенко в 1975 г. в статье «Дифференцировка и морфогенез в культуре тканей, клеток и протопластов» написала: «Отсутствие успеха в получении индуцированного морфогенеза у ряда растительных объектов часто кроется в том, что в эксперименте не всегда удается создать определенный эндогенный баланс фитогормонов в конкретном участке ткани, который, в первую очередь, зависит от физиологических градиентов, создающихся в процессе дифференцировки в естественных условиях» [1]. Сейчас можно с уверенностью утверждать, что паттернирование формирующихся органов и тканей растения и специфическая трехмерная структура организма создается с помощью инструментов полярности. Основой для дифференциальной активности генома и дифференцировки клеток и тканей растения являются, в первую очередь, процессы поляризации и возникающие при этом градиенты морфогенетических факторов. Именно благодаря полярной организации растения способны ориентироваться по отношению к вектору силы тяжести и другим векторным воздействиям, что обеспечивает их адекватную реакцию на различные раздражители [2].

При формировании физиологических градиентов (осей полярности) в растительных клетках наиболее существенное значение имеют электрическая поляризация, градиенты ионов кальция, ROP-белки, а также цитоскелет. Мембранно-скелетный комплекс растительной клетки является динамичной системой, чувствительной к уровню минеральных ионов, pH, АТФ, а также ко многим другим химическим и физическим факторам. Цитоскелет растений включает микротрубочки, состоящие из тубулина, актиновые микрофиламенты, а также миозиноподобные, и актин-связывающие белки, причем отдельные элементы цитоскелета могут сшиваться специальными белками не только между собой, но и с мембранными структурами. Относительная стабильность и лабильность мембранно-скелетного комплекса обеспечивает двойственность выполняемых им функций – поддержание/изменение формы, а также логистику клетки, под которой мы понимаем полярный (векторный) транспорт по актиновым микрофиламентам везикул, содержащих PIN-белки, белки системы Са-сигналинга, ROP-белки, ионные каналы и переносчики. Именно эта особенность цитоархитектоники позволяет эффективно контролировать становление элементов физиологической полярности клетки, полярный транспорт ауксина и полярный рост [3]. Ряд векторных сигналов, по-видимому, способен оказывать прямое поляризующее воздействие на структуру и свойства цитоскелета. К таким факторам относятся гравитация, электрические поля, изменение осмотических и ионных градиентов, механические контакты, в том числе межклеточные. Поляризующие сигналы могут влиять на цитоскелетный комплекс через изменение состояния рецепторов и ионных каналов, через локальные изменения концентрации вторичных посредников и прежде ионов Ca^{2+} и элементов его сигналинга [4]. У клеток с полярным типом роста асимметрия комплекса плазмалемма-цитоскелет проявляется в асимметричном распределении ионных каналов и ионных насосов мембраны, в векторизации ионного транспорта, секреции, генерации электрических градиентов и, в итоге, в полярном росте отдельных клеток и органов растительного организма.

В докладе будут представлены полученные в нашей группе данные о влиянии гравитостимуляции и рандомизации растений относительно вектора силы тяжести на перестройку актиновых микрофиламентов и микротрубочек в клетках корней и гипокотилей арабидопсиса [5, 6, 7]. Будет также обсуждаться действие этилена и ингибиторов его синтеза на реорганизацию актинового цитоскелета в ходе гравитропической реакции, а также взаимодействие ионов Ca^{2+} , ауксина, этилена и цитоскелета в регуляции полярного роста растительной клетки.

[1] Бутенко Р.Г. Дифференцировка и морфогенез в культуре тканей, клеток и протопластов. В сб. *Биология развития растений*. М.: Наука. 1975. 48-65. [2] Медведев С.С. Механизмы формирования и физиологическая роль полярности в растениях. *Физ. Раст.* 2012. 59 (4): 543-556. [3] Медведев С.С. Полярность и ее роль в регуляции роста и морфогенеза растений. СПб: Наука. 2013. [4] Медведев С.С. Принципы формирования и распространения кальциевого сигнала в растительной клетке. *Физ. Раст.* 2018. 65 (6): 403-417. [5] Пожванов и др. Перестройки актинового цитоскелета в ходе гравитропической реакции корней арабидопсиса. *Цитология*. 2013. 55 (1): 28-35. [6] Пожванов и др. Этилен вовлечен в реорганизацию актинового цитоскелета в ходе гравитропической реакции корней *Arabidopsis thaliana*. *Физ. Раст.* 2016. 63 (5): 624-635. [7] Pozhvanov et al. Microgravity modelling by 3D-clinorotation leads to random organization of microfilaments cytoskeleton in Arabidopsis seedlings. *Func. Plant Biol.* 2020. In press.

Работа выполнена за счет средств грантов РФФИ № 17-04-00862 и № 20-04-01041 с использованием оборудования РЦ Научного парка СПбГУ «Развитие клеточных и молекулярных технологий».

Экологические факторы и водоудерживающая способность листьев *Helianthus annuus* L. в агроценозах степи

Косогова Т.М. *, Попытченко Л.М. **, Решетняк Н.В. **

* Луганский государственный педагогический университет. Оборонная ул., 2, Луганск.

** Луганский государственный аграрный университет. Городок ЛНАУ, 8, Луганск.
kosogova@list.ru; popytchenko@mail.ru

Понятие «экологический фактор» мы рассматриваем в широком значении – вместе с понятием «экологические ресурсы» и «экологические условия». Известно, что сложность влияния экологических факторов увеличивается по причине комплексности действия. Оптимум и границы устойчивости организмов по отношению к экологическому фактору могут значительно меняться в зависимости от того, в каком соотношении и с какой силой действуют одновременно эти факторы. Все физиологические и биохимические процессы протекают лишь в определенных температурных границах и оптимальных для вида водных условиях. Исследования проводили в полевом опыте Луганского НАУ (2018– 2020 гг.). Территория Луганской области характеризуется аридными условиями, сложным геолого-гидрогеологическим состоянием. Изучали влияние сроков сева (2–3 декада апреля, 1–2 декада мая, 1 декада июня), гибридов *Helianthus annuus* «Дон» – среднеспелой и «Мелкий Блондин» – среднепоздней групп спелости, обработки листьев регулятором роста «Нива» (Решетняк Н.В. с соавторами) на водоудерживающую способность листьев и урожайность, как способность адаптации культуры к стрессовым явлениям погоды в условиях повышения температуры воздуха и засушливости климата. Для Луганска ГТК составляет 0,8–1,0. Известно, что в засушливые периоды водоудерживающая способность листьев культур повышается, особенно у засухоустойчивых и жароустойчивых сортов, что отражает изменения в метаболизме растений, усиление гидrolитических процессов, накопление осмотически активных веществ (растворимые сахара, аминокислоты и др.) и рассматривается как адаптация. Использованы материалы проведенных нами исследований по биоклиматическим ресурсам агроклиматических районов Донбасского региона с рекомендацией замены группы спелости подсолнечника на более позднюю – среднеспелую и среднепозднюю. Почвы опытного участка – чернозем обыкновенный на лессовидном суглинке, мощность гумусового горизонта 35–60 см, содержание гумуса 4–4,2%, рН 6,8–7, емкость поглощения 35–40 мг-экв на 100 г почвы. Запасы влаги в метровом слое почвы перед севом при раннем сроке сева (2–3 декада апреля) – 159 мм, при оптимальном (1–2 декада мая) – 157 мм, при позднем (1 декада июня) – 127 мм. Регулятор роста «Нива» применяли в разные фазы роста и развития растений – перед посевом семян (предпосевная обработка); листовая обработка (путем опрыскивания) в фазу 4–5 листьев и перед началом цветения. Важная биологическая особенность подсолнечника – послойное поглощение воды растениями из разных горизонтов почвы. Запас продуктивной влаги в метровом слое почвы в период цветения в посевах раннего срока сева – 117 мм, при оптимальном сроке – 103 мм, при позднем сроке – 109 мм. Водоудерживающую способность листьев гибридов «Дон» – среднеспелый и «Мелкий Блондин» – среднепоздний, выращенных из семян, обработанных препаратом «Нива», определяли в фазе образования корзинки методом «завядания» по Арланду. Отбор листьев гибридов подсолнечника разных групп спелости проводили в период образования соцветий. Уборку урожая осуществляли в фазе полной спелости семян при стандартной влажности 7–8% (корзинки полностью бурые, сухие). Математическую обработку результатов осуществляли по Б. Доспехову. У подсолнечника (гибрид «Дон»), выращенных из семян, обработанных препаратом «Нива», водоудерживающая способность листьев в фазу образования корзинки на 10,6 % превышала этот показатель контрольного варианта. У гибрида «Мелкий Блондин», выращенного из семян, обработанных препаратом «Нива», водоудерживающая способность листьев в фазу образования корзинки в первые два часа от начала эксперимента превышала контроль, после чего (через 3 часа) наблюдалось резкое снижение этого показателя у растений данного варианта. Через 4 часа от начала эксперимента отмечена резкая потеря воды в контроле (9,5%). Исследования показали, что урожайность изучаемых гибридов с обработанными семенами и листьями препаратом «Нива» во всех вариантах опыта выше, чем в контрольном варианте (у гибрида «Дон» – на 3–4 ц/га, у гибрида «Мелкий Блондин» – на 1,5–2,1 ц/га). По срокам сева наиболее высокая урожайность получена при севе в первую декаду мая (оптимальный срок сева). Несколько ниже урожайность получена при севе в конце апреля, но уровень урожайности остается достаточно высоким – 22,8–25,7 ц/га. Наиболее низкая урожайность для всех гибридов получена при позднем сроке сева – первая декада июня. Таким образом, водоудерживающая способность листьев подсолнечника гибридов разных групп спелости, выращенного из семян, обработанных препаратом «Нива», выше по сравнению с контролем, что дает возможность сделать заключение о повышении устойчивости растений этого варианта к засухе при обработке листьев препаратом «Нива». При выращивании подсолнечника в период резкого повышения температуры воздуха в весенний период рекомендуем сместить сроки сева с первой декады мая на вторую декаду апреля. Поздние сроки сева применять только в исключительных случаях: повышенной засоренности полей, пересеве озимых и наличии достаточной влаги в посевном слое почвы. В конкретном году можно регулировать сроки сева культуры с учетом текущих погодных условий в районе исследования.

Экспрессия генов белков, ассоциированных с пластидной рнк-полимеразой бактериального типа (pap), регулируется участниками канонического пути передачи сигнала цитокинина

Андреева А.А.^{ **}, Кудрякова Н.В.^{*}, Кузнецов В.В.^{*}*

* ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, г. Москва, 127276, Россия.

** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия.

nkudryakova@rambler.ru, alexaa27@mail.ru

Известно, что цитокинины (ЦК) регулируют биогенез хлоропластов на разных этапах онтогенеза, однако пути восприятия гормонального сигнала в этих органеллах остаются до сих пор мало изученными. Они, по-видимому, могут быть продублированы несколькими механизмами, включая гормон-зависимую регуляцию экспрессии ядерных генов аппарата транскрипции пластид. В представленном исследовании мы оценивали роль компонентов сигнального пути ЦК в контроле экспрессии ядерных генов *PAP* (*PEP-associated proteins*) у *Arabidopsis thaliana*. Эти гены кодируют 12 белков, ассоциированных с пластидной РНК полимеразой, которые в составе минимального РНК-полимеразного комплекса пластид PEP-A отвечают за транскрипцию генов фотосинтеза. В предыдущих исследованиях мы показали, что экзогенный *транс*-зеатин способствует резкому усилению экспрессии всех *PAP* генов, причем эта реакция максимальна у ювенильных проростков и в стареющих листьях. Для выяснения роли сигнальной системы ЦК в цитокинин-зависимой активации генов *PAP* нами были использованы методы обратной генетики. Выключение генов, кодирующих ключевые регуляторы проведения цитокининового сигнала у мутантов *ahk2,3 ahp2,3,5* и *arr1,10*, приводило к существенному снижению активации генов *PAP* в ответ на обработку ЦК (5 мкМ *транс*-зеатине 3 часа) по сравнению с растениями дикого типа. Таким образом, цитокинин-зависимая регуляция экспрессии *PAP* определяется основными участниками канонического пути передачи сигнала ЦК: сенсорными гистидинкиназами АНК2 и АНК3, фосфотрансмиттерами АНР 2,3 и 5 и *транс*-факторами ARR 1,10 и 12 (типа В).

Следует, однако, заметить, что транскрипционные ответы, регулируемые названными *транс*-факторами, могут быть непрямые. Согласно литературным данным, прямое взаимодействие *in vivo* между *транс*-факторами В-ARR1,10 и 12 было подтверждено только для промоторов генов *PAP8* и *PAP11*. Однако гены *PAP* могут быть непосредственными мишенями для других ЦК-регулируемых *транс*-факторов. К их числу, по-видимому, принадлежат ARR11, ARR14 и GLK2-1, *цис*-элементы для которых согласно on-line ресурсу AthaMap присутствуют в промоторах большинства генов *PAP*. Все эти *транс*-факторы, в свою очередь, были обнаружены в списке целевых генов, находящиеся под контролем В-ARR1, 10 и 12. В этой связи представляет интерес тот факт, что повышенная экспрессия генов *PAP* достигала максимума после 3 часов действия ЦК и поддерживалась на повышенных уровнях не менее 24 часов, что свидетельствует в пользу косвенного контроля. Вместе с тем не исключено, что ЦК-зависимая регуляция генов *PAP* осуществляется совокупностью разнообразных регуляторных путей, а их взаимодействие может определять специфичную реакцию транскрипционного аппарата пластид на гормональную обработку.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-14-00065).

Экспрессия генов, кодирующих ферменты метаболизма и белки ответа на салициловую кислоту, в растениях пшеницы и риса при дефиците кислорода и последующей реэрации

Бертова А.Д., Емельянов В.В.

Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, Россия.
bootika@mail.ru

Салициловая кислота (СК) – гормон, принимающий участие в регуляции иммунитета растений, однако, появляется все больше данных о вовлечении СК в регуляцию устойчивости растений к разнообразным абиотическим воздействиям, в том числе дефициту кислорода и постаноксическому окислительному стрессу. Ранее нами было показано, что устойчивые к гипоксии растения отличаются повышенным уровнем СК в тканях побега и аккумулируют этот гормон при действии затопления и полного отсутствия кислорода. Более того, обработка экзогенной СК оказывала защитное действие, особенно на неустойчивое к дефициту кислорода растение. Цель настоящей работы состояла в анализе экспрессии генов, контролирующей метаболизм и ответную реакцию на СК, в растениях при дефиците кислорода и последующей реэрации. Объектами исследования являлись контрастные по устойчивости к аноксии растения пшеницы (*Triticum aestivum* L., неустойчивое растение) и риса (*Oryza sativa* L., устойчивое растение). Количество транскриптов оценивали методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Показана активация транскрипции генов биосинтеза и деконъюгации СК у риса в условиях дефицита кислорода и последующей реэрации, а именно генов изохоризматсинтазы и бета-глюкозидазы. Одновременно было отмечено снижение экспрессии гена салицилат-глицозилтрансферазы, катализирующей превращение СК в запасную форму гликозида, как у риса, так и у пшеницы.

В обоих видах растений в ходе реэрации стимулировалась экспрессия генов фенилаланинаммиаклиаз, что может отражать как общее повреждение растительных тканей при стрессе, так и вовлеченность данных ферментов в синтез СК. В побегах риса активация экспрессии генов *PAL* происходила также во время самого аноксического воздействия. Стоит отметить, что предварительная обработка растений СК приводила к небольшой активации экспрессии генов *PAL*.

Было установлено увеличение числа транскриптов генов, вовлеченных в сигналинг и ответ на СК. Так, у риса в бескислородных условиях активировалась транскрипция гена рецептора *NPR1*, а также генов альтернативной оксидазы *AOX1a*, *c*. В корнях пшеницы была отмечена стимуляция экспрессии гомологичных генов *AOX1a*, *c*, *NPR1* и *NPR1-type* в ходе аноксии и реэрации. Предварительная обработка СК приводила к ещё более высокой экспрессии данных генов.

Анализ экспрессии СК-зависимых *PR*-генов выявил понижение уровня транскрипции данных генов в ходе аноксии у обоих исследуемых видов, небольшое его повышение в ходе реэрации у риса и значительное - в ходе реэрации у пшеницы. Повышение экспрессии *PR*-генов в ходе реэрации может указывать на повреждение тканей растений после аноксического воздействия и связанную с ним повышенную чувствительность к патогенным микроорганизмам. Пшеница как неустойчивое к аноксии и постаноксическому воздействию растение более подвержена воздействию патогенов в ходе реэрации, чем рис.

Таким образом, впервые доказано полномасштабное участие СК в регуляции устойчивости к абиотическому стрессу, вызванному недостатком кислорода и последующей реэрацией.

Исследование проведено при частичной поддержке РФФИ (проект №18-04-00157).

Электрические сигналы как механизм системного адаптационного ответа высших растений в нестабильных условиях окружающей среды

Сухов В.С.

ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Россия, 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.
n.catherine@inbox.ru

Растения существуют в изменчивых условиях окружающей среды; при этом, действие многих неблагоприятных факторов (избыточный свет, механические повреждения, неблагоприятные температуры) является пространственно-неоднородным. Развитие системного ответа на действие таких факторов требует возникновения и распространения дистанционных стрессовых сигналов, среди которых важное место занимают электрические сигналы, представленные у высших растений переменным потенциалом (ВП), потенциалом действия (ПД) и системным потенциалом (СП). Каждый из таких сигналов имеет различные механизмы и, по-видимому, различную роль в формировании системного ответа растений.

ВП возникает у растений при действии повреждающих факторов (прежде всего – высокой температуры), которые могут угрожать жизни растения. При этом, важно отметить, что сильное повреждение практически всегда вызывает распространение ВП по растению; параметры ВП зависят от интенсивности стрессора. Генерация ВП связана, прежде всего, с обратимой инактивацией H^+ -АТФ-азы плазматической мембраны; механизмы распространения – активно обсуждаются. Весьма вероятно, что ВП представляет собой локальный ответ на распространение химического или гидравлического сигнала, а возможно – их комбинации; в частности, такая гипотеза объясняет затухание ВП при распространении. Существует значительное число работ, в которых показано, что ВП оказывает влияние на широкий спектр физиологических процессов. В частности, серия наших работ показала, что ВП вызывает обратимую инактивацию фотосинтетических процессов, которая включает быструю и длительную компоненты. Быстрая компонента обусловлена изменениями внутри- и внеклеточного рН, которые развиваются в пределах нескольких минут; такие изменения снижают поступление CO_2 в клетку, замедляют нециклический и стимулируют циклический поток электронов, усиливают нефотохимическое тушение флуоресценции и т.д. Длительная компонента развивается в пределах десятков минут и, возможно, часов; по-видимому, она связана с закрытием устьиц и снижением флоэмного потока после ВП. Среди других «мишеней» ВП можно отметить экспрессию защитных генов, продукцию стрессовых фитогормонов, интенсивность дыхания и многое другое. Наши работы показывают, что конечным результатом вызванных ВП физиологических ответов является, по-видимому, возрастание устойчивости растения к действию неблагоприятных факторов.

ПД возникает при действии умеренных и слабых факторов (небольшое охлаждение, слабое механическое воздействие и т.п.). Механизмы его генерации связаны, прежде всего, с открытием ионных каналов, хотя инактивация H^+ -АТФ-азы также принимает участие в формировании ответа; распространение ПД является активным процессом и идет без затухания сигнала. Важной особенностью индукции ПД является ее высокая чувствительность к исходному состоянию растения; так для возникновения ПД необходим длительный период нахождения растения в стабильных условиях. Влияние ПД на физиологические процессы, по-видимому, сходно с влиянием ВП, а конечным результатом функциональных ответов также является возрастание устойчивости растений к действию стрессоров.

СП является наиболее слабо изученной реакцией и представляет собой гиперполяризационный сигнал. По-видимому, он чаще всего возникает на фоне генерации ВП (или ПД); однако, может распространяться в участки растения, в которые переменный потенциал не проходит. Предполагаемым механизмом СП является обратимая активация H^+ -АТФ-азы; определенную роль в его генерации могут также играть калиевые ионные каналы. Распространение СП является, по-видимому, активным процессом. Существуют лишь отдельные работы, показывающие физиологическую роль СП; по-видимому, влияние СП имеет как общие черты с ВП и ПД (инактивация фотосинтеза), так и отличия (отсутствие активации экспрессии защитных генов).

Сопоставление трех основных электрических сигналов у высших растений позволяет предположить возможную роль ВП, ПД и СП в формировании системного ответа растений на пространственно-неоднородное действие стрессоров. В соответствии с ней, ВП является базовым стрессовым сигналом, вызывающим комплекс физиологических ответов и, тем самым, повышение устойчивости к уже действующему на растение неблагоприятному фактору. СП, который также возникает в этих условиях, скорее играет роль дополнительного механизма адаптации, вызывая некоторые физиологические изменения в удаленных от зоны повреждения участках растения (в которые не проходит ВП) и, тем самым, повышая его общую устойчивость. В отличие от ВП и СП, ПД может возникать даже при слабых изменениях условий среды, которые длительное время до этого были стабильными. Такие изменения могут быть признаком сильного действия стрессора в ближайшем будущем; таким образом, роль ПД, по-видимому, связана с опережающей неспецифической адаптацией растений в условиях угрозы действия неблагоприятных факторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (анализ общей иерархии сигналов в системном ответе, проект № 17-76-20032) и Российского Фонда Фундаментальных Исследований (анализ генерации ПД, проект № 19-04-00614).

Этилен в прогамной фазе оплодотворения у петунии (*Petunia hybrida* L.)

Ковалева Л.В.*, Захарова Е.В.***, Тимофеева Г.В.*

* Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.

*** Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии,
Тимирязевская ул., 42, Москва, Россия.
kovaleva_l@mail.ru

Изучение регуляторных факторов прорастания и роста мужского гаметофита были начаты в ИФРе в 70-ых годах под руководством Е. А. Бритикова. Исследования, проведенные на трех клонах петунии: двух фертильных (самосовместимом (СС) и самонесовместимом (СН)) и стерильном показали, что развитие, прорастание и рост мужского гаметофита петунии в прогамной фазе оплодотворения происходит с участием фитогормона этилена. Структурные изменения в стенке развивающегося пыльника фертильных клонов сопровождаются двумя пиками образования этилена в пыльниках: 1-ый пик – на стадии тетрад (совпадает с процессом дегенерации средних слоев и тапетума); 2-ой пик сопровождает финальный этап созревания и дегидратации пыльцевых зерен.

Обработка ингибитором действия этилена 2,5-норборнадиеном (NBD) бутонов на ранней стадии развития (до инициации мейоза) приводила к полной остановке развития пыльника и мужского гаметофита, а обработка на поздних стадиях развития задерживала раскрытие пыльников. Обработка бутонов этиленом (в высоких концентрациях (10-100 мкл/л)) приводила к гибели мужских генеративных клеток фертильного клона, находившихся в момент обработки на ранних стадиях развития (от начала мейоза до высвобождения микроспор из тетрад), в то время как вакуолизованные микроспоры и двух клеточные пыльцевые зерна не проявляли каких-либо признаков дегенерации.

Установлено, что гибель мужского гаметофита у стерильного клона петунии происходит в профазе мейоза вследствие преждевременной дегенерации тапетума и нарушений в развитии спорогенной ткани в результате программируемой клеточной смерти (ПКС). При этом, на стадии материнских клеток пыльцы гибель микроспороцитов в стерильном клоне сопровождается в 10 раз более высоким выделением этилена, чем при дегенерации тапетума в пыльнике фертильных клонов.

Опыление у петунии, как и у многих растений, инициирует каскад событий, включающих в себя индукцию образования этилена, способного координировать развитие завязи и семязпочки, а затем старение и опадение околоцветника.

Прорастающая *in vitro* пыльца уже через 15 минут интенсивно выделяет этилен, а NBD (ингибитор блокаторов рецепторов этилена) ингибирует процесс ее прорастания. Обработка прорастающей *in vitro* пыльцы этиленом в высоких концентрациях (1, 10, 100 мкл/л) ингибировала рост пыльцевых трубок.

Пыльцевые зерна, попадающие на рыльце, прорастают, пыльцевые трубки растут по тканям рыльца и столбика. В случае самосовместимого опыления они через 30-34 ч достигают завязи, где происходит оплодотворение, тогда как после самонесовместимого опыления рост пыльцевых трубок прекращается через 8 ч на расстоянии 6-8 мм от поверхности рыльца вследствие проявления реакции самонесовместимости РНКазного типа.

Установлено, что синтез этилена сопровождает и влияет на прорастание и рост пыльцевых трубок петунии *in vivo* в тканях пестика. Опыление очень быстро запускает синтез АЦК в системе пыльца – пестик, максимум достигается через 1.5-2 ч. Основное место синтеза этилена – ткани рыльца. Рост совместимых пыльцевых трубок сопровождается повышенным уровнем содержания АЦК, в то время как ингибирование несовместимых пыльцевых трубок вследствие функционирования механизма самонесовместимости – повышенным уровнем образования этилена.

Впервые получены доказательства участия этилена в ПКС в процессе функционирования механизма самонесовместимости РНКазного типа. Предварительная (до опыления) обработка рылец СН клона петунии АОА (ингибитор синтеза АЦК) привела к стимуляции роста несовместимых пыльцевых трубок, в которых отсутствовали маркеры ПКС. Результаты позволили сделать заключение, что этилен контролирует прохождение ПКС в несовместимых пыльцевых трубках. Результаты впервые указали на включение гормональной регуляции в механизм самонесовместимости РНКазного типа.

Суммируя полученные данные, полагаем, что этилен является регулятором гаметофитно-спорофитных взаимодействий в прогамной фазе оплодотворения у петунии (*Petunia hybrida* L.), включаясь в координацию событий в пыльнике, необходимых для развития мужского гаметофита и участвуя в ПКС в клетках тапетума, а также контролирует рост пыльцевых трубок в спорофитных тканях пестика, включая ПКС в несовместимых пыльцевых трубках.

Работа выполнялась при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ №13-04-00592 и №17-04-00153).

Эффективность действия микробиологических препаратов на сельскохозяйственные виды растений в условиях Северо-Запада Российской Федерации

Платонов А.В., Рассохина И.И., Сухарева Л.В.

Вологодский научный центр РАН, ул. Горького, 56а, Вологда, Россия.
platonov70@yandex.ru

В настоящее время в практике растениеводства все большее распространение получают биопрепараты созданные на основе микроорганизмов. Одним из перспективных для использования является род *Bacillus*, представители которого способны синтезировать фитогормоны, липопептиды, этилен, полиамины и пр., повышать мобилизацию элементов питания, а также угнетать патогенную микрофлору. Менее признаны представители рода *Lactobacillus*, которые, в основном, находят применение в силосовании. Однако за счет синтеза валерьяновой и масляной кислот, а также ауксинов и соединений цитокининового типа они способны к стимуляции роста растений, повышению их устойчивости к стрессовым условиям и патогенным микроорганизмам.

Исследования проводились в условиях мелкоделяночного опыта в вегетационный период 2019 года на опытном поле Вологодского научного центра РАН. В качестве объектов исследования были выбраны овес посевной (*Avena sativa* L.) с. Яков и ячмень обыкновенный (*Hordeum vulgare* L.) с. Сонет. Семена опытных вариантов выдерживались в течение двух часов в одном из препаратов, а контрольные – в воде. Препараты представлены производителем – ООО «Биотроф» и созданы на основе *Bacillus subtilis* (Натурост), *Bacillus megaterium* (Натурост-Актив) и *Lactobacillus buchneri* (Натурост-М). Помимо инокуляции семян препарат дополнительно вносился путем опрыскивания в фазе третьего листа. Площадь учетной делянки – 1 м², повторность опыта – шестикратная. В процессе развития растений измеряли морфометрические параметры, структуру урожая, сырую и сухую массу надземных органов, среднесуточные приросты сырой и сухой массы, чистую продуктивность фотосинтеза. Содержание хлорофилла определяли спектрофотометрическим методом, экстракция пигментов – 96 %-ным этиловым спиртом.

Результаты исследования свидетельствуют о положительном влиянии бактерий биопрепаратов на ростовые процессы исследуемых культур. На стадии третьего листа эффект от действия микробиологических препаратов был незначителен, наблюдалась лишь тенденция увеличения массы и площади листовой поверхности. Вероятно, незначительный эффект действия препаратов был связан с послепосевной засухой, которая плохо сказалась как на растениях, так и на выживаемости микроорганизмов. Однако, после повторного внесения препаратов, в фазу кущения разница между опытными и контрольными растениями стала более существенной. Так, сухая масса опытных растений ячменя относительно контрольных возрастает на 29,2 %, 42,7 % и 27,0 %, площадь листовой поверхности – на 52,2 %, 64,5 % и 50,2 %, у овса сухая масса – на 58,9 %, 27,8 % и 27,8 %, а площадь листовой поверхности – на 40,1 %, 23,1 % и 33,4 % соответственно при использовании биопрепаратов на основе *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* и *Lactobacillus buchneri*. На стадии трубкования различия между опытом и контролем становились еще более выраженными. Помимо увеличения морфометрических параметров наблюдалось возрастание среднесуточных приростов. Чистая продуктивность фотосинтеза ячменя у опытных вариантов была выше, по сравнению с контролем при внесении *Lactobacillus buchneri* и *Bacillus megaterium*, у овса чистая продуктивность фотосинтеза выше у всех опытных вариантов.

Важным показателем фотосинтетической активности является содержание пигментов. Содержание хлорофилла в биоматериале ячменя опытных растений соответствовало контролю, а у овса было несколько ниже контрольных значений. Однако, учитывая более высокие морфометрические показатели и среднесуточные приросты, можно говорить о более эффективной работе пигментных единиц растений опытных вариантов.

К фазе полной спелости зерна разница в сухой массе опытных и контрольных растений несколько снизилась по сравнению с более ранними стадиями, поэтому можно предположить, что используемые биопрепараты оказали действие на некоторое ускорение фаз онтогенеза. Возрастание морфометрических показателей привело к повышению продуктивности зерна. Так, в целом, зерновая продуктивность исследуемых растений при обработке биопрепаратами возрастает на 8,5–15,8 %, у ячменя это происходит как за счет увеличения массы отдельной зерновки, так и за счет увеличения продуктивной кустистости, а в случае овса – за счет некоторого увеличения количества зерновок в метелке и степени их вызревания.

Таким образом, данные, полученные в ходе полевого мелкоделяночного эксперимента, позволяют говорить о ростостимулирующем действии препаратов на основе *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* и *Lactobacillus buchneri*. Эффективность действия используемых препаратов на растения ячменя и овса отлична. На ячмень более эффективно повлиял биопрепарат на основе *L. buchneri*, при внесении которого растения на протяжении онтогенеза достигали больших морфометрических параметров, приростов, и, в результате, выход зерна с квадратного метра был максимальным. На овес более ощутимо повлияли биопрепараты на основе *B. subtilis* и *B. megaterium*. В вегетационный период 2020 года на зерновых и кормовых культурах в трех хозяйствах Вологодской области исследуется эффективность использования биопрепаратов в промышленных условиях.

Эффективность использования азота, фосфора, света и воды на фотосинтез огурца при контрастных условиях питания и в присутствии лигносульфоната натрия в почве

Икконен Е.Н., Юркевич М.Г.

Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Пушкинская, 11, Петрозаводск, Россия.
likkonen@gmail.com

В последние годы рассматривается возможность использования лигносульфоната – побочного продукта в процессе производства целлюлозы – для повышения почвенного плодородия ввиду высокого содержания в нем органических и минеральных веществ, а также из-за потенциальной возможности улучшения им структуры почвы и ее физических свойств. Особенно актуально использование лигносульфоната может быть на почвах, дефицитных по элементам минерального питания растений. Однако данные предположения требуют научного подтверждения, основанного на комплексном исследовании влияния лигносульфоната как на почвенное плодородие, так и на физиологический отклик растений. Исследовали влияние внесения в дерново-подзолистую супесчаную почву, характеризующуюся низким содержанием минеральных элементов, лигносульфоната натрия в диапазоне концентраций 0 – 10 (объемн. %) на накопление в листьях огурца (*Cucumis sativus* L.) азота [N] и фосфора [P], а также на параметры роста и фотосинтетической активности растений. Растения выращивали в контролируемых условиях среды при контрастных уровнях питания: оптимальном (полив питательным раствором) и дефицитном (полив водой).

Физиологическая активность растений зависела в большей степени от уровня доступности элементов питания, чем от содержания в почве лигносульфоната. Как ожидалось, дефицит питания ингибировал накопление растением биомассы, снижал количество и площадь листьев, но увеличивал долю корней в общей биомассе и величину отношения сухой массы листа растений к его площади (LMA). В условиях дефицита питания ингибирование ростовых процессов сопровождалось существенным снижением скорости CO_2 ассимиляции (A) независимо от того, была она рассчитана на площадь [area], массу [mass], содержание N или P. Кроме того, скорость фотосинтетического транспорта электронов (J), оксигеназная (v_o) и карбоксилазная (v_c) активность рубиско, величина видимого квантового выхода фотосинтеза (α), отражающая эффективность использования света на фотосинтез, и эффективность использования воды (ЭИВ) на фотосинтез уменьшались при дефиците питания растений. Концентрация N в листьях не различалась достоверно между растениями, выросшими при контрастных условиях питания, но при дефиците питания содержание P сокращалось на 40%, что отражалось на значительном росте величины N/P.

Реакции растений на присутствие в почве лигносульфоната зависели от фона минерального питания растений. Тогда как при дефиците питания лигносульфанат способствовал небольшому увеличению биомассы в надземных органах, но не в корнях, при оптимальном уровне питания высокая концентрация лигносульфоната (10%) ингибировала накопление биомассы равномерно во всех органах растений, и снижало величину LMA. Высокие дозы лигносульфоната восстанавливали соотношение подземной и надземной биомассы растений, выращенных при дефиците питания до уровня растений, росших при оптимальном фоне питания. В отличие от условий достаточного питания, при его дефиците лигносульфанат способствовал некоторой активизации в работе фотосинтетического аппарата, что проявлялось в повышении величины J , v_o и v_c и увеличении скорости $A_{[area, mass]}$. Эффективность использования N и P на фотосинтез ($A_{[N]}$ и $A_{[P]}$) снижалась в присутствии лигносульфоната при достаточном питании растений. При этом максимальное снижение $A_{[N]}$ и $A_{[P]}$ осуществлялось при низкой концентрации лигносульфоната (1%). При недостатке питания под влиянием лигносульфоната растения демонстрировали тенденцию к повышению скоростей $A_{[area]}$ и $A_{[N]}$, но не $A_{[mass]}$ и $A_{[P]}$. Величины α и ЭИВ слабо реагировали на лигносульфанат в условиях достаточного питания, но в некоторой степени возрастали при его внесении в почву с низким уровнем содержания элементов питания.

Таким образом, результаты данного исследования подтвердили ингибирующий эффект дефицита питания на рост и активность фотосинтетического аппарата растений огурца. Эффективность использования азота, фосфора, света и воды на фотосинтез снижались в условиях дефицита питания. Растения реагировали на лигносульфанат в большей степени при дефицитном, чем достаточном уровне их питания, причем положительный эффект от его внесения в почву проявлялся только в первом случае. Так, лигносульфонат повышал эффективность фотосинтетического использования азота, света и воды растениями в условиях дефицита питания, однако данное положительное влияние не было достаточным для оптимизации роста растений и активности их фотосинтетического аппарата и не способствовало даже частичному восстановлению физиологических процессов до уровня растений, выращиваемых в условиях достаточного питания.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№19-29-05174).

Эффекты инокуляции растений картофеля *Streptomyces antimycoticus* 8A13

Бакулина А.В. *, Назарова Я.И. *, Огородникова С.Ю. **, Широких И.Г. *

* Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого.
Ленина ул., 166а, Киров, Россия.

** Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН.
Коммунистическая ул., 28, Сыктывкар, Россия.
mol-biol@fanc-sv.ru

Эффективным и экологически безопасным подходом к повышению устойчивости сельскохозяйственных культур к неблагоприятным факторам окружающей среды является использование потенциала микробно-растительных взаимодействий. Значительный интерес в этом ключе вызывают представители рода *Streptomyces*. Благодаря способности активно колонизировать ткани растений, выраженному антагонизму к фитопатогенам (грибам, бактериям) и некоторым вредителям, способности продуцировать фитогормоны и другие физиологически активные соединения, стрептомицеты находят все более широкое применение в растениеводстве. Одним из этапов разработки биопрепаратов для защиты растений на основе стрептомицетов является изучение фитотоксичности перспективных штаммов.

В работе оценивали эффекты инокуляции меристемных растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Пранса штаммом *Streptomyces antimycoticus* 8A13, для которого ранее была установлена высокая антагонистическая активность *in vitro* в отношении фитопатогенных грибов *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium culmorum*, *F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *Alternaria alternata*, *Parastagonospora nodorum* и бактерий *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas putida*, *Erwinia rhapontici*. Растения выращивали на среде Мурасиге и Скуга в стеклянных пробирках при 22 С и фотопериоде 16 час. Инокуляцию проводили суспензией бактерий с титром $2,8 \times 10^5$ КОЕ/мл во время клонального микроразмножения, нанося по 10 мкл суспензии на лист микрочеренка (24 шт. в каждом варианте). Морфометрические показатели (высота побега, количество листьев и междоузлий) инокулированных и контрольных растений измеряли на 15-е, 30-е и 60-е сут роста и высаживали растения в вегетационные сосуды с почвой. Количество сосудов в варианте – 5. В листьях картофеля через 9 и 12 недель после высадки определяли содержание фотосинтетических пигментов, антоцианов и малонового диальдегида (МДА), по окончании вегетации учитывали продуктивность растений.

В ходе работы установлено, что инокуляция меристемного картофеля штаммом *S. antimycoticus* 8A13 не вызвала каких-либо значимых изменений в росте и развитии растений *in vitro*. Морфометрические показатели инокулированных растений не отличались от контроля через 15 и 30 сут роста. При более длительном культивировании (60 сут) у пробирочных растений в результате инокуляции стрептомицетом отмечали уменьшение количества междоузлий ($3,2 \pm 0,94$ шт.), в сравнении с интактными растениями ($6,2 \pm 1,94$ шт.).

При выращивании картофеля в почве (*ex vitro*) влияние *S. antimycoticus* 8A13 на продуктивность и количество миниклубней, полученных с одного растения, не выявлено. Вместе с тем, фракционный состав клубней у подвергнутых инокуляции растений изменился: количество мелких (≤ 10 мм) миниклубней стало больше на 14%, чем в контроле.

В результате инокуляции стрептомицетом изменились некоторые биохимические показатели растений. Так, у инокулированных растений через 9 недель после высадки содержание антоцианов было значимо ниже ($0,046 \pm 0,003$ мг/г), чем в контроле ($0,175 \pm 0,016$ мг/г); а через 12 недель – содержание МДА в листьях инокулированных и контрольных растений составило $18,15 \pm 1,13$ и $23,99 \pm 0,76$ нмоль/г сырой массы соответственно.

Выявлены определенные различия между инокулированными и контрольными растениями по содержанию в листьях пластидных пигментов. Суммарное содержание хлорофиллов *a* и *b* в отдельные сроки наблюдений (12 недель) у инокулированных растений было значимо выше ($20,13$ мг/г), чем в контроле ($16,8$ мг/г), в другие (9 и 15 недель) достоверно не различалось. В большей степени под влиянием инокуляции увеличивалось содержание хлорофилла *b*, чем хлорофилла *a*, в связи с чем изменялось соотношение хлорофиллов *a/b*.

Таким образом, у растений картофеля в результате инокуляции штаммом *S. antimycoticus* 8A13 не выявлено существенной разницы в морфометрических показателях растений *in vitro* и показателях продуктивности *ex vitro*. В то же время, снижение показателей, характеризующих интенсивность перекисного окисления липидов (накопление МДА) и пигментов, участвующих в антиоксидантной защите (антоцианов), а также увеличение, в отдельные сроки наблюдений, содержания пластидных пигментов могут свидетельствовать в пользу повышения антиоксидантного статуса растений.

Ранее аналогичные результаты были получены при инокуляции картофеля этого же сорта другим штаммом – *S. flavogriseus* ТК5. В условиях *ex vitro* на первом этапе развития растений наблюдали увеличение содержания пластидных пигментов (хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов), а позднее (35 и 55 сутки) – более низкое содержание МДА в листьях инокулированных растений. Полученные данные об отсутствии негативного влияния на рост и показатели продуктивности меристемного картофеля сорта Пранса свидетельствуют о биотехнологической перспективности нового штамма *S. antimycoticus* 8A13. Дальнейший интерес представляет изучение влияния штамма *S. antimycoticus* 8A13 на растения в условиях моделируемого *in vitro* стресса.

РАЗДЕЛ 2

Молекулярно-генетические основы разработки эффективных биотехнологий на основе культур клеток, тканей и органов высших растений, а также микроводорослей

CO₂-концентрирующие механизмы микроводорослей и цианобактерий: современное представление

Куприянова Е.В., Пронина Н.А.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
ivlaanov@mail.ru, na.pronina@mail.ru

Низкая концентрация CO₂ в современной атмосфере Земли ограничивает фотосинтетическую продуктивность растений. Существует несколько путей преодоления этой проблемы: 1) увеличение в стромах хлоропласта количества основного ключевого фермента фиксации CO₂ – рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы-оксигеназы (РБФК/О); 2) увеличение сродства РБФК/О к CO₂; 3) увеличение внутриклеточной концентрации CO₂. Первые две стратегии используют высшие растения, фиксирующие углерод по C₃-типу фотосинтеза: они обладают высоким содержанием РБФК/О в хлоропласте одновременно с высокой карбоксилирующей активностью этого фермента. Третья стратегия адаптации к низкой концентрации CO₂ может быть достигнута тремя известными в настоящее время путями концентрирования CO₂ в карбоксилирующих центрах РБФК/О. У высших наземных растений оно достигается вследствие работы C₄- и САМ-фотосинтеза, которые отличаются от C₃-фотосинтеза тем, что они имеют надстройки в дополнение к циклу Бенсона-Кальвина, усложняющие биохимические пути фиксации и восстановления CO₂. В клетках водных фотосинтезирующих организмов – микроводорослей и цианобактерий, функционирует так называемый «биофизический» тип CO₂-концентрирования, который основывается на прямом «закачивании» неорганического углерода (C_i) внутрь клетки. Эта последняя стратегия увеличения внутриклеточной концентрации CO₂ известна под аббревиатурой ССМ (от англ. «CO₂-concentrating mechanism»). ССМ дает возможность микроводорослям и цианобактериям осуществлять более эффективную фиксацию CO₂ в цикле Бенсона-Кальвина по сравнению с C₄- и САМ-растениями, и приносить существенный вклад в суммарный фотосинтез планеты. Отличительной особенностью ССМ от механизмов концентрирования CO₂, функционирующих у C₄- и САМ-растений, является то, что он относится к индуцибельным процессам, который включается в клетках на свету при снижении концентрации C_i в окружающей среде. Кроме того, в отличие от кооперативного фотосинтеза высших растений, ССМ цианобактерий и микроводорослей организован в пределах одной клетки. Действие ССМ основано на слаженной работе наружных и внутриклеточных карбоангидраз и системы переносчиков соединений C_i, приводящих к его внутриклеточному накоплению в виде пула HCO₃⁻ с последующим преобразованием последнего в субстрат РБФК/О – CO₂. Для эффективного включения CO₂ в ВПФ-цикл и минимизации ее утечки из клетки используется принцип совместной локализации РБФК/О и карбоангидразы в РБФК/О-содержащем микрокомпарменте – пиреноиде у микроводорослей или карбоксисоме у цианобактерий. В последние годы в исследовании элементов ССМ и функционирования этого механизма достигнуты значительные успехи. Однако многие моменты остаются не до конца ясными. В докладе обсуждаются последние достижения в исследовании организации и функционирования ССМ микроводорослей и цианобактерий как «надстройки» к циклу Бенсона-Кальвина.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 19-04-00457.

Oleaginous TAGs and carotenoid synthesis by oleaginous microorganisms (bacteria, yeast, microalgae)

Levin D.B.

University of Manitoba, 66 Chancellors Cir, Winnipeg, MB, Canada.
David.Levin@umanitoba.ca

Single celled oils (SCO) produced by oleaginous microorganisms (organisms which are able to accumulate >20% cell mass as lipids), are currently being researched as an alternative to using plant based oils for biodiesel synthesis. The lipids recovered from oleaginous cells can be trans-esterified into fatty acid methyl esters (FAMES) and possess a composition similar to those obtained from plant-based oils with different profiles of saturated (SFA), monounsaturated (MUFA), or polyunsaturated fatty acids (PUFA). There are many different types of oleaginous organism, including bacteria, algae, and yeasts. Of these, oleaginous yeasts have attracted considerable interest due to their ability to quickly grow to high densities on a variety of carbon sources, including wastes formed in industrial processes such as cheese whey and olive mill wastewater, and under a wide range of culture conditions. Many of studies have shown that some yeasts are able to metabolize glycerol as the sole carbon source and synthesize large amounts of SCOs. The possibility of using the biodiesel-derived waste glycerol as a feedstock for cultivation of oleaginous microorganisms' cultures would reduce the operating costs of growing the biomass, while simultaneously providing a method of disposal for large volumes of biodiesel-derived waste glycerol. In bacterial biodiesel production waste glycerol (WG) was widely investigated as potential carbon source for medium chain length SCO production by different bacteria. Oleaginous microalgae species are one of the most promising feedstocks for the production of renewable biofuels due to their high growth rate, photosynthetic capacity and relatively low cost of production. Microalgae can use both inorganic and organic carbon sources in different modes of cultivation: phototrophic, heterotrophic, mixotrophic. Waste glycerol (WG) can be used as a low-cost carbon source for heterotrophic algae biomass production. Furthermore, various inexpensive waste materials lignocellulosic origin (from forestry, agricultural residues, and industrial wastewater), have been successfully applied for heterotrophic cultivation of microalgae for oil production.

One of the most powerful tools for modifying microbial bio-production is genetic engineering. Currently, the efforts in the field are focused on increasing oil yield by overexpression of native genes, identification of transcriptional control factors or introduction of novel genes from exotic or native, robust microbial species. Significant efforts are also underway to create recombinant microorganisms capable of converting sugars derived from lignocellulosic biomass to a variety of biofuels. Accumulation of lipid in the cell is typically a biphasic process requiring an excess of carbon over other nutrients, particularly nitrogen. The first phase is characterized by rapid cell growth until the nitrogen is consumed, which is followed by the second phase, wherein the excess carbon in the medium is converted to lipid. Opportunely, new technologies have been developed to achieve both significant promotion of biomass production and neutral lipid accumulation in one phase. These technologies and mechanisms of regulation of oil accumulation in microorganisms will be discussed in details.

Биология развития и качественный состав культуры клеток *Drosera rotundifolia* L.

Ханды М.Т.^{* **}, Мусабилова Ю.Р., Чернодод Г.К.^{*}, Григорчук В.П.^{*},
Моршнева А.В.^{**}, Верещагина Ю.В.^{*}, Горпенченко Т.Ю.^{*}

* ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН. Пр-т 100-летия Владивостока, 159, Владивосток, Россия.

** Дальневосточный федеральный университет. о. Русский, п. Аякс, 10, Владивосток, Россия.
handy_89@mail.ru

Росянка круглолистная (*Drosera rotundifolia* L.) – травянистое насекомоядное растение из семейства росянковые (*Droseraceae*). Экстракты *D. rotundifolia* обладают антибактериальными, противогрибковыми и противоопухолевыми свойствами, обусловленными содержанием флавоноидов и нафтохинонов. Экстракт *D. rotundifolia* широко применяется в народной медицине. По данным Baganyai, Joosten, стоимость 1 кг сухой биомассы *D. rotundifolia* составляет 1000-1200 EUR. При этом следует учитывать, что естественный ареал произрастания *Drosera* сокращается. Таким образом, становится актуальным поиск и разработка альтернативных технологий получения растительной биомассы данного вида с биологически активными веществами.

В настоящей работе проведено гистологическое и биохимическое исследование культуры клеток *D. rotundifolia*. Для исследования были взяты две клеточные линии *D. rotundifolia* «Green» и «Red», зеленого и красного цвета, соответственно. Линии были получены лабораторией биотехнологии Биолого-почвенного института ДВО РАН (ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН) в 2000 г. и трансформированы геном *rolC* из *Agrobacterium rhizogenes*.

Линия «Green» – морфогенная каллусная линия, преимущественно бледно-зеленого цвета в районе побегов и коричневого цвета в основании. В этой клеточной линии наблюдается наличие морфогенеза. На гистологических срезах четко определяется проводящая система каллуса, состоящая из клеток ксилемы и флоэмы (ситовидные трубки). Анализ гистологических срезов выявил наличие органогенеза и соматического эмбриогенеза. При этом в клеточной линии не происходило образование корней. Соматические зародыши (эмбриониды) состоят из одинаковых изодиаметрических клеток, содержащих небольшие вакуоли, большое ядро с несколькими ядрышками и плотную цитоплазму. При формировании соматического зародыша субэпидермальные клетки каллуса меристематической зоны, претерпевая несколько делений, формировали меристематический бугорок. В дальнейшем на нем закладывались листовые примордии и апекс будущего побега, образующие почку. Листовые примордии развивались в листья.

Линия «Red» – каллус малинового цвета, по краям бледно-розовый, в основании бурый. Основными структурными элементами каллуса линии «Red» являются глобулярные многоклеточные агрегаты, состоящие из тонкостенных округлых паренхимоподобных клеток, размер которых в среднем составляет 50 ± 25 мкм. Доля паренхимоподобных клеток в линии достигает 80 %. При цитологическом исследовании каллуса наблюдали клетки меристематического типа только по периферии, на поверхности каллуса. Их размер в среднем составляет 15 ± 7 мкм. Меристематические клетки характеризуются наличием нескольких ядрышек в ядре. Деление нерегулярное и асинхронное, преобладают клетки в метафазе, которые расположены рассеянно, по 1-2, меньше клеток в анафазе. В каллусе не наблюдались развитие морфогенных структур. Поверхность каллуса покрыта пленкой из секрета, на цитологических препаратах этот секрет окрашивался альциановым синим в бледно-голубой цвет, что говорит о присутствии кислых мукополисахаридов.

В результате предварительного качественного анализа методом ВЭЖХ-МС (определение изомерной формы соединений не произведены) были обнаружены флавоноиды: галлат эпигаллокатехина, мирицетин-3-О-β-галактопиранозид, мирицетин-3-О-β-гликопиранозид, гиперозид / кверцетин 3-галактозид, изокверцитрин / кверцетин-3-гликозид; эллаговая кислота и ее производные и предположительно 1.4-нафтохинон – плюмбазид А или россоллизид. В экстракте линии «Red» содержание флавоноидных гликозидов незначительно превышает содержание в экстракте линии «Green», кроме вещества галлат эпигаллокатехина относящегося к другой группе флавоноидов – катехинам. Содержание эллаговой кислоты в зеленой морфогенной клеточной линии практически в четыре раза, 1.4-нафтохинонов в три раза превышают таковой в линии «Red».

Таким образом, в линии «Green», для которой характерны органогенез и прямой соматический эмбриогенез, содержание эллаговой кислоты примерно в четыре раза превышает таковой в линии «Red», а показатель, соответствующий веществам плюмбазиду А или россоллизиду в три раза больше. В свою очередь, в линии «Red» наблюдали только клеточную дифференциацию специализированных клеток. Развитие морфогенетических структур в исследуемых клеточных линиях сопряжено с синтезами определенных вторичных метаболитов. Однако, для более глубокого понимания механизмов образования исследуемых веществ требуются дополнительные исследования.

В работе использовали оборудование Центра коллективного пользования «Биотехнология и генетическая инженерия» ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН.

Биосенсорная индикация кетоза растительных тканей

Пахомова В.М., Даминова А.И.

Казанский государственный аграрный университет. Карла Маркса ул., 65, Казань, Россия.
pahomovav@mail.ru

Концентрация кетоновых тел (бета-гидроксибутирата, ацетоацетата и ацетона) в норме очень низка. Но при голодании и некоторых других патологиях она может достигать очень высокого уровня, вызывая состояние кетоза в животных тканях. Ранее нами были описаны некоторые общие для животных и растительных тканей закономерности функционирования клеток в условиях голодания (автофагии). Цель настоящей работы - изучение возможности развития кетоза в растительных тканях в процессе хронического голодания. В ее задачу входило выяснение применимости полуколичественной биосенсорной индикации кетоновых тел с помощью диагностических полосок КЕТОФАН («Lachema», Чехия) на растительных тканях (срезах). Изменение pH среды не влияет на появление окраски полосок КЕТОФАН. Количественное определение ацетона в листьях проводили предварительной перегонкой и титрованием. Данные обоих методов совпадали.

Объект исследования – отсеченные зеленые листья 3-х летнего алоэ древовидного *Aloe arborescens*. Листья помещали в темноту при 4°C и 20°C. Контрольные листья находились в условиях комнатной освещенности и 20°C. Поверхность среза закрывалась пленкой Parafilm.

Образование кетонов в листьях зарегистрировано после их 10-ти суточной экспозиции при 4°C. Содержание кетонов в базипетальной части листа было $1,5 \cdot 10^{-3}$ М. После 20-ти суточной экспозиции листьев в этих условиях их содержание увеличивалось практически в два раза. Спустя 30 суток консервации листьев кетоны не регистрировались.

В акропетальной части листа образование кетонов через 20 суток достигало до $7,5 \cdot 10^{-3}$ М, а их отсутствие имело место спустя 35-суточной экспозиции листьев при пониженной температуре. Это явление может быть связано либо с перемещением кетоновых тел в эту часть листа из-за усиления подвижности веществ при катаболических процессах, либо со снижением общего метаболизма клеток более старой части листа (и, следовательно, с меньшей реутилизацией кетоновых тел). Таким образом, при голодании клеток в условиях консервации регистрируется фазное изменение содержания кетонов.

При длительной экспозиции отсеченных листьев в условиях темноты происходит субстратное голодание клеток в связи с прекращением воздушного и минерального питания. Ранее нами было установлено, что при этом отсеченные растительные ткани переходят на эндогенное питание (автофагию). Фактически автотрофия зеленых листьев на свету сменяется гетеротрофией клеток в условиях темноты. При падении содержания углеводов в клетках происходит превращение жиров в кетоны с последующим их использованием в качестве энергетических источников в митохондриях (переход клеток на альтернативные энергетические источники). Согласно литературным данным, при переходе клеток на окисление кетонов происходит меньшее образование активных форм кислорода (по сравнению с окислением глюкозы как основного источника энергии) и, следовательно, меньшее повреждение митохондрий. Один из кетонов бета-гидроксибутират может иметь сигнальную роль, приводя к экспрессии генома. Переход на окисление кетонов позволяет сдерживать окисление жизненно важных белков в условиях автофагии. Кетоны способны также усиливать биогенез митохондрий, проявляя свойства биогенных стимуляторов. Как известно, в клетках животных и растений (в том числе в отсеченных листьях алоэ) в условиях стресса, включая поранение, происходит образование сложного комплекса биогенных стимуляторов неспецифической природы (в том числе кетонов). Важно подчеркнуть, что в наших экспериментах на поверхности среза регистрировалось $15 \cdot 10^{-3}$ М кетонов через 48 часов экспозиции листьев в темноте; позднее они не диагностировались.

На основании вышеизложенного можно предполагать защитно-приспособительное значение образования кетонов в клетках растений при экстремальных условиях существования. Проведенные исследования показали возможность их биосенсорного определения.

Влияние 20E на рост и морфологию каллусной культуры *Lychnis chalconica* L. *in vitro*

Нечаева М.В., Головацкая И.Ф., Рухляда К.А.

Национальный исследовательский Томский государственный университет, пр. Ленина, 36, Томск, Россия.
ven_dy@sibmail.com

Экдистероиды – полиоксистероиды, являющиеся аналогами гормонов линьки и метаморфоза насекомых, широко распространены в растительном мире. В настоящее время установлены структуры более 400 соединений. В клетках животных эти соединения увеличивают выработку белка, активность ферментов (глутаматдекарбоксилазы, ацетилхолинэстеразы, Na^+ , K^+ -АТФ-азы, сукцинатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы и др.), являются естественными лигандами в молекулярных системах переключения генов, нормализуют липидный состав мембран, оптимизируют процессы окислительного фосфорилирования и синтеза макроэргических связей. Фитоэкдистероиды (ФЭ) – класс стероидных соединений растений, участвующих в их защите от растительноядных насекомых. Так же существуют предположения, что ФЭ регулируют рост и развитие растений и являются транспортными формами стероидов. Функции фитоэкдистероидов в растениях пока мало изучены. Неодинаковое содержание ФЭ в растении (от 0,001 до 3% от сухой массы) усложняет интерпретацию их функций. Недостаточно изучена роль ФЭ в регуляции ростовых процессов на клеточном уровне. Удобной моделью для изучения этих процессов может служить клеточная культура растений, содержащих ФЭ. В связи с этим целью исследования было изучение влияния экзогенного 20-гидроксиэкдизона (20E) на рост и морфологию каллусной культуры *Lychnis chalconica* L., полученной авторами, *in vitro*. В опытах была использована молодая и активно растущая культура 10-ого пассажа на твердой питательной среде Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением сахарозы, витаминов и гормонов (НУК и 6-БАП) в соотношении 4/1 (контроль) и МС+1 пМ 20E и МС+1000 пМ 20E (опыт). Изучали рост (прирост биомассы) и морфологию каллуса (размеры и форму клеток, и их соотношение). Нами установлено, что добавление 20E в питательную среду повышало интенсивность ростовых процессов в клеточной культуре за счет увеличения биомассы и содержания воды. Накопление сухого вещества в опытной клеточной культуре превышало таковое в контрольной культуре на 26 и 34% соответственно при действии 1 и 1000 пМ 20E. В то же время содержание воды увеличивалось на 21% при действии 1000 пМ 20E. Цитологический анализ показал, что 20E уменьшал средний объем клеток на 30-40% (1 пМ) и 50% (1000 пМ), что, вероятно, было связано с активацией клеточной пролиферации. Изменение фазы роста клеток было сопряжено с изменением их формы. В опытном каллусе увеличивалась доля овальных и вытянутых клеток (1 пМ) и округлых (1000 пМ) соответственно на 10-18% и 37%. Полученные данные показывают рост-регулирующую роль 20E в клеточной культуре *L. chalconica*.

Влияние активности антиоксидантных ферментов на процесс каллусообразования из почек *Pinus sylvestris*

Ершова М.А., Новичонок Е.В., Чирва О.В., Галибина Н.А.,
Никерова К.М., Игнатенко Р.В., Раевский Б.В.

Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук».
Пушкинская ул., 11, Петрозаводск, Россия.
maria_ershova_karnc@mail.ru

На территории Фенноскандии сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris*L.) – является одним из ключевых видов в лесном хозяйстве. В связи с этим большое внимание уделено селекционным программам этого вида, для получения выгоды от которых необходимо массовое размножение наиболее ценных генотипов. Для сосны обыкновенной, которая практически не поддается вегетативному размножению традиционными методами, увеличить количество посадочного материала, получаемого в процессе селекционной работы, возможно с привлечением биотехнологических методов. Для некоторых видов хвойных методы микроклонального размножения уже успешно применяются в коммерческом лесном хозяйстве для быстрого размножения ценных генотипов.

Однако, культивирование *P. sylvestris* сопряжено с рядом проблем, в том числе с высоким содержанием фенольных соединений и сильным окислительным стрессом во время культивирования. В результате в культуре часто отмечается быстрое видимое потемнение тканей, которое сопровождается деградацией клеточных мембран, разрушением клеточной структуры и гибелью клеток. Было показано, что накопление фенольных веществ и высокая активность ферментов антиоксидантной системы – пероксидазы (ПОД) и полифенолоксидазы (ПФО) предшествуют разрушению тканей, приводят к быстрому их потемнению и снижают скорость роста каллусов.

С целью изучения роли ПОД и ПФО в процессе каллусообразования мы изучили (1) зависимость скорости роста каллусов и степени их потемнения от активности ферментов в почках и каллусах; (2) зависимость этих процессов от генотипа дерева.

Почки отбирали в период вынужденного покоя (середина – конец марта) с 40-летних деревьев сосны обыкновенной, произрастающих на лесосеменной плантации (подзона средней тайги, республика Карелия). Почки были отобраны с 20 элитных клонов, каждый из которых был представлен двумя раметами. Часть растительного материала была введена в культуру *in vitro*. Для культивирования использовали среду Мурасиге-Скуга с модификацией Hohtola (1988). Вторая часть почек хранилась в холодильнике в течение месяца (при -18°C) с целью изменения окислительного метаболизма и снижения активности ферментов АОС. В процессе культивирования отмечали начало каллусообразования и степень потемнения. После месяца культивирования была измерена масса каллусов. Активность ПОД и ПФО определяли в почках до и после выдерживания в холодильнике, а также в каллусной ткани.

У большинства клонов начало каллусообразования отмечалось в течение недели. Однако скорость роста каллусов зависела от генотипа дерева: мы наблюдали как быстро пролиферирующие каллусы, так и каллусы, у которых пролиферация практически отсутствовала. В течение месяца культивирования потемнение отмечалось практически во всех линиях, однако для некоторых клонов было отмечено сильное потемнение уже после 10 суток культивирования. Активность ферментов АОС также отличалась у разных клонов. Обсуждается индикаторная роль ПОД и ПФО в выявлении растений сосны обыкновенной, обладающих высоким репродуктивным потенциалом, с целью их дальнейшего использования в соматическом эмбриогенезе.

Исследование выполнено за счет средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН.

Влияние двух ризосферных штаммов на микрорастения картофеля в условиях *in vitro* и *ex vitro*

Каргаполова К.Ю.* , Ткаченко О.В.* , Бурыгин Г.Л.* **, Евсеева Н.В.**

* Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова.
Театральная пл., 1, Саратов, Россия.

** Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН.
Энтузиастов пр., 13, Саратов, Россия.
kinaschchri@gmail.com

Ассоциативные ризосферные стимулирующие рост растений бактерии (PGPR) с успехом применяются в практике сельского хозяйства. Ранее нами были изучены штаммы ризобактерий нескольких таксономических групп, положительно влияющих на рост микрорастений картофеля. Были выделены бактериальные штаммы, способные активизировать развитие корневой системы микроклонов картофеля *in vitro*, стимулировать адаптацию полученных регенерантов к условиям *ex vitro*, а также повышать урожай мини-клубней. В том числе, изучали два штамма ассоциативных ризосферных микроорганизмов *Azospirillum brasilense* Sp245 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2. Было установлено, что каждый из этих штаммов в отдельности обладает способностью стимулировать рост микрорастений картофеля в условиях *in vitro* и *ex vitro*. Целью данного исследования являлось выявление и оценка эффективных комбинаций двух этих штаммов бактерий в отношении микрорастений картофеля.

Бактерии из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН *A. brasilense* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 были использованы для инокуляции микрочеренков картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сортов Невский и Кондор из коллекции микроклонов картофеля *in vitro* ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ. В опытных вариантах микрорастения картофеля, культивируемые *in vitro* на безгормональной жидкой питательной среде Мурасиге-Скуга, инокулировали суспензиями бактерий в различных сочетаниях: 1) штаммом *A. brasilense* Sp245 на этапе микрочеренкования (0 сутки культивирования); 2) штаммом *O. cytisi* IPA7.2 на 14 сутки; 3) двумя штаммами одновременно на 14 сутки; 4) поочередно штаммом *A. brasilense* Sp245 на 0 сутки и затем штаммом *O. cytisi* IPA7.2 на 14 сутки культивирования. Для инокуляции микрочеренков картофеля использовали суспензии бактерий в концентрации 10^6 клеток на мл питательной среды. В контрольном варианте растения не инокулировали и выращивали стерильно. Тридцатисуточные растения высаживали для адаптации к условиям *ex vitro* в сосуды с почвой и выращивали в течение 20 суток в оранжерее. После этого, растения переносили в открытый грунт и выращивали до получения клубней. На всех этапах оценивали морфометрические параметры растений.

На всех этапах выращивания микрорастений картофеля отмечались сортовые особенности: растения сорта Невский достоверно превосходили растения сорта Кондор по высоте побегов, количеству листьев, длине и количеству корней. Ростостимулирующий эффект от инокуляции бактериями в условиях *in vitro* и *ex vitro* также сильнее проявлялся именно на сорте Невский.

Бактерии *A. brasilense* Sp245 оказывали более существенное положительное влияние на растения в условиях культуры *in vitro*, тогда как ростостимулирующий эффект от инокуляции штаммом *O. cytisi* IPA7.2 сильнее проявился после высадки растения в сосуды с почвой в оранжерею и затем в открытый грунт. Отмечен положительный эффект коинокуляции в основном после высадки растений в почву в условия оранжереи и в поле. При этом по способу инокуляции (между вариантами 3 и 4) предпочтение следует отдать одновременной коинокуляции на 14 сутки, в том числе из-за технологического удобства методики.

По результатам анализа данных экспериментов установлено влияние бактериальных штаммов как по отдельности, так и во взаимодействии, которое по-разному проявлялось на различных этапах культивирования растений. Кроме того, отмечена существенная зависимость ростостимулирующего эффекта бактерий от генотипа картофеля. Максимальный положительный эффект взаимодействия двух штаммов отмечен на этапе выращивания инокулированных растений в открытом грунте. Полученные результаты показывают, что применение коинокуляции микрорастений при микроклональном размножении может быть признано эффективным приемом в технологии получения оздоровленного посадочного материала картофеля.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 19-016-00116.

Влияние липополисахаридов ризобактерий на морфогенетическую активность соматических каллусов пшеницы в культуре *in vitro*

Евсеева Н.В. *, Ткаченко О.В. **, Бурьгин Г.Л. *, Федоненко Ю.П. *, Матора Л.Ю. *, Лобачев Ю.В. **, Щеголев С.Ю. *

*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, просп. Энтузиастов, 13, Саратов, Россия.

**Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Театральная площадь, 1, Саратов, Россия.
evseeva_n@ibppm.ru

Культура соматических каллусов *in vitro* является основой многих биотехнологических подходов, применяемых в селекции растений. Однако для важнейших сельскохозяйственных культур, в первую очередь, злаков (в том числе мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L.), использование биотехнологических приемов сдерживается низкой морфогенетической активностью клеток и тканей в культуре *in vitro* у различных сортов и селекционных линий. Одним из приемов, активизирующих морфогенетические процессы в культуре *in vitro*, является инокуляция растительных объектов бактериями или их отдельными компонентами. В предварительных исследованиях установлено, что липополисахарид (ЛПС) бактерий *Azospirillum baldaniorum* Sp245 стимулирует формирование каллусов с очагами меристематической активности в культуре *in vitro* пшеницы, а также положительно влияет на регенерационную способность культивируемых тканей, в отличие от нейтрального действия ЛПС авирулентного штамма энтеробактерий *E. coli* K12.

Цель исследования – изучение влияния ЛПС бактерий рода *Azospirillum* из разных серологических групп на морфогенную способность соматических каллусов и регенерацию растений пшеницы в культуре *in vitro* для оценки действия О-специфических полисахаридов.

В данной работе мы сравнили влияние препаратов ЛПС трёх штаммов бактерий рода *Azospirillum* (*A. brasilense* SR55, SR75 и *A. lipoferum* SR65) из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН в отношении каллусов пшеницы (*Triticum aestivum* L. сорт Саратовская 29) двух линий (LRht-B1c и LRht-B1a), различающихся по морфогенной активности. Бактериальные ЛПС различались по химической структуре О-полисахарида, физико-химическим и серологическим свойствам. Установлено, что ЛПС штамма *A. lipoferum* SR65 в отношении обеих линий пшеницы достоверно стимулировал как морфогенез каллусов, так и развитие растений-регенерантов. При этом выход регенерантов в пересчете на общее число эксплантов достоверно повышался в 2,15 раза у более высокоморфогенной линии (LRht-B1c) и в 3,75 раза у низкоморфогенной линии (LRht-B1a). В то же время препараты ЛПС штаммов *A. brasilense* SR55 и SR75 у обеих линий пшеницы повышали либо только выход морфогенных каллусов, либо только выход растений-регенерантов, соответственно. В целом, действие ЛПС *Azospirillum* spp. сильнее проявлялось по отношению к низкоморфогенной линии LRht-B1a, что приводило к нивелированию различий между морфогенной активностью каллусов линий LRht-B1c и LRht-B1a. Таким образом, ЛПС бактерий рода *Azospirillum* являются перспективными стимуляторами морфогенеза растений и могут в будущем найти активное применение в селекции и генной инженерии при использовании в качестве элемента технологии каллусной ткани.

Влияние облучения красным светом на эффективность введения в культуру *in vitro* растений с контрастной фотопериодической чувствительностью

Авксентьева О.А., Батуева Е.Д.

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина.
avksentyeva@rambler.ru

Культура *in vitro* является адекватной современной биологической моделью для исследования растительного организма. Клетки растительных тканей в культуре *in vitro* способны сохранять ряд свойств, характерных для условий *in vivo*, в том числе и фотопериодическую чувствительность. В то же время известно, что морфогенез растений в условиях культуры *in vitro* имеет более широкий спектр проявления различных путей, чем при *in vivo*. Активация фитохромной системы в условиях *in vitro* может служить фактором стимулирования разнообразных путей морфогенетических реакций, однако этот процесс остается мало исследованным. Целью нашей работы было изучить влияние облучения монохроматическим красным светом КС (660 нм) на эффективность основных этапов введения в культуру *in vitro* растений с контрастной фотопериодической реакцией. Исследования проводили на базе лаборатории «Морфогенез высших растений *in vitro*» кафедры физиологии и биохимии растений и микроорганизмов Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина. Как растительный материал в работе использовали представителей семейства бобовых (Fabaceae), контрастных по фотопериодической реакции - длиннодневные растения (ДДР) гороха (*Pisum sativum* L.) сорт Меценат, короткодневные растения (КДР) сои (*Glycine max* (L.) Merr.) сорт Корсак и фотопериодически нейтральные растения (ФПН) сои (*Glycine max* (L.) Merr.) сорт Диадема Подолья. Поверхностную стерилизацию растительного материала – семян исследуемых культур проводили поэтапно: детергент → 70% этанол → 15% раствор NaClO → стерильная вода. Далее культивировали в чашках Петри по 5-7 эксплантов на среде для индукции первичного каллусогенеза Мурасиге-Скуга (МС + 10 мг/л 2, 4 Д) в термостате при температуре 26 °С. Опытные каллусы облучали красным светом (КС 660 нм) с помощью LED-матрицы на протяжении 30 минут в течение 7 суток, контрольные образцы культивировали без облучения. Отмечали эффективность стерилизации и частоту первичного каллусогенеза. Через 4 недели культивирования сформированные первичные каллусные ткани в опытных и контрольных вариантах пассировали на регенерационную среду МС + 3 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК и переносили в люминестат, где культивировали при условиях освещенности 2 клк, температуре 22 °С, фотопериоде 16/8 часов (день/ночь). В первую неделю культивирования также проводили облучение опытных образцов по 30 мин каждые 7 суток (в одно и тоже время суток) с помощью LED-матрицы монохроматического спектра 660 нм. В течение месяца вели наблюдения за проявлением различных путей морфогенеза – хлорофиллогенеза, геммогенеза, ризогенеза. Результаты экспериментов показали, что исследуемые растительные объекты – представители бобовых достаточно успешно вводятся в культуру *in vitro* при использовании данного протокола стерилизации. Эффективность стерилизации составила – 75-96 %, однако облучение КС (660 нм) снижало показатели эффективности введения в культуру *in vitro* на 5-10 % у всех исследуемых растительных объектов, независимо от их фотопериодической реакции. Представители бобовых успешно вводятся в культуру *in vitro* и формируют типичные каллусные ткани, что мы наблюдали в наших экспериментах. Частота и скорость формирования первичного каллуса больше и быстрее всего происходили у ДДР гороха посевного сорт Меценат, у ФПН сорт Диадема Подолья и КДР сои сорт Корсак – позже и с меньшей эффективностью, что, возможно, не связано с их фотопериодической реакцией, а определяется видовыми (сортовыми) особенностями объектов. Активация фитохромной системы путем облучения КС незначительно стимулировала каллусогенез у ДДР, практически не влияла на него у КДР и значительно ингибировала этот процесс у ФПН сои. При дальнейшем культивировании каллусных тканей на регенерационной среде нами отмечались различные проявления морфогенетических реакций. По результатам исследования морфогенетических реакций растений с контрастной фотопериодической реакцией в условиях культуры *in vitro* обнаружено, что у ДДР гороха сорт Меценат отсутствуют морфогенетические реакции ризогенеза и проявления некроза каллусных тканей, что свидетельствует об эффективной каллусной культуре, которая способна к формированию растений-регенерантов. При облучении КС (660 нм) происходила значительная стимуляция процессов геммогенеза – на 17% и незначительная хлорофиллогенеза – на 5%. У эксплантов КДР сои сорта Корсак выявлены все исследуемые формы морфогенетических реакций – ризо-, геммо-, хлорофиллогенез и проявления некроза, что может свидетельствовать о значительной тотипотентности тканей в условиях культуры *in vitro* и определенной сложности формирования растений-регенерантов из каллусных тканей. Облучение КС (660 нм) тормозило процессы ризогенеза, стимулировало геммогенез (адвентивное побегообразование), не влияло на хлорофиллогенез и ингибировало процессы некроза каллусных тканей. У эксплантов ФПН растения сои сорт Диадема Подолья также выявлены все исследуемые формы проявления морфогенетических реакций. Облучение КС (660 нм) стимулировало все проявления морфогенеза – ризогенез, геммогенез и хлорофиллогенез и снижало некроз эксплантов. В целом, наибольшую чувствительность к действию КС (660 нм) в условиях культуры *in vitro* проявляют каллусные ткани ФПН сорта сои Диадема Подолья.

Работа выполнена в рамках научно-исследовательской темы «Исследование молекулярно-генетических и физиолого-биохимических механизмов яровизационного и фотопериодического контроля онтогенеза растений *in vivo* и *in vitro*» № госрегистрации 0118U 002104.

Родиола розовая – редкое лекарственное растение с уникальным биохимическим составом. Препараты на основе данного растения оказывают целый ряд терапевтических эффектов, в том числе такие важные как стимулирующее, адаптогенное и антиоксидантное действие. Их применяют в реабилитационном периоде после операций, тяжелых инфекционных заболеваний и в качестве тонизирующего и общеукрепляющего средства.

В связи с тем, что лекарственным растительным сырьем являются корневища с корнями, в настоящее время из-за их неконтролируемого сбора произошло резкое сокращение численности и истощение природных популяций растения [Корытин, 2018]. Вид *Rhodiola rosea* занесен в Красные книги отдельных регионов и Российской Федерации и охраняется по всему ареалу.

Кроме того, существует целый ряд факторов препятствующих восстановлению разреженных зарослей родиолы: медленный рост корневища (восстановление зарослей в течение 5-10 лет), очень низкая семенная всхожесть (до 30%), необходимость длительной стратификации, высокий процент гибели проростков первого года, сокращение численности женских особей в большинстве популяций [Астафьев, 2007; Tasheva, Kosturkova, 2010; Павлова, 2015; Khapilina, 2016; Erst *et al.*, 2018].

Одним из решений данной проблемы является вегетативное размножение родиолы розовой, в том числе с использованием биотехнологических подходов, выращивая растения *in vitro* в лабораторных условиях.

Цель работы заключалась в оценке морфологических особенностей проростков родиолы розовой, обработанных стевииозидом, при введении их в культуру *in vitro*.

Объектом исследования служили проростки, полученные из стратифицированных в течение 30 дней семян родиолы розовой. Семена *Rhodiola rosea* были приобретены в питомнике Анисимова Г.П. (г. Томск).

Известно, что семена родиолы розовой обладают очень низкой всхожестью как в естественных, так и в лабораторных условиях. Существуют различные способы повышения всхожести семян: стратификация, обработка стимуляторами прорастания.

Ранее проведенные сотрудниками кафедры эксперименты свидетельствуют о том, что стевииозид в концентрации 10^{-8} М повышает активность ферментов прорастания у пшеницы, содержание растактивирующих фитогормонов (ауксинов и цитокининов) [Ogorodnova *et al.*, 2016; Огороднова с соавт., 2020]. В связи с этим интересно было посмотреть, окажет ли данный гликозид стимулирующее действие на прорастание семян и рост проростков родиолы розовой.

На первом этапе экспериментов необходимо было подобрать наиболее подходящее время обработки родиолы стевииозидом. Для этого стратифицированные семена замачивали в растворе стевииозидов на 3, 6, 12 и 24 ч. Контроль – на 24ч в водопроводной воде. Затем высаживали семена в чашки Петри на фильтровальную бумагу и фиксировали прорастание семян. Показано, что обработка стевииозидом ускоряет прорастание семян родиолы розовой. Во всех опытных вариантах всходы появились на 3-й день наблюдений, у контрольных на 7-й. По-видимому, длительная экспозиция в растворе стевииозидов 24ч сказывается негативно, угнетая развитие проростков (на 7-й день). Проростки выращивали до 60 дневного возраста в растительных (фотопериод 16/8-часовой цикл свет/темнота, интенсивность освещения 8 клк, температура $22 \pm 1^\circ\text{C}$).

Максимальный стимулирующий прорастание эффект по сравнению с контролем оказали 3-х и 12-ти часовые обработки стевииозидом, однако достоверное увеличение длины надземной и подземной части наблюдается только в варианте с краткосрочной обработкой 3ч. Кроме того, на 3й день наблюдений только в данном варианте хорошо заметны проростки.

Введение в культуру *in vitro* растительного материала требует соблюдения строго стерильных условий. По литературным данным подбор эффективного протокола стерилизации эксплантов родиолы розовой является одной из ключевых проблем [Tasheva, Kosturkova, 2010; Erst *et al.*, 2018]. Таким образом, на втором этапе экспериментов подобрали наиболее эффективную схему обеззараживания проростков контрольного и опытного вариантов: промывка проточной водой – 10 минут, выдержка в 70% этиловом спирте – 30 секунд и в растворе «Белизны» с содержанием гипохлорита натрия 0.16% – 20 минут с последующей трехкратной промывкой автоклавированной дистиллированной водой.

На третьем этапе экспериментов, после стерилизации экспланты переносили на безгормональную питательную среду МС, выращивали их в течение 3-х месяцев и проводили морфометрический анализ. Показано, что длина надземной и подземной части контрольных и обработанных стевииозидом растений не отличается. Однако стевииозид вызывает увеличение количества листьев и корней у проростков родиолы розовой в культуре *in vitro*. Таким образом, биомасса опытных растений оказывается выше контрольных, это может позволить значительно повысить коэффициент размножения путем клонального микроразмножения.

Таким образом, применение стевииозидов в культуре *in vitro* родиолы розовой может позволить решить сразу несколько проблем: стимулировать прорастание семян и активировать рост листьев и корней.

Влияние ферригидритов, допированных Co, Mn и Al, на индукцию каллусной культуры пшеницы

Ступко В.Ю.* , Зобова Н.В.* , Гуревич Ю.Л.**

* Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», Свободный пр., 66, Красноярск, Россия.

** Красноярский научный центр, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», Академгородок ул., 50, Красноярск, Россия.
stupko@list.ru

Наночастиц (НЧ), обладая большей биологической активностью, в сравнении с ионными формами удобрений, требуют отдельных исследований их взаимодействия с растениями. В подобных исследованиях широко задействованы НЧ оксидов металлов, получаемые физическими и химическими методами. Нами использованы биогенные ферригидриты (ФГ), как более экологичные формы. Добавление чистого ФГ приводило к ингибированию пролиферации каллусных культур пшеницы (КК) в дозе 10 и 50 мг/л. Однако имеются данные о стимулирующем влиянии ФГ, допированных алюминием и кобальтом, на корнеобразование черенков туи и садовых культур. Допирование ФГ металлами, такими как Mn, Co, играющих существенную положительную и отрицательную (Al) роль в растительных клетках, перспективно как для изучения механизма их действия, так и для создания комплексных удобрений. КК позволяют отследить воздействие агента на отдельных, изолированных во времени и пространстве, этапах онтогенеза.

С целью определения влияния ФГ, допированных металлами, на активность роста и процессы дедифференцировки растительных тканей данные агенты вносили в среду индукции каллусогенеза. В качестве эксплантов использовали зрелые зародыши различных генотипов яровой мягкой пшеницы селекции КрасНИИСХ. Образование каллусов индуцировали на среде Мурасиге-Скуга с добавлением 1 мг/л 2,4-Д. В опытных вариантах в среду перед автоклавированием добавляли ФГ, допированный кобальтом (Feh_Co), марганцем (Feh_Mn) или алюминием (Feh_Al), из расчета конечной концентрации 1, 10, и 50 мг вещества на литр среды. Культивирование вели при световом режиме день/ночь 14ч/10ч и 22-25°C. Через 30 дней фиксировали частоту формирования каллуса, его размер и наличие областей с зеленой окраской (ХСО). Введение в среду Feh_Co в концентрации 1 и 10 мг/л уменьшало частоту каллусогенеза на 18,1% и 10,7%, соответственно, в сравнении с контролем (Fisher $p \leq 0,05$). Показано достоверное снижение конечного размера каллуса на среде с 1 мг/л Feh_Co: $26,9 \pm 5,0$ мм³, при $34,9 \pm 3,9$ мм³ на среде без ФГ (M-U, U=32.0, Z=2.08, $p=0.04$). Отмечена тенденция к увеличению размера каллуса с ростом количества Feh_Co, добавленного в среду. В этих условиях увеличивалась частота ХСО до 55,6% (40,0% на контроле). Дальнейшее увеличение концентрации до 10 мг/л привело к росту данного показателя до 75%. Близкое значение получено и на среде с 50 мг/л Feh_Co.

Feh_Mn не оказывал ингибирующего влияния на индукцию формирования каллуса. Объем каллуса в среднем на этих средах оставался на уровне контроля. Однако размеры каллусов значительно различались на средах с 10 и 50 мг/л ФГ, демонстрируя увеличение объема почти в два раза, при увеличении дозы ФГ в пять раз (M-U, U=15,0, Z=-1,97, $p=0.05$). Feh_Mn в концентрации 1 мг/л приводил к увеличению доли ХСО до 66,7% (Fisher $p \leq 0,01$), а при уровне 10 и 50 мг/л доля ХСО снижалась в два раза в сравнении с контролем (с 40% до 24%) (Fisher $p \leq 0,05$). Уменьшение частоты каллусогенеза на 13,1% по отношению к контролю отмечено при достижении уровня 10 мг/л Feh_Al (Fisher $p=0,01$). Рост каллусов на среде с Feh_Al был минимальным (в два раза меньше контроля), а уровень ХСО составил 25% от контрольных значений.

В работе с чистым ФГ нами не было отмечено влияния НЧ на каллусогенез и долю ХСО. Допирование изменило характер реакций КК. ХСО свидетельствует о регенерационной активности КК пшеницы. Если рассматривать НЧ как носители биологически активных элементов, влияние их на образование ХСО можно связать с подавлением синтеза этилена кобальтом, который служит ингибитором дифференцировки тканей и способен снижать интенсивность распада хлорофилла в темноте. При концентрации НЧ 10 мг/л кобальт, возможно, выступает как хелатирующий агент, подавляя окислительные реакции, катализируемые железом, что приводит к отсутствию ингибирования пролиферации КК при внесении 10 и 50 мг/л Feh_Co, Марганец, являясь важным элементом фотосинтеза, при избытке приводит к снижению содержания хлорофилла в тканях, что объясняет снижение доли ХСО при добавлении 10 и 50 мг/л Feh_Mn. Другой подход к интерпретации влияния НЧ связан с их особенностями, как катализаторов разложения H₂O₂ и генерации АФК.

Нелинейный характер изменений параметров КК с ростом количества вносимых ФГ можно объяснить частичной коагуляцией. Вероятно, степень и характер этого процесса зависит и от допирующего металла. В случае с кобальтом, частицы активны уже при концентрации 1 мг/л. При внесении 50 мг/л НЧ коагулируют, в связи с чем не наблюдается дальнейшего роста доли ХСО и размера каллуса. Частичная коагуляция Feh_Mn, при дозе 50 мг/л, вероятно, приводит к снижению уровня свободных частиц до конечных концентраций средних между таковыми, формируемыми при внесении 1 и 10 мг/л, в связи с чем не наблюдается токсического эффекта на пролиферацию клеток, но сохраняется низкий уровень ХСО.

Таким образом, НЧ Feh_Co (10 мг/л) – перспективны для индукции органогенеза в КК и разработки фертилайзеров для полевых условий. Требуются дальнейшие исследования в отношении Feh_Mn в диапазоне 1-10 мг/л и Feh_Al – менее 1 мг/л в связи с токсическим эффектом последнего.

Влияние фитогормонов на каллусогенез *Artemisia jacutica* Drob.

Кучарова Е.В., Антонова Е.Е., Охлопкова Ж.М.

Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова. Белинского ул., 58, Якутск, Россия.
oleneek@mail.ru

Несмотря на многолетнюю историю существования метода культуры клеток и тканей, многочисленные разработки конкретных методик по реализации различных морфогенетических путей не всегда применимы к конкретным объектам, т.к. клеточные и молекулярные основы и механизмы морфогенеза остаются малоизученными и требуют более глубоких исследований. Каждый исследователь, занимающийся *in vitro* растений, ищет свой выгодный способ получения биоматериала.

В данной работе в качестве объекта выбрано дикорастущее растение полынь якутская (*Artemisia jacutica* Drob.). *Artemisia jacutica* Drob. содержит амазулен (более 40%) в составе эфирного масла, а также сесквитерпеновый лактон арглабин, имеет многовековую практику использования якутскими травниками как ценное пищевое и лекарственное растение.

Для получения стерильных проростков были использованы семена дикорастущих растений, собранные на территории районов Центральной Якутии. Семена стерилизовали поэтапно 3%-м раствором перекиси водорода, затем 70%-м этиловым спиртом с последующей многократной промывкой стерильной дистиллированной водой. Подготовленные семена были высажены на твердую питательную среду Мурасиге-Скуга (МС) без содержания фитогормонов, в колбы на 100 мл. Культивирование проводили в контролируемых условиях климатической камеры. Из полученных проростков в качестве эксплантов были использованы третьи и четвертые настоящие листья. Условия культивирования первичных каллусов варьировали по освещенности, температуре и составу компонентов питательной среды. При этом к основной питательной среде МС добавляли фитогормоны 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-D), 6-бензиламинопурин (6-БАП), α -нафтилуксусную кислоту (НУК) в разном соотношении. Культивирование проводили в условиях термостата (+24-25°C) в течение 33 суток, и на протяжении данного цикла проводили учет кривой роста каллусной биомассы.

Наиболее высокая частота каллусогенеза *Artemisia jacutica* Drob. и наилучший прирост сырой массы каллуса наблюдались при соотношении фитогормонов: 2,4-D - 1 мг/л, 6-БАП – 1 мг/л, НУК – 1 мг/л.

Выявление протеинкиназной активности продукта гена *sll0005 (spkH)* цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC6803

Зорина А.А. *, Новикова Г.В. *, Клычников О.И. **, Леусенко А.В. *

* Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.

** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. Ленинские горы, 1, Москва, Россия.
zorina.anna@yahoo.com

Одними из ключевых игроков в механизме передачи и усиления вне- и внутриклеточных сигналов являются протеинкиназы. Эти белки составляют едва ли не самое многочисленное семейство ферментов. В зависимости от особенностей их функционирования они подразделяются на несколько групп, каждая из которых имеет характерную доменную организацию, специфичность, и, соответственно, набор «собственных» белков-мишеней.

Целью нашей работы было изучение фосфотрансферазной активности и специфичности функционирования продукта гена *sll0005*. До начала нашего исследования продукт гена *sll0005* аннотирован в базах данных как «белок с неизвестной функцией», а на основании гомологии нуклеотидной последовательности отнесён к группе потенциальных серин-треониновых протеинкиназ (СТПК).

Мы провели гетерологичную экспрессию гена *sll0005* в *E.coli*, получили растворимый рекомбинантный белок, очистили его при помощи аффинной хроматографии, и при помощи масс-спектрометрически подтвердили, что он является продуктом гена *sll0005*. Далее, в реакциях фосфорилирования *in vitro* с радиоактивно меченой [γ -³²P]АТФ проверяли протеинкиназную активность очищенного белкового образца и выясняли его субстратную специфичность. В реакциях *in vitro* тестировали следующие субстраты: основной белок миеллина (МВР), гистон H1 и казеин. Выбор перечисленных субстратов основан на том, что они являются наиболее часто используемыми экзогенными белками-мишенями СТПК. Нами было продемонстрировано, что полученный белок, кодируемый геном *sll0005* цианобактерии *Synechocystis*, является активной протеинкиназой, предпочтительно модифицирующей казеин. Варьируют также и условия реакции фосфорилирования. Мы установили, что для проявления наибольшей ферментативной активности для протеинкиназы SpkH необходимо присутствие ионов марганца, а не магния как для большинства СТПК.

Полученные нами данные доказывают, что продукт гена *sll0005* действительно является активной протеинкиназой, его субстратная специфичность говорит в пользу принадлежности к семейству СТПК, однако предъявляет иные требования к присутствию ионов металлов в реакционной среде. Таким образом, эти новые данные расширяют представление о классе активных регуляторных молекул одноклеточной цианобактерии *Synechocystis*.

Работа авторов проводится при частичной поддержке РФФИ (грант № 20-04-00757).

Гены *CLE* в соматическом эмбриогенезе *Medicago truncatula*

Кудряшов А.А., Творогова В.Е., Лутова Л.А.

Санкт-Петербургский Государственный Университет,
Университетская набережная, д. 7–9, Санкт-Петербург, Россия.
A23.10.2012@yandex.ru

Соматический эмбриогенез – особый тип регенерации у растений, который нашёл своё применение в биотехнологии. Его используют в методиках трансформации растений и при получении искусственных семян. В предыдущем исследовании было показано, что ген MtWOX9-1 оказывает влияние на способность к образованию соматических эмбрионов у люцерны (*Medicago truncatula*). Так как гены семейства WOX, к которому относится MtWOX9-1, часто регулируются CLE-пептидами, мы предположили, что существует CLE, положительно влияющий на экспрессию MtWOX9-1. В предыдущей работе нами уже было выявлено влияние сверхэкспрессии MtWOX9-1 на количество мРНК генов MtCLE06, MtCLE08, MtCLE16 и MtCLE18. Существуют примеры регуляции генов WOX пептидами CLE по принципу обратной связи, поэтому сейчас мы ищем регуляторы MtWOX9-1 среди этих четырёх генов. Для этого мы провели ряд опытов и проанализировали доступные литературные данные. В данной работе была найдена корреляция между уровнями экспрессии генов MtCLE06, MtCLE08 и MtCLE18 и гена MtWOX9-1, а также сделан ряд выводов о возможных функциях этих генов в растениях.

Гетерологичная экспрессия АТФазы Р-типа микроводоросли *Dunaliella maritima* в клетках *Saccharomyces cerevisiae* и влияние различных сигнальных последовательностей на клеточную локализацию рекомбинантного белка

Храмов Д.Е. *, Рябова А.В. **, Карнычев И.В. *, Попова Л.Г. *

* Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.

** Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, ул. Вавилова, 38, Москва, Россия.

khramov.de@yandex.ru

АТФазы Р-типа образуют большое семейство интегральных мембранных белков как эукариотического, так и прокариотического происхождения. Белки этого семейства осуществляют транспорт через биомембраны малых катионов (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , H^+), ионов тяжелых металлов и фосфолипидов против градиента их электрохимического потенциала. Источником энергии для транспорта служит гидролиз АТФ.

В отличие от большинства высших растений, у некоторых низших растений - зеленых галотолерантных микроводорослей, а также и у некоторых мхов есть Na^+ -АТФазы Р-типа, которые играют большую роль в солеустойчивости этих организмов. Функция Na^+ -АТФаз заключается в экспорте из цитоплазмы избытка токсичных ионов натрия. У высших растений аналогичную функцию выполняют вторично-активные транспортные системы, такие как Na^+/H^+ -антипортеры плазмалеммы и тонопласта.

Целью данной работы является исследование функции АТФазы Р-типа (названа нами *DmHA2*), клонированной ранее из галотолерантной микроводоросли *Dunaliella maritima* (GenBank ID: AQM50087.1). Биоинформатический анализ указывает на принадлежность *DmHA2* к группе протонных АТФаз Р-типа. Однако сходство *DmHA2* с хорошо изученными протонными АТФазами высших растений невелико. Больше сходство *DmHA2* проявляет с малоизученными протонными АТФазами микроводорослей и паразитических протист, H^+ -транспортирующая функция которых экспериментально не подтверждена. Топологическое моделирование показало, что *DmHA2* является интегральным мембранным белком с десятью трансмембранными сегментами. Такое количество трансмембранных участков характерно для АТФаз Р-типа, относящихся к подсемействам Р2 (включает Na^+ -АТФазы) и Р3 (включает H^+ -АТФазы) семейства АТФаз Р-типа.

Для исследования транспортной функции *DmHA2* был выбран подход, основанный на функциональной комплементации солечувствительного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, у которого нокаутированы гены собственных Na^+ -транспортирующих систем: Na^+ -АТФазы *ENA* и Na^+/H^+ -антипортера *NHA1*. Необходимым условием для функциональной комплементации является локализация гетерологичного белка *DmHA2* в плазматической мембране дрожжевой клетки. С целью детекции локализации гетерологичного белка в дрожжевой клетке были получены конструкции на основе дрожжевого экспрессионного вектора рМВ1, несущие последовательность, кодирующую *DmHA2*, слитую N-концом с CDS зеленого флуоресцентного белка (*GFP-DmHA2*). Были также получены конструкции, кодирующие рекомбинантные белки *MF α 1-GFP-DmHA2* и *PHO5sp-GFP-DmHA2*, в которых на N-конце *GFP-DmHA2* находились различные сигнальные последовательности. В качестве последних были использованы препросегмент α -фактора (*MF α 1*) и сигнальная последовательность периплазматического белка – репрессибельной кислой фосфатазы (*PHO5sp*) из *S. cerevisiae*. В случае использования сигнальной последовательности *PHO5* удалось добиться локализации слитого белка *PHO5sp-GFP-DmHA2* на периферии дрожжевой клетки, что наблюдали при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа. Для того, чтобы подтвердить, что рекомбинантный белок был действительно локализован в плазмалемме, дрожжевые клетки подвергали плазмолизу или получали из них протопласты. Все полученные данные указывали на локализацию *PHO5sp-GFP-DmHA2* в плазматической мембране.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, в рамках научного проекта № 20-04-00903.

Динамика метаболома в процессе развития суспензионной культуры *Nicotiana tabacum*

Пузанский Р.К. *, Кирпичникова А.А. **, Шаварда А.Л. *, Емельянов В.В. **, Шишова М.Ф. **

* Ботанический Институт им. Комарова РАН, ул. профессора Попова 2П, Санкт-Петербург, Россия.

** Санкт-Петербургский Государственный Университет,
Университетская наб. 7/9, Санкт-Петербург, Россия.
puzansky@yandex.ru

Суспензионные культуры клеток растений нашли широкое применение в качестве модельного объекта для изучения разнообразных физиологических и биохимических процессов. При условии синхронизации, клетки одновременно переходят от одной фазы развития к другой, а, следовательно, являются физиологически однородными.

В данной работе модельным объектом служила клеточная культура, полученная из паренхимных клеток стебля табака *Nicotiana tabacum* VBI (Virginia Bright, Italia). Суспензию культивировали в темноте, при температуре 25°C, при постоянном перемешивании на ротационном шейкере. Было показано, что для данной культуры цикл развития занимал 28-30 дней. В нашем эксперименте 7 день соответствовал окончанию активной пролиферации и переходу к росту растяжением, 14 день – интенсивному росту, а 21 день – завершению роста растяжением и началу старения культуры.

Цель данного исследования заключалась в анализе метаболитных спектров клеток в процессе роста растяжением. Анализ проведен с использованием газовой хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией. Профили метаболитов клеток табака содержали около 300 соединений, из которых нами было идентифицировано около 100, и еще для 50 был определен химический класс. Наиболее широко в полученных метаболитных профилях были представлены сахара (около 65), в том числе пентозы, гексозы и олигосахариды. Также были детектированы 25 аминокислот и еще около 10 различных интермедиатов азотного метаболизма, около двух десятков карбоновых кислот и интермедиатов энергетического метаболизма. Интересной особенностью представляется небольшое разнообразие жирных кислот и их производных (всего 7 метаболитов), а также стероидов (5 метаболитов).

Для того, чтобы выявить паттерны сходства метаболитных профилей были проведены снижение размерности методами без учителя (PCA, nPCA, MDS, LLE), и последующий иерархический кластерный анализ. Можно заключить, что метаболитные профили группируются согласно времени развития культуры, что свидетельствует о сильной связи метаболома с фазой роста. Отметим сходство между собой метаболитных профилей клеток в конце 2й и 3й недели, что соответствует разным этапам роста растяжением. Клетки культур на 7 день, находящиеся в фазе завершения пролиферации, метаболически резко отличались.

Для выявления метаболитов, содержание которых наибольшим образом связано с фазой роста культуры, был проведен анализ методами (O)PLS-DA и Random Forest в сочетании с MSEA (Metabolite Set Enrichment Analysis). Показано, что клетки после периода пролиферации отличаются высоким содержанием аминокислот, что может отражать интенсивные синтетические процессы, поддерживающие деление клеток. Высокий уровень фосфатов сахаров, по-видимому, связан с высокой активностью гликолиза, энергетически обеспечивающего рост биомассы. Повышенное в период пролиферации содержание фитостероидов, включая стигмастерин, β -ситостерин и кампестерин, может отражать активность клеточных мембран.

Рост растяжением растительных клеток представляет собой быстрое вертикальное удлинение клетки, сопровождающееся увеличением клеточного объема. Он лежит в основе тропизмов, формирования проводящей системы, увеличения размеров запасующих органов и др., что позволяет рассматривать этот процесс в качестве этапа дифференциации, свойственного большинству клеток растительного организма. Проведенный метаболомный анализ на этапе интенсивного роста выявил падение уровня аминокислот, фосфатов сахаров и стероидов. Однако этот этап характеризовался повышением уровня карбоксилатов, что возможно связано с некоторой активацией ЦТК, обусловленной интенсивным дыханием, обеспечивающим энергетический баланс клеток. Рост растяжением сопровождался накоплением осмолитов, важнейшими из которых являются сахара, в том числе глюкоза и фруктоза. На этапе завершения роста растяжением в клетках отмечен небольшой рост уровня аминокислот и интермедиатов азотного обмена. Возможно, это отражение перераспределения азота, аналогичное таковому в стареющих листьях растений. Кроме того, аминокислоты могут играть роль альтернативных субстратов дыхания при стрессе, сопровождающим начало старения культур. Другим проявлением старения клеток может служить снижение уровня сахаров, в связи с замедлением энергетического обмена и выравниванием осмотического давления. Повышение уровня свободных жирных кислот может отражать процессы перестройки или деградации мембран.

Таким образом, можно заключить, что клеточные культуры разного возраста обладают метаболомными особенностями, соответствующими специфике фазы роста.

Исследования выполнены при поддержке РФФИ (проект №19-04-00655).

Дифференциация и синтез фенольных соединений в каллусных и суспензионных культурах *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.

Румянцева Н.И., Костюкова Ю.А.

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр "Казанский научный центр Российской академии наук», ул. Лобачевского, 2/31, Казань, Россия.
nat_rumyantseva@mail.ru, j.kostyukova@mail.ru

Синтез вторичных соединений в растениях является органо- и тканеспецифичным, а также определяется стадией онтогенетического развития растения. Гречиха татарская *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. относится к растениям с интенсивным фенольным метаболизмом. В ней синтезируются почти все классы флавоноидов, а также фенольные кислоты (оксикоричные и оксibenзойные), лигнаны и терпеноиды. Наиболее представленным флавоноидом является рутин, содержание которого в гречихе татарской в десятки раз превышает его содержание в гречихе культурной.

В культивируемых клетках растений синтез вторичных соединений во многом определяется дифференциацией клеточных культур. В культурах клеток гречихи татарской, полученных из незрелых зародышей, способность к синтезу флавонола рутина сохраняют только морфогенные культуры, для неморфогенных культур характерны низкий уровень ФС и следовое содержание рутина. Помимо рутина наиболее представленной группой ФС в морфогенных культурах *F.tataricum* являются проантоцианидины (ПА). Морфогенные культуры клеток *F.tataricum* являются гетерогенными, и остается неясным, существует ли в них структурно-тканевая специфичность в синтезе и локализации определенных классов ФС. Цель исследования заключалась в определении локализации ФС, проантоцианидинов (ПА) и флавонола рутина в каллусных и суспензионных культурах *F.tataricum*. Для этого использовали комплекс микроскопических методов и подходов. Специфичность в локализации ФС выявляли фиксацией в глутаровом альдегиде с постфиксацией в OsO₄ и без OsO₄ в фиксаторе Карновского, с последующим окрашиванием срезов толдуидиновым синим. Изучение локализации ПА и рутина проводили на прижизненных препаратах: ПА выявляли по специфическому окрашиванию ДМАСА, а флавонолы – по формированию окрашенных комплексов с ДРВА.

Гистологические исследования показали, что в морфогенных культурах *F.tataricum* можно выделить два типа проэмбриогенных клеточных комплексов (ПЭКК), обозначенных нами как ПЭКК I и ПЭКК II. Из них по одноклеточному или многоклеточному пути формируются новые ПЭКК (на среде с 2,4-Д) или эмбриониды (на среде без гормонов). Визуально эти структуры сложно различимы, но на гистологических срезах при фиксации OsO₄ или окрашивании толуидиновым синим (без фиксации OsO₄) обнаружено, что поверхность ПЭКК I покрыта несколькими слоями сильно вакуолизированных клеток, накапливающих ФС в вакуоли. Поверхность ПЭКК II покрыта эпидермоподобными клетками без отложения ФС в вакуоли. В некоторых ПЭКК поверхностные клетки с ФС могли чередоваться с эпидермоподобными клетками без ФС в вакуоли. Прижизненное окрашивание специфическими красителями на ПА и рутин показало, что ПЭКК I накапливают ПА в вакуолях поверхностных клеток, но не синтезируют рутин, тогда как ПЭКК II накапливают рутин, но не синтезируют ПА. При старении ПЭКК, которое сопровождается разрыхлением, в ПЭКК II прекращается синтез рутина и начинается синтез ПА. При старении ПЭКК ПА накапливаются как в поверхностных, так во внутренних клетках как ПЭКК I, так и ПЭКК II.

Обсуждается морфогенетическая пластичность ПЭКК и их структурная и метаболическая общность с органами и тканями растения.

Работа выполнена в рамках госзадания КИББ ФИЦ КазНЦ РАН.

Изменение ультраструктуры зеленой водоросли *Trebouxia*, фикобионта лишайника *Hypogymnia physodes*, вследствие аэротехногенного загрязнения

Власова Т.А.

Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносова, Биологический ф-т, каф. физиологии растений,
Ленинские горы, 1, 119992 Москва.
tat_vla@list.ru

Листоватый лишайник *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. относится к эпифитным лишайникам. Известно, что именно эпифитные лишайники особенно чувствительны к загрязнению воздуха и поэтому часто используются для лишайноиндикации. При этом среди показателей учитываются, в частности, морфология, анатомия и ультраструктура талломов. Целью настоящей работы являлось изучение влияния загрязнения воздуха часто встречающимся поллютантом SO₂ на ультраструктуру таллома лишайника *H. physodes*, уделяя особое внимание ультраструктуре фикобионта *Trebouxia*. Талломы лишайника *H. physodes* собирали в лесу на берегу озера Имандра на Кольском полуострове, в условиях загрязнения воздуха выбросами промышленных предприятий с преобладанием SO₂. Контролем служили талломы лишайника из экологически чистой местности в окрестностях Беломорской Биостанции МГУ. Исследование талломов проводили методом трансмиссионной электронной микроскопии. Материал фиксировали глутаровым альдегидом, постфиксировали OsO₄ и после обезвоживания заливали в аралдит. Количество талломов лишайника на стволах деревьев было меньше, чем в незагрязнённой местности. Явных морфологических изменений талломов не было обнаружено, хотя их размеры были меньше, чем в контрольных условиях. Однако электронно-микроскопическое изучение выявило заметные изменения ультраструктуры обоих компонентов таллома. Контакты между симбионтами наблюдали несколько реже, чем в контроле. Как фикобионт, так и микобионт имели утолщенные клеточные стенки. В цитоплазме клеток микобионта уменьшалось количество запасующих тел. Как в цитоплазме, так и в вакуолях увеличивалось число электронноплотных включений. Наличие таких включений в вакуоли наряду с крупными липидными каплями нередко встречается у грибов при воздействии токсических веществ, что иногда относят к симптомам противодействия их влиянию. В клетках фикобионта *Trebouxia* наблюдалось отхождение плазмалеммы от клеточной стенки. Имелись довольно большие вакуоли, часто с зернистыми включениями. Некоторые вакуоли имели характер автофагических, так как содержали мембранные образования. Большую часть клетки, как и в норме, занимал хлоропласт. Однако размеры хлоропластов были в среднем меньше нормы, и форма становилась более угловатой. Стопки тилакоидов в хлоропластах местами были более разрежены. Пиреноид оставался довольно крупным, но имел менее правильную форму и был сильно вакуолизирован, содержал пиреноглобулы, число оторых варьировало. Вероятно, обнаруженные изменения связаны со снижением активности фотосинтеза и общего метаболизма фикобионта, а также ослаблением общего метаболизма лишайника. Однако из данных литературы известно, что в случае прекращения воздействия повреждающего фактора возможно восстановление нормального состояния организма-биоиндикатора. В наших предыдущих опытах также наблюдалась обратимость деструкции и делихенизации подвергнутых стрессу лишайников после возвращения их в благоприятные условия, если процессы деградации не заходили слишком далеко. Возможно, это обусловлено в основном метаболической лабильностью фикобионта, что обеспечивает выживание всего лишайника.

Изменение фотосинтетической активности листьев винограда при различных концентрациях сахарозы в условиях *in vitro*

Мишко А.Е., Сундырева М.А., Луцкий Е.О.

Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия.
Ул. 40-летия Победы, 39, Краснодар, Россия.
mishko-alisa@mail.ru

Введение растений в культуру *in vitro* достаточно сложный процесс, для осуществления которого необходимы знания видовой или сортовой специфики объекта, а также создание определенных контролируемых условий произрастания. Для роста и развития таких растений требуется высокий уровень относительной влажности воздуха, отсутствие флуктуаций в температурном режиме, определенный уровень освещения отличный от естественных условий, длинный 16-часовой фотопериод, сбалансированный состав питательной среды и соблюдение защитных мер от источников внешнего заражения патогенными организмами. При переходе в условия *ex vitro*, резко отличающиеся от исходных, растения испытывают стресс, нередко приводящий к гибели или сильно снижающий их жизнеспособные характеристики. Более сглаженный переход на этапе адаптации позволяет растениям постепенно пройти акклиматизацию к новым условиям произрастания.

Сахароза является одним из компонентов питательной среды *in vitro*. Ее высокое содержание в некоторой степени ингибирует фотосинтез, и тем самым снижает адаптационные характеристики растений при переходе в *ex vitro*. Таким образом, чтобы повысить жизнеспособность растений, необходимо найти оптимальный состав питательной среды, учитывая сбалансированное потребление сахарозы.

В настоящем исследовании было изучено влияние различной концентрации сахарозы в составе питательной среды при микроклональном размножении крымского аборигенного сорта винограда *Vitis vinifera* L. Кандаваста на фотосинтетические параметры листа и уровень развития окислительного стресса в течение 4 и 8 недель на этапе размножения и укоренения, а также после 2 недель на этапе адаптации. Питательная среда содержала 6 г/л агара, 0.2 мг/л индолилуксусной кислоты и сахарозу в концентрациях 5, 10, 20 и 30 г/л. Условия *in vitro* поддерживали при температуре воздуха 23-24°C, освещенности 2000-2500 лк и высокой относительной влажности. После 8 недель растения пересаживали в грунт – смесь почвы и торфа. Фотосинтетическую активность листьев определяли по изменению содержания пигментов и показателя квантового выхода фотохимической реакции фотосистемы II. Развитие окислительного стресса оценивали по изменению содержания пероксида водорода и малонового диальдегида, который является одним из конечных продуктов перекисного окисления липидов клеточных мембран. Кроме того, были проведены серии ПЦР анализов для исследования уровня экспрессии генов, участвующих в формировании и функционировании фотосинтетического аппарата листа: гены АТФ-синтазы хлоропластов (ATP_{sy}), белка светособирающего комплекса (Lhcb6) и рубиско-активазы (RuAc).

В ходе проведенных работ было выявлено, что содержание хлорофиллов *a* и *b* в первые 8 недель значительно не изменялось при различных концентрациях сахарозы, но на этапе адаптации при концентрациях сахарозы 20 и 30 г/л было отмечено снижение пигментов. Спад квантового выхода фотосистемы II наблюдали уже на 8 неделе при максимальных концентрациях сахарозы. Содержание каротиноидов на 4 неделю возрастало по мере увеличения концентрации сахарозы, но на 8 неделе укоренения и 2 неделе адаптации были зафиксированы минимальные значения каротинидов при концентрациях сахарозы 20 и 30 г/л. Обратная динамика была выявлена при анализе пероксида водорода и малонового диальдегида в листьях винограда. Было установлено, что при более высоких концентрациях сахарозы происходило повышение этих двух показателей. Наиболее существенное снижение экспрессии генов наблюдалось уже при 10 г/л сахарозы в среде. Оценка экспрессии генов, участвующих в образовании и функционировании фотосинтетического аппарата у 8-недельных растений винограда, показала, что повышение концентрации сахарозы в среде ингибировало экспрессию генов ATP_{sy}, LHCb6 и RuAc.

Таким образом, низкообогатенная среда сахарозой способствовала более эффективному формированию фотосинтетического аппарата на этапе укоренения растений винограда, а также большему содержанию пигментов на этапе адаптации. Растения, выращенные на высокообогатенной среде, характеризовались более интенсивным окислительным стрессом, который, по-видимому, связан, как с осмотическим шоком, так и с нарушениями в формировании фотосинтетического аппарата. Для эффективного роста и развития винограда в условиях *ex vitro* оптимальными являются низкие концентрации сахарозы в питательной среде на этапе укоренения растений.

Изменения в накоплении фенольных соединений у культивируемых *in vitro* клеток чайного растения в присутствии *L*-фенилаланина и при воздействии высокой температуры

Нечаева Т.Л. *, Аксенова М.А. **, Живухина Е.А. **

* Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.

** Московский педагогический государственный университет. Малая Пироговская ул., 1/1, Москва, Россия.
NechaevaTatyana.07@yandex.ru

Фенольные соединения (ФС) – одни из самых распространенных вторичных метаболитов высших растений. Функциональная роль их чрезвычайно разнообразна и связана с процессами роста, пигментации, дыхания, фотосинтеза, защиты растений от стрессовых воздействий. Для ФС характерна высокая биологическая активность, что представляет большой интерес для фармакологии и медицины.

Для изучения биосинтеза ФС и выяснения механизмов его регуляции успешно используются культуры клеток и тканей высших растений. К их числу относятся каллусные культуры чайного растения, сохраняющие способность к образованию соединений фенольной природы, хотя и на более низком уровне по сравнению с исходными эксплантами. Один из подходов для повышения их содержания в культурах *in vitro* может быть экзогенное воздействие веществами, которые являются промежуточными продуктами биосинтеза вторичных метаболитов, а именно, так называемыми «предшественниками». К числу относится *L*-фенилаланин (ФА), из которого на начальных этапах биосинтеза ФС путем дезаминирования образуется *транс*-коричная кислота, а затем и другие соединения фенольной природы. К регуляторам фенольного метаболизма относятся и различные стрессоры, в том числе и высокие температуры. Несмотря на то, что чайное растение является теплолюбивой культурой, высокая температура ограничивает ее рост и продуктивность.

Цель работы – изучение экзогенного влияния ФА на содержание ФС в каллусных культурах чайного растения до и после кратковременного воздействия высокой температуры.

Каллусные культуры чая (*Camellia sinensis* L.) выращивали при 25°C в темноте на питательной среде Хеллера, содержащей глюкозу (25 г/л), 2,4-Д (5 мг/л) и агар (7 г/л). При постановке опытов каллусы субкультивировали в жидкой питательной среде с добавлением 3 мМ ФА или без него при перемешивании. Через 7 дней часть культуры оставляли в тех же условиях, тогда как другую подвергали кратковременному воздействию высокой температуры (30 мин, 38°C). Отбор проб производили через 30 мин после его завершения (быстрый ответ) и через 5 суток (отдаленный ответ).

Фенольные соединения извлекали из каллусных культур 96% этанолом при 45°C в течение 45 минут. После центрифугирования гомогената (16000 об./мин, 20 мин), надосадочную жидкость отделяли и использовали для спектрофотометрического определения содержания суммы ФС с реактивом Фолина-Дениса (725 нм). Калибровочную кривую строили по (-) эпикатехину.

Установили, что у каллусов чая 7-дневного возраста, выращиваемых на среде с ФА, содержание ФС в 2 раза превышало таковое у культур, выращиваемых на основной среде. У 12-дневных культур этот эффект не наблюдался, и количество этих вторичных метаболитов было одинаковым. Следовательно, повышение накопления ФС в каллусных культурах чая, выращиваемых на среде с ФА, отмечалось лишь на начальных этапах их роста.

После кратковременного воздействия высокой температуры (30 мин) на 7-дневные каллусы, количество ФС повышалось у культур, растущих на основной питательной среде, и снижалось среде с ФА. Иная тенденция отмечалась через 5 дней после воздействия стрессора: в каллусах, растущих на основной среде, содержание ФС снижалось, а в присутствии ФА - увеличилось.

Согласно полученным данным, можно предположить наличие регуляторного действия экзогенного ФА на накопление ФС в культивируемых *in vitro* клетках чая и их устойчивость к воздействию высокой температуры.

Изменения метаболизма зеленых микроводорослей как реакция на экологический стресс или комбинацию стрессов: использование стрессов в качестве индукторов продуктивности биомассы и внутриклеточного накопления синтезированных экономически значимых биомолекул

*Козлова Т.А. *, Levin D.B.***

* Институт Физиологии Растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.

** University of Manitoba, 66 Chancellors Cir, Winnipeg, MB, Canada.

kozlova@ifr.moscow*, David.Levin@umanitoba.ca**

Метаболизм зеленых микроводорослей (отдел *Chlorophyta*, классов *Trebouxiophyceae*, *Chlorophyceae*) имеет общие черты и отличия по сравнению с высшими растениями и цианобактериями. Под воздействием стрессов схожесть и различия проявляют себя по-разному, в зависимости от природы и силы стресса (например, концентрации вещества-стрессора), от стадии развития популяции водорослей, от индивидуальных особенностей видов и штаммов водорослей и от условий выращивания культур. Говоря обобщенно и в согласии с Парацельсом, любой стрессор может иметь как негативное, так и позитивное влияние на физиологию водорослей, что зависит не только от «дозы» стрессора, но и от всех перечисленных выше факторов. Более сложное и малоизученное воздействие имеют комбинации стрессоров на метаболизм водорослей. Однако в природных экосистемах и зачастую в инженерных сооружениях по выращиванию биомассы популяции водорослей испытывают на себе влияние комбинированных стрессов. Таким образом, изучение влияния возможных комбинаций стрессов на метаболизм микроводорослей является важной задачей в сфере производства биомассы для ее дальнейшего использования в различных отраслях промышленности. Знание внутриклеточного взаимоотношения «стресс-реакция» при определенном сценарии выращивания позволит направленно манипулировать метаболизмом клеток для максимального прироста биомассы и накопления представляющих интерес молекул.

Эта презентация сфокусирована на наиболее важных проблемах использования стрессоров и их комбинаций как индукторов продуктивности микроводорослей и на сопутствующие этому изменения в метаболизме клеток. В частности, будет рассмотрено влияние на метаболизм микроводорослей гормонов растительного и животного происхождения, как единичных стрессоров, так и в их комбинациях. Также будет проанализирована возможность использования микроводорослей и потенциал отдельных видов в качестве агентов биоремедиации сточных вод различной природы, содержащих химические вещества-разрушители эндокринной системы, ХВРЭС (Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs). В частности, будет проанализирована возможность использования сточных вод рыбохозяйственных хозяйств, богатых как микро- и макроэлементами, так и гормонами животного происхождения, как стимуляторов продуктивности микроводорослей.

Будут показаны результаты исследований авторов презентации, а также ключевые исследования в этой области наиболее известных научных групп мира. Отдельный акцент будет сделан на накопление нейтральных жиров и изменения в составе жирных кислот под воздействием отдельных гормонов и их комбинаций.

Лаборатория Управляемого Фотобиосинтеза, ИФР РАН: РНФ №19-14-00118

Изменения сигнальной системы ауксина при переходе к клубнеобразованию растений картофеля *Solanum tuberosum* L. *in vitro*

Колачевская О.О., Гетман И.А., Ломин С.Н., Дейграф С.В.,
Бургутин А.Б., Романов Г.А.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
gar@ippras.ru

Картофель является одной из ключевых пищевых культур, выращиваемых в мире, и потому проблема регуляции клубнеобразования до сих пор остаётся важной для исследователей. За более чем столетнюю историю изучения этого вопроса выяснилось, что в регуляции клубнеобразования принимают участие как негормональные факторы, так и практически все известные фитогормоны. В своей работе мы постарались сравнить экспрессию генов рецепторов ауксина *StTIR1/StAFB* (Transport Inhibitor Response 1/ Auxin signaling F-Box), ингибиторов сигналинга *StIAA* (Aux/IAA) и факторов транскрипции *StARF* (Auxin Response Factor) в растениях картофеля *in vitro* в состоянии наращивания зелёной массы (рост) или образования клубней (вегетативное размножение). Растения были выращены в водной культуре на среде MS, содержащей, соответственно, 1.5% или 5% сахарозы для вегетативного роста или стимуляции клубнеобразования, а затем выделяли РНК из разных органов и определяли экспрессию генов в них.

Из пяти обнаруженных у картофеля генов рецепторов ауксинов высоким уровнем экспрессии обладали три: *StTIR1a*, *StAFB4*, *StAFB6*. Наибольшую органоспецифичность проявил *StTIR1a*, экспрессия которого в листьях превышала таковую в стеблях и корнях в 1.5-2.5 раза и в растущих, и в образующих клубни растениях. Однако, в последних уровень экспрессии гена в клубнях был также высок и не уступал листьям. Ген *StAFB6* экспрессировался на сходном уровне во всех органах растений, а у гена *StAFB4* экспрессия превалировала в стеблях и корнях в условиях вегетации, но у образующих клубни растений экспрессия обоих генов в клубнях превышала таковую в корнях. Все эти результаты указывают на то, что ауксин может быть задействован в развитии клубней.

Из более чем 20 генов регуляторов ауксинового сигналинга мы остановились на двух, *StIAA2* и *StIAA3*, активность которых существенно выделялась из общего ряда. Активность обоих генов была наибольшей в листьях как растущих (на 1.5% сахарозе), так и образующих клубни (на 5% сахарозе) растений, немного более низким был уровень их экспрессии в стеблях. Это может быть обусловлено необходимостью тонко регулировать уровень сигналинга ауксина в этих органах. В растениях на 5% сахарозе довольно высокий уровень активности генов *StIAA2* и *StIAA3* наблюдался также в клубнях.

Среди выявленных у картофеля факторов транскрипции ауксин-зависимых генов мы выделили семь, активность которых была на уровне, позволяющем сравнивать их экспрессию в органах растений, находящихся в разном физиологическом статусе. Гены факторов транскрипции (предполагаемых негативных регуляторов транскрипции) *StARF2a*, *StARF4* и *StARF18* экспрессировались как в растущих, так и в развивающих клубни растениях. Однако, если у растущих растений экспрессия *StARF2a* была наибольшей в стеблях, в условиях клубнеобразования она преобладала в листьях. В аналогичном сравнении у растений на 5% сахарозе лидерство в экспрессии гена *StARF4* переходило от стеблей к клубням. У генов предполагаемых активаторов ауксин-зависимой транскрипции разница в экспрессии между растениями в разном состоянии была гораздо значительнее. В образующих клубни растениях наиболее активным из них был *StARF19a*, показавший наивысший уровень экспрессии в стеблях и незначительно уступавший в этом отношении генам-ингибиторам; следующим был *StARF8b*, максимально активный в клубнях, и замыкали группу гены *StARF5* и *StARF6*, наиболее активные в стеблях. В растущих растениях наиболее активным геном-активатором был *StARF6*, экспрессировавшийся преимущественно в стеблях, далее шли гены *StARF19a* и *StARF8b* также активные в стеблях, и *StARF5*, в основном активный в корнях. По-видимому, каждый из этих активаторов транскрипции имеет свои гены-мишени и проявляет органоспецифичность, в целом сохраняющуюся при изменении физиологического статуса. Таким образом, при образовании клубней происходит преобразование паттерна экспрессии всех компонентов передачи сигнала ауксина, но наиболее значимые изменения наблюдаются, по всей видимости, на уровне транскрипционных факторов ARF. И в дальнейшем наша цель – разобраться, как взаимосвязана активность всех генов комплекса передачи ауксинового сигнала в разных органах.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (РНФ) N 17-74-20181.

Изучение возможности применения керамического диффузора для аэрации питательных сред при глубинном культивировании растительных клеток

Петров Д.В., Пивоварова Н.С.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация
nadezhda.kuzmina@pharminnotech.com

В настоящее время существуют промышленные и лабораторные биореакторы как с механическим перемешиванием, так и без него, в т.ч. барботажные, эрлифтные с выраженным циркуляционным контуром. Среди недостатков использования таких устройств для глубинного (суспензионного) культивирования можно выделить следующие: относительно невысокие массообменные характеристики (коэффициент массопередачи по кислороду редко превышает $4 \text{ кг/м}^3\text{ч}$), и, следовательно, невозможность их рекомендовать для выращивания культур клеток с высокой плотностью или повышенными конечными концентрациями клеточной биомассы; высокая чувствительность клеток к механическому перемешиванию; неравномерная насыщенность культуральной жидкости воздухом, что приводит к гибели клеток и снижению выхода целевого продукта. Применение встроенных керамических диффузоров обусловлено следующими достоинствами: равномерное распределение подаваемого газа по среде; более эффективное перемешиванием за счёт мелкодисперсности распыления; высокая скорость накопления биомассы. В ходе предварительного трёхнедельного эксперимента удалось добиться повышения эффективности биосинтеза в суспензионной культуре женьшеня настоящего в 1,5 раза и при этом в экспоненциальной фазе роста наблюдалась высокая жизнеспособность клеток (до 80%). Предложено аппаратно-технологическое оформление рабочей модели реактора со встроенным(и) быстросъемным(и) керамическим(и) диффузором(ами). Разработку можно использовать во всех областях, где осуществляется суспензионное культивирование растительных культур, не только как новый способ аэрации, но и как способ, приводящий к увеличению количественных и качественных характеристик готового продукта или полупродукта.

Изучение особенностей андрогенеза озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта «Иркутская» в культуре изолированных пыльников

Любушкина И.В.^{*,}, Полякова М.С.^{*}, Поморцев А.В.^{*}, Войников В.К.^{*}**

^{*} Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН. Лермонтова ул., 132, Иркутск, Россия.

^{**} Иркутский государственный университет, биолого-почвенный факультет. Сухэ-Батора ул., 5, Иркутск, Россия.
ostrov1873@yandex.ru

Применение гаплоидных технологий широко используется сегодня в самых разных отраслях фундаментальных и прикладных биотехнологических исследований. Основным преимуществом данного направления является возможность достаточно быстрого получения чистых гомозиготных линий. На сегодняшний день применение гаплоидных технологий для получения новых сортов озимой пшеницы сопряжено с многочисленными трудностями, связанными, главным образом, с низкой продуктивностью андрогенеза *in vitro*. Наша работа посвящена изучению частоты андрогенеза мягкой озимой пшеницы сорта «Иркутская» в зависимости от минерального и гормонального состава питательных сред. Донорные растения пшеницы в осенне-зимний период выращивались до фазы трубкования в вегетационных сосудах в условиях фитотрона при температуре 22-26 °С. Фотопериод составлял 16 ч, полив производили еженедельно. Холодовую предобработку изолированных колосьев проводили при 4 °С в течение 7-21 суток. Инокуляцию пыльников осуществляли из средней части колоса на твердые питательные среды Potato и N₆. Среда Potato использовалась в 4 вариантах – оригинальный состав (конечная концентрация 2,4-Д 1,5 мг/л либо 0,2 мг/л), а также модифицированный вариант – минеральная основа Potato без добавления картофельного экстракта (конечная концентрация 2,4-Д 1,5 мг/л либо 0,2 мг/л). Среда N₆ применялась в модифицированном варианте: состав микроэлементов соответствовал среде Вlaydes. Конечная концентрация 2,4-Д в модифицированной N₆ составила 1 мг/л. Также применялся вариант среды N₆, где наряду с 2,4-Д присутствовала α-нафтилуксусная кислота (НУК, конечная концентрация 1 мг/л). В качестве источника углерода использовались сахароза (90 г/л) либо мальтоза (80 г/л). рН сред во всех случаях был 5,8-6,0. Культивирование пыльников проводили в темноте при 27 °С. Подсчет андроклинических структур (эмбриоидов и каллусов) осуществлялся через 30 суток культивирования.

Показано, что эмбриоиды не образовывались на средах, содержащих мальтозу. Частота образования каллусов в данных условиях также была весьма низкой и не превышала 0,5%. Снижение содержания 2,4-Д в среде культивирования приводило к повышению частоты ризогенеза, который в дальнейшем значительно затруднял регенерационный процесс. Так, максимальная частота ризогенеза (7,62%) наблюдалась на модифицированной среде Potato с содержанием 2,4-Д 0,2 мг/л. Максимальный выход эмбриоидов составил 1,15% на модифицированной среде N₆ с добавлением 1 мг/л НУК и 1,38% на оригинальной среде Potato с содержанием 2,4-Д 1,5 мг/л. Следует также отметить, что модифицированная среда N₆ оказалась наиболее подходящей для каллусогенеза – частота образования каллусов на среде без добавления НУК составила 10,56% и 4,78% – на среде с НУК. В дальнейшем при пересадке каллусов на среды для регенерации в них наблюдался процесс побегообразования.

Таким образом, можно заключить, что для активации андрогенеза в культурах изолированных пыльников мягкой озимой пшеницы сорта «Иркутская» наиболее перспективными являются среда на минеральной основе Potato с содержанием 2,4-Д 1,5 мг/л, либо модифицированная среда N₆ (1 мг/л 2,4-Д; 1 мг/л НУК).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №20-34-80003.

**Изучение роли генов *MtWOX9-1*, *MtWOX11-like*, *STF* и *MtNF-YB10*
в соматическом эмбриогенезе у люцерны**

Балтин С.М., Творогова В.Е., Лутова Л.А.

Санкт-Петербургский Государственный Университет, Университетская наб., 7/9, г. Санкт-Петербург, Россия.
krubaza@mail.ru

Соматический эмбриогенез (СЭ) у растений – это процесс, при котором незиготические клетки формируют эмбрионы, которые проходят через характерные стадии эмбрионального развития, в конечном счёте формируя новое растение. Многие виды растений потенциально способны к СЭ. Но у большинства видов для образования соматических эмбрионов требуются специфические условия *in vitro* (обработка гормонами и развитие эмбриогенного каллуса). Соматический эмбриогенез повсеместно используется для генетической трансформации растений и для получения искусственных семян. Необходимыми для улучшения методик получения соматических эмбрионов являются поиск и изучение регуляторов данного процесса. СЭ имеет множество сходств с зиготическим эмбриогенезом (ЗЭ) (в ходе развития соматического эмбриона обычно можно различить морфологические стадии, характерные для ЗЭ). Более того, большинство исследованных генов, работающих в ходе ЗЭ, функционируют и при СЭ.

К числу регуляторов ЗЭ можно отнести транскрипционные факторы (ТФ) из семейства WUSCHEL-LIKE НОМЕОВОХ (*WOX2*, *WOX8* и *WOX9* и другие) и из семейства NF-Y (в частности, белок *LEC1*). Для ряда генов из этих семейств в ходе наших исследований также была выявлена роль в ходе СЭ. Так, при сверхэкспрессии *MtWOX9-1* значительно увеличивается эмбриогенность каллуса и изменяется уровень транскрипции множества генов. Промотор гена *STF* (гомолог *WOX1* арабидопсиса) активен в соматических эмбрионах, кроме того, мы также выявили стимулирующий эффект его сверхэкспрессии на эмбриогенность. В ходе СЭ уровень экспрессии генов *MtWOX11-like* и *MtNF-YB10* (гомолог *LEC1 A. thaliana*) увеличивается.

Цель нашего исследования – дальнейшее изучение роли генов *MtWOX9-1* и *MtNF-YB10*, *MtWOX11-like* и *STF* в соматическом эмбриогенезе. Основные задачи исследования включают инактивацию генов *MtWOX9-1* и *MtNF-YB10* у *Medicago truncatula* с помощью системы CRISPR/Cas9. Нашей целью является отследить, что будет происходить с эмбрионами в процессе СЭ на фоне потери функции генов *MtWOX9-1* или *MtNF-YB10*, и будет ли он происходить вообще. Также мы планируем выяснить влияние сверхэкспрессии *MtWOX11-like* и *STF* на процесс СЭ.

Работа поддержана грантами РНФ 16-16-10011 и РФФИ 20-016-00124.

Изучение ростовых и биосинтетических характеристик каллусных и суспензионных культур клеток *Sutherlandia frutescens* (L.) R. Br. – лекарственного эндемика Южной Африки

Тимова М.В.* , Кочкин Д.В. , Кладова А.А.** , Носов А.В.* , Фоменков А.А.* ,
Попова Е.В.* , Галишев Б.А.** , Носов А.М.****

* Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва, 127276.

** Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234.

*** Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, 620002.
titomirez@mail.ru

Sutherlandia frutescens (L.) R. Br. представляет собой вечнозелёное растение, которое является эндемиком Южной Африки и относится к семейству бобовые (Fabaceae). *S. frutescens* имеет большое значение в африканской народной и официальной медицине, ее широко используют при терапии остеохондроза, сахарного диабета, ВИЧ, а также в качестве противоопухолевых средств при лечении рака внутренних органов различных типов. Кроме того, *S. frutescens* обладает значительным антиоксидантным потенциалом и является перспективным средством для купирования состояний, связанных с окислительным стрессом. В интактных растениях *S. frutescens* содержатся высокие концентрации свободных аминокислот, в частности L-канаванина. В листьях показано наличие пинитола, а также некоторых флавоноидов. Химическое строение основных тритерпеновых гликозидов *S. frutescens* было установлено относительно недавно, до настоящего времени структурно описаны только четыре – производные циклоартана сутерландиозиды А–D (sutherlandiosides А–D).

Длительная история традиционного использования сутерландии без существенных побочных эффектов свидетельствует, что *S. frutescens* не токсична для организма человека, что подтверждается Министерством здравоохранения Южной Африки. Данный вид является перспективным объектом для введения в культуру *in vitro* и разработки биотехнологий получения клеточной биомассы для нужд медицинской, пищевой, косметической промышленности. В связи с этим, в нашем исследовании была поставлена задача получить каллусные и суспензионные культуры клеток *S. frutescens*, а также изучить их ростовые характеристики и провести первичный скрининг качественного состава вторичных метаболитов.

Каллусные культуры клеток получали из стерильных проростков семян, для этого гипокотиль и семядоли разрезали на экспланты и помещали на агаризованную питательную среду с минеральной основой по Шенку-Хильдебрандту (SH) с добавлением 3% сахарозы, витаминов, а также 1 мг/л 2,4-Д и 0.1 мг/л кинетина. По результатам экспериментов были отобраны 2 стабильно растущие каллусные линии (1 в темноте и 1 на свету) с циклом культивирования 30–35 сут. Максимальный прирост биомассы для обеих линий варьировал в пределах 400–600%, что, по данным литературы, является средним показателем для культур клеток бобовых.

Суспензионные культуры клеток получали путём помещения каллусных культур в жидкую питательную среду того же состава. Культивирование проводили на орбитальной качалке в темноте, при влажности 70–75% и 26–27°C. Динамику роста и основные ростовые показатели определяли для 11 и 27 циклов субкультивирования. Для исследуемых линий была характерна короткая лаг-фаза (около 3 сут.), начало фазы стационара наблюдали не раньше 18 сут., фазу деградации за время проведения экспериментов зафиксировать не удалось. Жизнеспособность клеток не опускалась ниже 80%, максимальное накопление сухой биомассы составляло в среднем 16–20 г/л среды для обеих линий. Индекс роста по сухой массе составлял 15.0–31.5 для культуры клеток гипокотыля и 18.9–22.9 для культуры клеток семядолей. При сопоставлении с данными литературы было выявлено, что эти результаты превышают показатели, полученные для суспензионных культур клеток других видов бобовых (которые варьируют в среднем в пределах 4–15). Кроме того, в результате анализа доступной литературы не удалось найти данных о полученных ранее суспензионных культурах клеток этого вида.

Для первичного скрининга состава вторичных метаболитов в растительных экстрактах интактных растений и культур клеток использовали метод ультраэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием при ионизации электрораспылением. Было установлено, что качественный состав вторичных метаболитов в полученных каллусных и суспензионных культурах клеток *S. frutescens* отличается от спектра соединений, представленных в листьях интактного растения. Показано, что профили вторичных метаболитов в полученных культурах клеток сходны между собой, при этом основными соединениями являются изофлавоны (в форме глюкозидов и их эфиров с малоновой кислотой).

Работы по получению культур клеток и анализу ростовых характеристик выполнены при поддержке Мегагранта Министерства науки и высшего образования РФ, договор № 075-15-2019-1882, на базе «Научно-производственного биотехнологического комплекса для проведения работ по изучению, сохранению и практическому применению культивируемых клеток и органов высших растений и микроводорослей» с использованием оборудования Уникальных научных установок «Опытный биотехнологический комплекс» и «Всероссийская коллекция культур клеток высших растений» ИФР РАН (УНУ ОБК ИФР РАН и УНУ ВРККК ВР ИФР РАН).

Индукция соматического эмбриогенеза ели сибирской в культуре *in vitro*

Пахомова А.П., Шевелева И.С., Пак М.Э.

Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение
ФИЦ КНЦ СО РАН, 660036, ул. Академгородок 50/28, Красноярск, Россия.
culture@ksc.krasn.ru

При инокуляции на питательные среды АИ и DCR зиготических зародышей ели сибирской *Picea obovata* формировался плотный, значительно реже (5%) рыхлый каллус белого цвета. Плотный каллус состоял из изодиаметрических клеток. В рыхлом каллусе проявлялись морфогенетические реакции в виде удлинённых клеток и мелких глобул соматических зародышей. Через 6 мес. культивирования на пролиферационной среде АИ и DCR с уменьшенной концентрацией 6-БАП (0,5 мг/л) сохранность каллусов наблюдалась у 15–32%. Рост каллусной массы за этот период составил 0,4–2,7 г у разных клеточных линий. Каллусные культуры росли более активно на среде DCR. Получено три пролиферирующих эмбриогенных клеточных линий. Возраст эмбриогенных культур от 10 мес. до трех лет. В клеточных линиях шла активная мультипликация соматических зародышей через кливаж и образование адвентивных почек на суспензоре. Таким образом, зиготические зародыши ели сибирской могут образовывать пролиферирующие эмбриогенные культуры.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда науки в рамках научного проекта № 19-44-240009.

Исключение кинетина из состава среды выращивания приводит к изменениям в профиле содержания тритерпеновых гликозидов в суспензионной культуре клеток женьшеня *Panax japonicus* var. *Repens*

Глаголева Е.С., Константинова С.В., Кочкин Д.В.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119234, Ленинские горы, д. 1/12, Москва, Россия.
glagoleva@mail.bio.msu.ru

Культуры клеток высших растений представляют значительный интерес для исследования процессов образования и накопления вторичных метаболитов. Объектом нашего исследования была культура клеток женьшеня *Panax japonicus* var. *repens*, которая является продуцентом характерных для интактных растений данного рода тритерпеновых гликозидов — гинзенозидов. Методом ВЭЖХ-МС был проведен количественный анализ более 32 различных гинзенозидов в биомассе суспензионной культуры, выращенной при исключении кинетина из стандартного состава среды культивирования. Несмотря на то, что добавление экзогенных цитокининов часто является необходимым условием для поддержания роста культур клеток растений, для исследуемого штамма, на среде без кинетина были отмечены более высокие значения показателей роста, чем на стандартной среде с кинетином. Суммарное содержание гинзенозидов в среднем составляло около 80 мг/г сухой массы и при исключении из состава среды кинетина значимо не изменилось. Основной вклад в общее содержание гинзенозидов (более 80% от суммы гликозидов) вносили «кислые» (со свободной карбоксильной группой) гинзенозиды — малонильные производные гинзенозидов группы протопанаксадиола (Rb₁, Rb₂/Rb₃, Rc, Rd) и глюкурониды олеаноловой кислоты (гинзенозид R0, псевдогинзенозид RT1, чикусетсусапонин IVa), а также «нейтральные» гинзенозиды Rg1 и Rb1. Выращивание на среде без кинетина привело к значительному увеличению количества чикусетсусапонина IVa. Его среднее содержание на 21 сутки цикла роста культуры на среде без кинетина составило 34±8 мг/г сух.массы (44% от суммы всех гинзенозидов), в то время как в контроле — 3,9±1,7 мг/г сухой биомассы (5% от суммы). Кроме того, наблюдалось увеличение содержания некоторых гинзенозидов группы протопанаксатриола (гинзенозид Rf и нотогинзенозид R2), в то время, как содержание Rg1 и Re не изменилось. Содержание в биомассе гинзенозидов группы протопанаксадиола (как «нейтральных» форм, так и малонилированных производных), напротив, значительно снизилось (с 40% до 13% от общего содержания гинзенозидов). Настоящая работа показывает, что полное исключение экзогенных цитокининов из среды культивирования суспензионной культуры клеток *Panax japonicus* var. *repens* не приводит к снижению ростовых и биосинтетических параметров культуры, однако влияет на количественное соотношение между индивидуальными тритерпеновыми гликозидами.

Исследование ростовых и биосинтетических показателей суспензионной культуры клеток *Mandragora turcomanica* – эндемика Туркменистана и Ирана

Еремеева Е.А. **, Титова М.В. *, Кочкин Д.В. **, Котенкова Е.А. *, Носов А.М. **, ****

* Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, 127276.

** Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234.

*** Всероссийский научно-исследовательский институт мясной

промышленности имени В.М. Горбатова, Москва, 109316.

titomirez@mail.ru

Мандрагора – растение, в течение многих веков использовавшееся как лекарственное в Европе и на Ближнем Востоке. Растения рода *Mandragora* являются эффективными продуцентами алкалоидов. Ещё в XIX веке из растений рода *Mandragora* были выделены различные алкалоиды тропанового ряда, в частности - гиосцин и гиосциамин. Они способны связываться с ацетилхолиновыми рецепторами, что обуславливает производимый ими обезболивающий и успокоительный эффект.

Мандрагора распространена в некоторых областях Средиземноморья, Передней и Средней Азии, в Гималаях. Вид *Mandragora turcomanica* или мандрагора туркменская, описанный в 1942 году, является эндемичным для Туркменистана и Ирана. Уже в 1999 году в естественных условиях было выявлено не более 500 растений этого вида. Трудоемкость и сложность культивирования в искусственных условиях обуславливают целесообразность получения и изучения культур клеток из растений *M. turcomanica*, находящегося под угрозой исчезновения.

В лаборатории биологии культивируемых клеток ИФР РАН была получена суспензионная культура клеток *M. turcomanica*, для которой был проведен комплексный анализ ростовых и физиологических характеристик, изучен спектр синтезируемых вторичных метаболитов и исследована биологическая активность экстрактов из клеточной биомассы в сравнении с аналогичными показателями корня интактного растения.

Полученную культуру клеток выращивали на среде с минеральной основой по Мурасиге-Скугу с добавлением 30 г сахарозы, 1 мг α -нафтилуксусной кислоты, 1 мг 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и 0,05 мг 6-бензиламинопурина на литр среды. В процессе работы изучали динамику роста и ростовые характеристики при различной начальной плотности культуры и концентрации сахарозы в среде. Качественный анализ целевых вторичных метаболитов в клеточной биомассе и корне интактного растения проводили с помощью УЭЖХ-ИЭР-МС. Для определения антимикробной активности по отношению к *Staphylococcus aureus* использовали метод проточной цитометрии.

В результате проведенных работ было установлено, что для суспензионной культуры клеток *M. turcomanica* увеличение начальной плотности посадки с 0.30 до 1.00 г/л по сухой массе клеток приводит к повышению значений таких ростовых параметров, как уровень максимального накопления биомассы (4.0 г/л и 16.1 г/л соответственно), жизнеспособность клеток (66% и 85% соответственно), экономический коэффициент (0.1 и 0.5 соответственно). С целью оценки возможности повышения продуктивности для этой линии проводили культивирование на среде с 5% сахарозы при одинаковой начальной плотности культуры (1.00 г/л), при этом максимальный уровень накопления клеточной биомассы, продуктивность по клеточной биомассе, индекс роста возрастали почти в 2 раза и составляли 33 г/л по сухой массе клеток, 1.9 г/л за сутки, 27.8 соответственно, удельная скорость роста возрастала почти в 1.5 раза (до 0.31 сут.⁻¹).

Качественный фитохимический анализ выявил существенные различия в спектре синтезируемых соединений между исследуемой культурой клеток и корнем интактного растения. В частности, в экстрактах из клеточной биомассы отсутствовал алкалоид гиосциамин, характерный для корня, однако присутствовал ряд фенилпропаноидов.

Показано, что экстракты из корня интактного растения и клеточной биомассы исследуемой культуры клеток *M. turcomanica* отличаются по антимикробной активности. Экстракты корня обладали выраженным дозо-зависимым ингибирующим эффектом в отношении *S. aureus*, в то время как для экстрактов из клеточной биомассы подавление роста *S. aureus* не наблюдали.

Все работы были проведены на базе «Научно-производственного биотехнологического комплекса для проведения работ по изучению, сохранению и практическому применению культивируемых клеток и органов высших растений и микроводорослей» (Мегагрант Правительства РФ, договор № 075-15-2019-1882) с использованием оборудования Уникальных научных установок «Опытный биотехнологический комплекс» и «Всероссийская коллекция культур клеток высших растений» ИФР РАН (УНУ ОБК ИФР РАН и УНУ ВРККК ВР ИФР РАН).

Клональное микроразмножение и оценка адаптивной способности представителей рода *Amelanchier* Medik.

Раева-Богословская Е.Н.

ФГБУН Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, Ботаническая ул., 4, Москва, Россия.
katyaraeva@rambler.ru

Интродукция хозяйственно-ценных видов растений и разработка эффективных способов их размножения являются одними из основных задач ботанических садов.

Род Ирга (*Amelanchier* Medik.) относится к семейству Rosaceae Juss. и включает от 26 до 28 видов, распространенных в умеренной зоне Северного полушария, в основном, в Северной Америке. Жизненной формой растения является кустарник или небольшое дерево. Представители данного рода имеют ценность для пищевой промышленности и зеленого строительства. Плоды ирги являются источником биологически активных веществ и характеризуются антиоксидантными свойствами. Одним из наиболее продуктивных вегетативных способов размножения является метод клонального микроразмножения. Основными преимуществами данного метода является высокая скорость создания генетически однородного посадочного материала.

В коллекции растений *in vitro* лаборатории биотехнологий растений ФГБУН ГБС им. Н. В. Цицина РАН размножаются и сохраняются сорта, относящиеся к различным видам рода *Amelanchier* Medik.: Красноярская, Mandan (*A. alnifolia* (Nutt.) Nutt. Ex M. Roem.); × *Amelasorbus* Rehder; Prince William (*A. canadensis* (L.) Medik.); Ballerina (*A. × grandiflora* Rehder).

Были оптимизированы условия на всех этапах клонального микроразмножения, проведен сравнительный анализ регенерационной способности сортов ирги. Установлено существенное влияние минерального и гормонального составов питательных сред на морфогенетический потенциал представителей рода *Amelanchier* Medik.

Культивирование на питательной среде Murashige-Skoog оказалось более эффективным на 48% (коэффициент размножения у сорта Красноярская 5,0 у Mandan 4,7), в сравнении с Woody Plant Medium и Quorin and Lepoivre.

Выявлен оптимальный регулятор роста для культивирования в условиях *in vitro* эксплантов ирги. Коэффициент размножения для исследуемых сортов на питательной среде, содержащей 6-бензиламинопуридин (6-БАП) в концентрации 1,0 мг/л составил 4,3. 2-изопентил-аденин (2-ИП) в концентрации 1,0 мг/л оказал незначительное влияние на пролиферацию представителей рода *Amelanchier* Medik. (1,2). Отмечено различие в действии данных регуляторов роста: 6-БАП стимулировал образование адвентивных микропобегов, а 2-ИП рост микропобегов из пазушных почек. Наибольшим морфогенетическим потенциалом характеризовался сорт Красноярская, относящийся к виду *A. alnifolia* (5,0).

На этапе укоренения был подобран источник ауксина. Для индукции ризогенеза у сортов *A. alnifolia* оптимальным регулятором роста является индолилмасляная кислота в концентрации 1,0 мг/л, процент укореняемости составил 74%.

На этапе адаптации было установлено существенное влияние генотипа растения на устойчивость к стрессовым факторам. Наибольший процент адаптированных растений был получен у сорта Prince William и составил 73%.

Отдельное исследование было посвящено изучению анатомо-морфологических особенностей листовых пластинок адаптированных растений и находящихся в культуре *in vitro* регенерантов. Установлено, что форма устьиц в культуре *in vitro* у всех изучаемых представителей рода *Amelanchier* Medik. округлая, а у адаптированных растений – эллиптическая. Выявлены статистически значимые различия между площадью устьичного аппарата у культивируемых эксплантов и растений, прошедших изменения под действием абиотического стресса. Отмечено снижение относительной площади транспирации у *A. canadensis* почти в 2 раза, при этом у представителей *A. alnifolia* данный показатель практически не изменился.

Работа выполнена в рамках ГЗ ГБС РАН (№18-118021490111-5).

Клональное микроразмножение марсиллии волосистой (*Marsilea hirsuta* L.) *in vitro*

Горисева О.А., Чердниченко М.Ю.

Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева,
ул. Тимирязевская, 49, Москва, Россия.
aquaticplant109@gmail.com

Водные растения не только играют большую биологическую роль, но и служат основным декоративным элементом пресноводного аквариума. Имеющиеся в литературе по аквариумистике немногочисленные данные весьма приблизительны и не дают точного представления об экологии тропических водных и болотных растений. При исследовании тропических болотных и водных растений очевидно, что их экология многослойна и взаимосвязи очень сложны. До последнего времени в аквариумах культивировали только малую часть существующих болотных и водных растений из-за недостатка сведений об их жизнедеятельности. Желание расширить знания об образе жизни и потребностях видов, чтобы избежать ошибок культивирования, движет исследователями, занимающимися этими объектами.

Марсиллия волосистая (*Marsilea hirsuta* L.) – небольшое растение с тонким стелющимся стеблем-корневищем. Листья очередные, простые, на длинных черешках, отходят вверх от корневища. Листовые пластинки от неразделенных до 4-лопастных. Симметрично направленным вверх листьям вниз от корневища идут пучки корней.

Объектом исследования служили растения марсиллии компании «Тгоріса». Для стерилизации использовали 2 основных стерилизующих агента – 0,1 %-ный раствор хлорида ртути (II) и 5 %-ный раствор гипохлорита натрия – и различные варианты экспозиции: 1...5 мин. в растворе хлорида ртути (II), 30 (20) с в 70 %-ном растворе этилового спирта + 7 (5) мин. в растворе гипохлорита натрия. После стерилизации растения помещали на питательные среды различного минерального состава: среда Мурасиге и Скуга (МС) с полной и половинной концентрацией базовых компонентов, среда Гамборга (В5) с полной и половинной концентрацией базовых компонентов, а также среда Кнопа.

Для изучения влияния размера черенка на интенсивность ростовых процессов *M. hirsuta* растения делили на черенки с различным количеством узлов (1, 2, 3 и 4) и помещали на среду с полным и половинным содержанием базовых компонентов МС. Каждые 3...4 сут. замеряли длину стебля.

Наибольший выход асептических растений наблюдали на питательной среде ½ МС после стерилизации в течение 3 мин. в растворе хлорида ртути (II). Наибольшая контаминация была отмечена на питательной среде Кнопа с режимом стерилизации 30 с в растворе этилового спирта + 7 мин. в растворе гипохлорита натрия. 60 % гибели и 40 % контаминации наблюдали в вариантах с питательной средой Кнопа с режимом стерилизации 3 и 5 минут в растворе хлорида ртути (II). По эффективности стерилизации в зависимости от состава питательной среды наблюдались следующие отличия: наибольшее количество живых растений отмечали на среде ½ МС (20 %), а наименьшее – на средах В5 и Кнопа (5 %), по остальным средам были отмечены промежуточные значения. При этом наибольшая контаминация была отмечена на среде Кнопа (более 50 %), а наименьшая – на среде МС и В5 (менее 10 %). Наибольший процент гибели растений наблюдался в варианте с питательной средой В5.

При изучении влияния размера черенка на скорость роста растений при клональном микроразмножении было показано, что на среде МС скорость прироста у 4-узловых черенков, а на среде ½ МС у 3- и 4-узловых черенков достоверно превышала показатели в других опытных вариантах. При этом различий во влиянии двух вариантов питательных сред не наблюдали.

Таким образом, для получения асептических растений марсиллии волосистой можно рекомендовать 3-минутную экспозицию в 0,1 %-ном растворе хлорида ртути (II). Для клонального микроразмножения эффективнее использовать более крупные черенки (с 4 узлами), чем более короткие.

Коинокуляция микрорастений картофеля в условиях *in vitro* ассоциативными рост-стимулирующими бактериями разных таксономических групп

*Ткаченко О.В.**, *Бурыгин Г.Л.****, *Григорян М.А.**, *Евсеева Н.В.***, *Старчиков А.А.**

* Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Театральная пл., 1, Саратов, Россия.

** Институт биохимии и физиологии растений РАН. Энтузиастов пр., 13, Саратов, Россия.

oktkachenko@yandex.ru

Переход к высокопродуктивному и экологически чистому сельскому хозяйству требует широкого внедрения препаратов на основе ассоциативных микроорганизмов, в том числе стимулирующих рост растений ризобактерий (PGPR). Особенно перспективной может быть бактериализация для стерильно размноженных растений в культуре *in vitro*. Ранее нашими исследованиями было показано, что азоспириллы активизируют развитие корневой системы микрорастений картофеля *in vitro*, стимулируют адаптацию полученных регенерантов к условиям *ex vitro*, а также способствуют увеличению урожая мини клубней. Кроме того, были выделены PGPR других таксономических групп, положительно влияющие на рост микрорастений картофеля в культуре *in vitro*. Целью данного исследования являлось выявление и оценка эффективных комбинаций бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245 с ризосферными бактериями других таксономических групп.

Коллекционные штаммы *Azospirillum brasilense* Sp245, *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2, *Enterobacter ludwigii* K7 и *Kocuria rosea* T1Ks19 были использованы для инокуляции микрочеренков картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Невский, культивируемых в условиях *in vitro* на безгормональной питательной среде Мурасиге-Скуга. В соответствии с установленными ранее особенностями бактериальных штаммов растения при черенковании инокулировали штаммами *A. brasilense* Sp245 и *Kocuria rosea* T1Ks19 или *A. brasilense* Sp245, а затем на 14 сутки после черенкования штаммом *O. cytisi* IPA7.2 или *Enterobacter ludwigii* K7. Кроме того, для варианта *A. brasilense* Sp245 + *O. cytisi* IPA7.2 были заложены дополнительно варианты с каждым штаммом по отдельности. Контролем служили стерильно выращиваемые растения. Анализ проводили на 30 сутки культивирования.

Результаты морфометрического анализа растений, инокулированных бактериями *A. brasilense* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 в культуре *in vitro*, показывают достоверное стимулирование роста микрорастений ризосферными штаммами по отдельности и совместно по сравнению с контролем. По показателю длина побега установлено стимулирующее действие по сравнению с контролем штамма *A. brasilense* Sp245 на 10,8%, штамма *O. cytisi* IPA7.2 на 16,5%, а двух штаммов одновременно на 33,8, что существенно превышает действие каждого штамма по отдельности. По количеству узлов инокулированные растения превышали контрольные в примерно равной степени во всех вариантах инокуляции на 8,7-14,0%. Количество корней на растениях увеличивалось в вариантах с инокуляцией штаммом *O. cytisi* IPA7.2 на 21,6% и совместно штаммами *A. brasilense* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 на 24,1%. Все инокулированные растения имели большую массу растений по сравнению с контролем на 49,1% (*A. brasilense* Sp245), 43,6% (*O. cytisi* IPA7.2) и 29,1% (*A. brasilense* Sp245 + *O. cytisi* IPA7.2).

Максимальный положительный эффект от коинокуляции микрорастений картофеля бактериями *A. brasilense* Sp245 в сочетании с *O. cytisi* IPA7.2, *E. ludwigii* K7 и *K. rosea* T1Ks19 в культуре *in vitro* наблюдали в последнем варианте. У бактериализованных растений по сравнению с контрольными длина корней увеличивалась на 21,2%, а масса корней сырая в 1,9 раза, сухая – на 33,3%. При этом длина побега оставалась на уровне контроля, а количество узлов на побегах даже снижалось на 17,5%, хотя масса побега сырая была больше, чем в контроле в 1,6 раза. В вариантах коинокуляции *A. brasilense* Sp245 + *O. cytisi* IPA7.2 и *A. brasilense* Sp245 + *E. ludwigii* K7 наблюдалось достоверное стимулирование растяжения побега соответственно на 27,2 и 34,4% при одновременном уменьшении числа узлов на побегах соответственно на 36,4 и 40,9%.

Таким образом, эффект коинокуляции микрорастений картофеля сорта Невский в культуре *in vitro* одновременно двумя штаммами *A. brasilense* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 в целом соответствовал действию каждого штамма ризосферных бактерий по отдельности. Не установлено антагонистического действия штаммов. Синергический эффект коинокуляции наблюдался только по показателю длины побега в культуре *in vitro*. Наиболее эффективным штаммом-компаньоном для *A. brasilense* Sp245 из трех изученных бактерий оказался штамм *K. rosea* T1Ks19.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 19-016-00116.

Концентрации экзогенного этилена для адекватного ответа растений и культивируемых *in vitro* клеток

Фоменков А.А., Носов А.В., Новикова Г.В., Ракитин В.Ю.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
artem.fomenkov@gmail.com, alexv.nosov@mail.ru, gv.novikova@mail.ru, rakit@ippras.ru

Фитогормоны проявляют свой эффект в исключительно малых концентрациях, и как правило, эти концентрации должны соответствовать аффинности соответствующих рецепторов, то есть находиться в области константы диссоциации (Kd) для комплексов фитогормон-рецептор в данных условиях. Единицы измерения являются молярными, и Kd представляет собой концентрацию фитогормона, при которой сайты связывания с рецептором заняты наполовину.

Безусловно, такое положение справедливо в идеальном случае. Однако экзогенно применяемым фитогормонам или их синтетическим аналогам необходимо вначале добраться до места расположения рецепторов и это вторжение не будет заметным для рецепторов и, следовательно, не окажет эффекта на клетку, в условиях избытка эндогенных фитогормонов. В случае очень высоких концентраций фитогормонов может наблюдаться токсический эффект и гибель клеток. В связи с этим, все классические работы по характеристике эффектов фитогормонов исследовали на биологических тест-системах с низким содержанием эндогенных фитогормонов.

Так на целом растении листья снабжаются цитокининами из корней и поэтому в обычных условиях не реагируют на экзогенный цитокинин. Хорошей системой для исследования физиологических и биохимических эффектов цитокининов служат изолированные семядоли тыквы или люпина после инкубации на воде, этиолированные проростки амаранта, этиолированные проростки *Arabidopsis*. Разные тест-системы с тканями целых растений линейно реагируют на экзогенные цитокинины в диапазоне от 10 нМ до 5000 нМ (если не учитывать экспрессионные системы *in vitro*, которые отвечают на 1 нМ). При этом есть данные, что цитокинины в концентрации больше 10000 нМ вызывают запрограммированную гибель клеток (PCD) хлопчатника, моркови и *Arabidopsis* в культуре *in vitro*. Kd для рецепторов цитокинина (по *транс*-зеатину) находится в пределах 1–8 нМ.

Индолил-3-уксусная кислота (ИУК) в экспериментах Вента по определению изгиба декапитированного колеоптиля овса работала в концентрации от 150 нМ до 1500 нМ, стимулировала рост отрезков стеблей этиолированных проростков гороха (20 нМ – 1000 нМ) и колеоптилей ячменя (500 нМ – 5000 нМ). Ауксины, в особенности синтетические, начинают оказывать негативный эффект в концентрациях выше 10000 нМ. Kd для многокомпонентных ИУК-рецепторных комплексов, измеренная разными методами, находится в пределах 15–75 нМ.

Давно известно, что присутствие очень низких концентраций этилена в атмосфере влияет на рост и развитие растений. Концентрации этилена в газовой фазе обычно выражаются в ppm – частях на миллион или в мкл/л и многие эффекты этилена наблюдаются уже в своём полу-максимуме при 0.1 ppm. Поскольку этилен быстро уравнивается с водной фазой клетки, то с учётом коэффициента распределения это соответствует его концентрации в этой фазе равной ~ 0.45 нМ при 20°C. Kd для рецепторов этилена, определённая с помощью изотопно-меченного этилена, составляет 0.06–0.08 нМ. Некоторые тест-системы очень чувствительны к этилену, например, этиолированные проростки гороха реагируют на этилен в концентрации от 0.03 нМ. Таким образом, чувствительность растений к этилену на порядки выше, чем к цитокининам и ауксином.

Хорошо известно, что этилен активно продуцируется культивируемыми клетками растений *in vitro* и накапливается в больших количествах в газовой фазе культуральных сосудов. Нами показана прямая положительная корреляция между продукцией этилена и интенсивностью пролиферации клеток в культуре. При этом в газовой фазе суспензионной культуры клеток гетеротрофного штамма (NFC-0) *Arabidopsis thaliana* концентрация этилена может достигать 3–5 ppm, что соответствует 13–23 нМ в клетках. Учитывая Kd для рецепторов этилена, можно предположить, что экзогенный этилен в небольших концентрациях действовать не будет, к тому же известно, что при высоких концентрациях этилена индуцируется оборот рецепторов, приводящий к снижению представленности комплексов этилен-рецептор/CTR1, что снижает восприятие и проведение сигнала этилена. Относительно токсичности высоких концентраций этилена из данных литературы известно, что этот газ в невероятно высокой концентрации – 2250000 нМ снижает прирост суспензии клеток *Ruta* на 30%, клеток розы на 20% и пшеницы на 5%. Наши эксперименты с суспензией клеток NFC-0 показали отсутствие падения их жизнеспособности после культивирования в течение 72 ч в атмосфере со 10000 ppm этилена (45200 нМ в клетках). Тем не менее, в литературе обсуждается тот факт, что этилен может вызывать PCD в определённой фазе клеточного цикла в синхронизированной суспензии клеток табака BY-2 при концентрации 80000 нМ (погибает около 20% клеток после 3.5-часовой обработки этиленом).

В нашей работе мы ищем адекватные экспериментальные подходы для доказательства эффектов этилена на пролиферативную активность культивируемых клеток, в частности применяя ингибитор взаимодействия этилена с рецепторами – 1-метилциклопропен и культивируемые клетки *A. thaliana*, генетически различающиеся по функциональной активности компонентов этиленового сигнального пути.

Культивирование *in vitro* глоссостигмы повойничковой (*Glossostigma elatinoides* (Benth.) Hook.f.)

Голиванов Я.Ю., Чередниченко М.Ю.

Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева,
ул. Тимирязевская, 49, Москва, Россия.
cherednichenko@rgau-msha.ru

Одним из способов биологической очистки вод является использование высших растений, так как они поглощают биогенные элементы и некоторые органические вещества, способны накапливать токсичные вещества и превращать их в нетоксичные, накапливать некоторые металлы и органические вещества, которые трудно разлагаются, а также они способствуют оседанию взвешенных веществ.

Водные растения представляют большой интерес и с точки зрения акваскейпинга – очень модного, быстроразвивающегося и популярного направления аквариумистики. В условиях акваскейпинга воссоздаются совершенно разные биотопы и экологические зоны, что позволяет в искусственных условиях изучать различные научные объекты. **Аквариумные растения выполняют при этом не только декоративную роль.** Они устанавливают биологическое равновесие водной среды, обогащают воду кислородом, играют большую роль в обмене веществ, необходимых для жизнедеятельности рыб и самих растений, что имеет большое значение в сохранении и разведении в аквариумных условиях редких и исчезающих видов.

Глоссостигма повойничковая (*Glossostigma elatinoides* (Benth.) Hook.f.) произрастает в болотах и пойменных районах Австралии, Новой Зеландии и Тасмании. Сведения о распределении, экологии или инвазивном потенциале *Glossostigma* в местах ее обитания крайне малочисленны. В аквариумной культуре используется примерно с 80-х годов XX века.

В качестве растительного материала в экспериментах использовали меристемные растения *G. elatinoides* серии 1-2-Grow от компании «Торіса». В качестве первичного экспланта были выбраны не крупные кустики растения с хорошо развитой корневой системой.

Для получения асептических растений проводили стерилизацию эксплантов в 5 %-ном растворе гипохлорита натрия с экспозицией 5...20 минут. После стерилизации экспланты дважды отмывали в дистиллированной воде и помещали в культуральные сосуды с безгормональной питательной средой Мурасиге и Скуга (МС). При стерилизации раствором гипохлорита натрия большая часть растений погибла из-за контаминации. Исходя из этого, в дальнейшем эксперименте использовали раствор хлорида ртути (II) с экспозицией 1...10 мин. Стерилизация в течение 2 и 3 мин. позволила получить 100 %-ный выход асептических растений без контаминации. Меньший, но также высокий выход (80...90 %) отмечали при обработке в течение 1 и 4 минут. Более длительные экспозиции приводили к значительной гибели асептических растений. Было замечено, что рост после обработки 0,1 %-ным раствором хлорида ртути начинался спустя 2 недели.

Для клонального микроразмножения стерильные экспланты помещали на питательные среды с содержанием базовых компонентов МС и добавлением фитогормонов и регуляторов роста в разных концентрациях и комбинациях: только с добавлением ауксинов (индолил-3-уксусная кислота или α -нафтилуксусная кислота в концентрации 0,1...0,5 мг/л), только с добавлением цитокининов (6-бензиламинопурина в концентрации 1...6 мг/л или кинетин 1...3 мг/л), а также комбинации указанных фитогормонов и регуляторов роста. Интенсивность роста оценивали по приросту количества узлов. На всех вариантах питательных сред, содержащих только ауксиновый компонент, рост не отличался от контроля (безгормональная питательная среда) и составлял в среднем ок. 10 новых узлов/растение. Использование только цитокининового компонента позволило увеличить данный показатель до 14...15 узлов/растение. До 20 узлов/растение удалось получить на следующих вариантах питательных сред: МС + 1 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИУК, МС + 1 мг/л кинетин + 0,1 мг/л НУК. Более 20 узлов/растение образовывалось на средах МС + 3 мг/л БАП + 0,3 мг/л ИУК и МС + 3 мг/л кинетин + 0,3 мг/л НУК.

Таким образом, для стерилизации растений глоссостигмы повойничковой можно рекомендовать обработку 0,1 %-ным раствором хлорида ртути (II) в течение 2...3 минут, а для клонального микроразмножения использовать комбинацию БАП+ИУК или кинетин+НУК в концентрациях 3 мг/л и 0,3 мг/л соответственно.

Культура изолированных запасующих тканей – удобная модель для изучения синтеза и накопления запасных белков в семенах растений

Азаркович М.И.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
m-azarkovich@mail.ru

Раиса Георгиевна Бутенко всегда поддерживала комплексные исследования своей лаборатории с другими лабораториями ИФР. В совместной работе лаборатории запасных отложений и лаборатории культуры тканей и морфогенеза растений ИФР им. К.А. Тимирязева АН СССР (Соболев, Бутенко, Суворов, 1971) был разработан способ культивирования незрелой запасующей ткани семян клещевины (*Ricinus communis* L.) – эндосперма. При этом в зависимости от состава питательной среды клетки эндосперма или начинали делиться, давая каллус, или переходили к накоплению запасного белка и фитина, то есть, к созреванию. Эта модельная система получила дальнейшее развитие в работах лаборатории запасных отложений.

Эндосперм семени – специализированная запасующая ткань, где наиболее полно реализуется функция накопления запасных продуктов. Изучение синтеза и накопления запасных белков на тканевом уровне – весьма заманчивый подход, особенно при отслеживании различного рода воздействий на динамику указанных процессов: с одной стороны, при этом можно избежать опосредующего влияния органов и тканей, окружающих семена, а с другой – проводить исследования в условиях, достаточно приближенных к естественному созреванию.

Питательная среда для созревания изолированного эндосперма моделировала материнское растение – к среде Мурасиге и Скуга с увеличенной дозой фосфора добавляли сахарозу, осмотик полиэтиленгликоль, миоинозит (предшественник фитина), органические источники азота (гидролизат казеина или отдельные аминокислоты и амиды).

Было показано, что эндосперм клещевины, изолированный до начала накопления запасных белков и запасного фосфорного соединения фитина, способен самостоятельно, без участия зародыша, переходить к их синтезу и отложению в форме алейроновых зерен (белковых тел). При этом снижение влажности эндосперма (которая является важным физиологическим показателем степени зрелости семян), изменение белковых спектров, формирование алейроновых зерен протекало при созревании на искусственной питательной среде и на растении весьма сходно. Показано, что эндосперм способен использовать для синтеза запасных белков азот как из органических, так и из минеральных источников. При полном исключении азота из среды накопления запасных белков практически не происходило. Однако, как показали цитологические исследования, алейроновые зерна в этом варианте все же образовывались, хотя и в значительно меньшем количестве. Кроме того, они имели необычное соотношение размеров белковой части и глобоида (места отложения фитина), которое выявлялось при параллельной окраске на белок и на фитин: очень небольшая белковая часть соседствовала с необычно крупными глобоидами. Полученные данные говорят о высокой устойчивости процесса отложения белка в запас, протекающего даже при полном исключении азота из питательной среды. При этом белки откладываются в вакуоли рядом с фитином, образуя алейроновые зерна.

В аналогичной работе с изолированным эндоспермом однодольного растения – кукурузы (*Zea mays* L.) – установлена способность молодого эндосперма *in vitro* переходить к накоплению запасного проламина – зеина. С помощью тяжелого изотопа азота (^{15}N) показано, что изолированный эндосперм кукурузы способен использовать в синтезе белка не только органическую (глицин) но и минеральную формы азота. Запасующая ткань семени однодольного (кукуруза), как и двудольного (клещевина) растений содержит активные ферментные системы синтеза аминокислот из минерального азота и сама может осуществлять полную цепочку превращений для формирования белковых резервов семени. Интересно отметить, что ^{15}N из глицина преимущественно включался в запасные белки кукурузы (зеин и глютелины), тогда как ^{15}N из сульфата аммония – в альбумины и глобулины. Общие закономерности синтеза и накопления запасных белков, характерные для созревающих зерновок (в частности, генетически детерминированная интенсивность накопления зеина), сохраняются при культивировании изолированной запасующей ткани на питательной среде.

Добавление к питательной среде различных антибиотиков позволило выявить тип рибосом, осуществляющих синтез запасных белков, предположить время выдачи информации на их синтез. Показана способность АБК усиливать накопление запасных белков и ускорять созревание эндосперма.

Таким образом, изолированный эндосперм может служить удобным модельным объектом для изучения различных закономерностей синтеза и накопления запасных белков в семенах растений – процессов, имеющих большое хозяйственное значение.

Культура побегов *Stevia rebaudiana* Bertoni *in vitro* как перспективный источник натуральных низкокалорийных подсластителей – стевиол-гликозидов

Бондарев Н.И., Бондарева Т.А., Мельникова А.А., Ульянова А.А.

Орловский государственный университет им. И.С. Тургенева. Комсомольская ул., 95, Орел, Россия.
nikbond@inbox.ru

Стевия (*Stevia rebaudiana* Bertoni, *Asteraceae*), растение-эндемик Парагвая. Её листья содержат ряд дитерпеновых тетрациклических стевиол-гликозидов (СГ) – соединений с высокой подслащающей способностью (примерно в 300 раз слаще сахарозы). Основными по содержанию (мажорными) СГ являются стевиозид и ребаудиозиды А и С. Для СГ характерны такие уникальные свойства как низкокалорийность, отсутствие токсичности, мутагенности и привыкания к ним. Кроме того, они обладают гипогликемическими свойствами, а также могут снижать кровяное давление. В связи с вышеизложенным, СГ чрезвычайно перспективны в качестве заменителей сахара для людей, страдающих от заболеваний, связанных с нарушением углеводного обмена, особенно для больных диабетом, а также для широкой замены углеводов в пищевой промышленности. Ранее нами было установлено, что в листьях интактных растений стевии содержание СГ составляет 3-8% от сухой массы, в зависимости от генотипа, в то время как в культурах клеток они накапливаются в незначительных количествах. Было также выявлено, что значимыми факторами для биосинтеза СГ в культурах стевии *in vitro* являются состав и концентрация основных групп компонентов питательной среды, а также свет и температура. Культуры стевии *in vitro*, являющиеся прекрасными модельными системами для выяснения особенностей метаболизма дитерпеновых гликозидов, при достаточно глубоком изучении возможностей регуляции биосинтеза СГ могут быть перспективными источниками этих низкокалорийных подсластителей. Однако к настоящему времени культуры стевии *in vitro* не используются для получения сырья, содержащего натуральные подсластители из-за низкого содержания в нем СГ. Цель настоящей работы – выяснение особенностей биосинтеза и накопления СГ в культурах *Stevia rebaudiana* Bertoni *in vitro*, а также регуляция этих процессов под влиянием различных факторов.

В результате проведенных исследований было обнаружено, что выращенные поверхностным способом гетеротрофные клетки содержат следовые количества СГ, а при глубинном культивировании процессы образования и накопления в них СГ интенсифицируются незначительно. Изменение состава и концентрации компонентов питательной среды, а также условий освещения оказывало значительное влияние на процессы роста культур клеток и биосинтез в них СГ, увеличивая содержание последних иногда на порядок. Свет активизировал образование СГ, что подтверждает предположение об участии хлоропластов в этом процессе. В морфогенных каллусных культурах содержание СГ увеличивалось еще на порядок, что свидетельствует о зависимости уровня накопления этих соединений от дифференциации и специализации клеток. Итак, оптимизируя факторы культивирования, можно добиться увеличения содержания СГ в культурах клеток стевии примерно в 100 раз, однако, даже в этом случае, оно оставалось невысоким по сравнению с интактными растениями и, в лучшем случае, достигало нескольких десятых процента. В дальнейшем было обнаружено, что в побегах морфогенного каллуса, синтез СГ резко увеличивается, к тому же, при оптимизации развития побегов *in vitro*, их содержание можно еще существенно повысить. Так, в листьях пробирочных растений содержание СГ было всего в 5-6 раз ниже по сравнению с интактными растениями. При культивировании побегов стевии в биореакторе с жидкой питательной средой, развитие побегов улучшалось, что проявлялось и в увеличении содержания СГ. Так, сухая масса листьев побегов была выше в 2 раза, а содержание СГ в них – в 3 раза по сравнению с выращиванием в пробирках. При этом оно достигало 3,5 %, что почти соответствует его уровню в плантационных растениях. Более того, оптимизируя условия культивирования в биореакторе, удалось добиться увеличения содержания СГ еще в 2 раза.

Таким образом, выращивая побеги стевии в биореакторах с жидкими питательными средами определенного состава и оптимизированными условиями культивирования, можно круглогодично получать биомассу, содержащую в 1,5-2 раза больше СГ, чем в растениях, выращенных на плантациях в условиях средней полосы России. Такая технология получения растительного сырья может быть экономически эффективной, что позволит обеспечить широкое использование натуральных низкокалорийных подсластителей в пищевой промышленности и медицине, а в конечном итоге приведет к оздоровлению и увеличению продолжительности жизни населения.

Культуры клеток тиса *Taxus spp.* как продуценты дитерпеноидных таксоидов

Демидова Е.В. *, Глоба Е.Б. *, Кочкин Д.В.**

* Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.

** Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова. Ленинские горы, 1, Москва, Россия.
eln_demidova@mail.ru

Суспензионная культура клеток высших растений является важным альтернативным источником растительного сырья, особенно редких, медленно растущих видов, к которым относится род *Taxus*. Растения тиса – продуценты дитерпеноидов таксанового ряда (таксоидов), обладающих противоопухолевой активностью. Наиболее ценным из них является представитель С13-ОН группы этих соединений паклитаксел (таксол), используемый в терапии ряда онкологических заболеваний. В последнее время в медицине, помимо паклитаксела, появляется интерес к другим дитерпеноидам тиса, в том числе представителям С14-ОН группы таксоидов.

Большой проблемой для получения таксоидов является растительное сырье. Использование биотехнологических подходов его получения весьма перспективно, однако культуры клеток хвойных растений являются сложным объектом, для них характерны низкие ростовые характеристики и клеточная биомасса, как правило, может существенно отличаться по составу и содержанию таксоидов от интактных растений.

В Отделе биологии клетки и биотехнологии ИФР РАН создана на сегодняшний день самая большая в России, а согласно доступным источникам, и в мире, коллекция каллусных и суспензионных культур клеток тиса, состоящая из более чем 30 линий культур клеток четырех видов рода *Taxus*: *T. baccata*, *T. cuspidata*, *T. canadensis*, *T. wallichiana* и гибрида *Taxus x media*. Произведены работы по оптимизации ростовых характеристики полученных культур и отобраны штаммы и линии с высокими ростовыми характеристиками (для лучших линий каллусных культур клеток – индекс роста свыше 8, суспензионных культур – более 10; жизнеспособность клеток – выше 90%).

Для ряда суспензионных культур клеток осуществлено выращивание в лабораторных биореакторах объемом 2 – 10 литров с сохранением высоких ростовых характеристик, а для культуры клеток *T. wallichiana* разработана технология аппаратного выращивания биомассы в биореакторах пилотного (75 литров) и полупромышленного (630 литров) объемов.

С помощью современных методов (различные варианты ВЭЖХ-МС, ЯМР) проведен детальный фитохимический анализ экстрактов из биомассы полученных каллусных и суспензионных культур клеток. Установлено, что вне зависимости от вида, линии и/или условий выращивания большая часть исследованных культур клеток *Taxus spp.* сохраняет способность к образованию дитерпеноидов таксанового ряда. Однако в условиях культуры *in vitro* в клетках тиса преимущественно накапливаются неполярные 14-гидроксированные таксоиды (в виде полиэфиров). Сопоставление полученных результатов с данными литературы позволяет заключить, что образование 14-ОН таксоидов в клетках *in vitro* носит общий характер и наблюдается в культурах клеток практически всех видов тиса, в которых проводился анализ 14-ОН таксоидов.

Были проведены работы по инициации С13 гидроксированных таксоидов в культуре клеток *T. wallichiana*. Для этого был применен в качестве элиситора метилжасмонат. После добавления в среду выращивания в экспоненциальной фазе роста метилжасмоната в концентрации 100 мкМ в клетках были обнаружены таксоиды С13-ОН группы, в том числе паклитаксел. Содержание паклитаксела в биомассе достигало 0,02% от сухой массы клеток, что сопоставимо с содержанием этого соединения в интактном растении.

Таким образом, полученные результаты подтверждают перспективность использования культур клеток различных видов тиса в качестве возобновляемого растительного сырья для получения противоопухолевых дитерпеноидов таксанового ряда.

Работа выполнена при финансовой поддержке Мегагранта Правительства Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1882).

Масс-спектрометрия как основа гипотезо-генерирующего подхода в изучении серин-треониновой протеинкиназы SpkH цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC6803

Зорина А.А. *, Клычников О.И. **, Новикова Г.В. *

* Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.

** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. Ленинские горы, 1, Москва, Россия.
zorina.anna@yahoo.com

Масс-спектрометрия представляет собой мощный инструментально-методологический подход, который находит широкое применение в биологии. Привлечение его возможностей зачастую позволяет поставить финальную точку в исследовании, итогом которого является идентификация белка и/или группы белков, метаболитов, пост-трансляционных модификаций аминокислотных остатков, а также их положения в белках. Однако в ряде случаев, само масс-спектрометрическое исследование может стать отправной точкой исследования.

Цель нашей работы состояла в изучении роли серин-треониновой протеинкиназы (СТПК) SpkH в гомеостазе клеток цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC6803. Ранее в экспериментах *in vitro* мы показали, что белок, кодируемый геном *spkH*, является функционально активной протеинкиназой. Для того, чтобы приблизиться к ответу на вопрос о возможном участии СТПК SpkH в клеточных процессах, методами протеомного масс-спектрометрического анализа мы исследовали состав субпротеомов цианобактерии: периплазмы и внеклеточной фракции. Для этого мы сравнивали наборы белков, полученных из клеток цианобактерии дикого типа и мутанта по СТПК SpkH. Применяв подсчёт общего числа детектированных спектров, относящихся к конкретному белку, т.н. «spectral count» подход, а также сравнив профили белков после их одно- и двумерного разделений в ПААГе, мы обнаружили значительные отличия в содержании ряда белков, например, FutA2, которые вовлечены в метаболизм железа в клетках *Synechocystis*. Кроме того, мы обнаружили отличия в представленности некоторых белков, которые задействованы в трансмембранном транспорте (HofG).

Основываясь на полученных данных, мы сформулировали рабочую гипотезу о возможном участии протеинкиназы СТПК SpkH в поглощении и/или транспорте железа в клетках цианобактерий в результате которых может изменяться метаболизм этих ионов. Проведённые предварительные физиологические тесты показали повышенную по сравнению с диким типом чувствительность клеток мутанта по СТПК SpkH к недостатку железа в среде культивирования. Эти данные подтверждают обоснованность и эффективность применённой нами стратегии исследования, в основе которой лежит анализ данных масс-спектрометрических экспериментов.

Работа авторов проводится при частичной поддержке РФФИ (грант № 20-04-00757).

Микроводоросли — будущие биофабрики полифосфатов?

Соловченко А.Е.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. Ленинские горы, 1, Москва, Россия.
solovchenko@mail.bio.msu.ru

В настоящее время устойчивое использование фосфора является одним из самых серьезных вызовов, стоящим перед человечеством. Минеральные фосфаты, используемый для производства химических фосфорных удобрений, жизненно необходимых современному сельскому хозяйству, являются конечным невозобновляемым ресурсом, крайне неравномерно распределенным между странами мира. Несмотря на это, нынешние процедуры переработки и использования фосфора крайне неэффективны, а это означает, что более 80% добытого фосфора, в конечном итоге, превращается в отходы, вторичная переработка которых невозможна на текущем уровне техники.

В то же время с высоким содержанием фосфора в неорганической и (или) органической форме сточные воды являются ценным источником питательных веществ для выращивания биомассы микроводорослей, обогащенной ценными полифосфатами. Практическую ценность для человека представляют как препараты определенных фракций полифосфатов, обладающие потенциальным противовоспалительным и противомикробным действием, так и биомасса микроводорослей, обогащенная полифосфатами. Последняя представляет собой экологически чистое биоудобрение с контролируемым высвобождением фосфора в почве.

Использование микроводорослей как биофабрик для производства полифосфатов основано на их способности поглощать много больше фосфора по сравнению с текущей потребностью метаболизма, известной как "избыточное поглощение" фосфора (luxury P uptake). При этом поглощенный фосфор накапливается преимущественно в виде неорганического полифосфата. Эффективное применение микроводорослей для генерации биомассы с высоким содержанием полифосфатов в настоящее время ограничено недостаточными фундаментальными знаниями биологии фотосинтетической клетки в средах, содержащих избыток фосфора.

В докладе обобщаются последние результаты исследований избыточного поглощения фосфора и регуляции биосинтеза полифосфатов. Дается обзор ультраструктурных аспектов внутриклеточного запасаения этого питательного элемента. Обсуждается значение этих результатов для биотехнологии и охраны окружающей среды.

Литература

Kulaev, I., et al. (2004). *The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates*. Chichester, England, John Wiley & Sons, Ltd.

Solovchenko, A., et al. (2016). "Phosphorus from wastewater to crops: An alternative path involving microalgae." *Biotechnology Advances* 34(5): 550–564.

Solovchenko, A., et al. (2019). "Phosphorus starvation and luxury uptake in green microalgae revisited." *Algal Research* 43: 101651.

Solovchenko, A. E., et al. (2019). "Luxury phosphorus uptake in microalgae." *Journal of Applied Phycology* 31(5): 2755-2770.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования России (проект RFMEFI61620X0125).

Микроклональное размножение земляники

Собралиева Э.А. *, Идрисова М.*

Чеченский государственный университет, Шерипова ул.,32, Грозный, Россия.
Чеченский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Ленина ул.1, Грозный, Россия.
batukaevmalik@mail.ru

Накопление инфекционного фона, вызванное продолжительным применением технологии вегетативного размножения плодово-ягодных культур, в том числе земляники садовой, привело к ограничению реализации генетического потенциала существующих сортов. Масштабное внедрение культур апикальных меристем в корне изменило ситуацию в сторону оздоровления и улучшения посадочных материалов ягодных культур. На сегодняшний день методика микроклонального размножения культурных растений хорошо освоена и эффективно решает задачи инновационного развития агропромышленного комплекса. Тем не менее, биотехнологическая отрасль стабильно развивается посредством совершенствования отдельных этапов системы микроклонального размножения.

При микроклональном размножении земляники решали две задачи: получение стабильно растущих клонов и получение максимального числа генетически идентичных оригинальному растению клонов. Модификация питательной среды происходила на этапе мультипликации за счет изменения состава и соотношения в нем минеральных веществ, витаминов и гормонов. Результаты исследовательских работ свидетельствуют о том, что лучшего развития эксплантов и получения более насыщенного зеленого цвета возможно за счет увеличения концентрации в среде MS хелата железа в 2 раза. Также, в сочетании с 6-БАП в питательных средах используется ИУК в концентрации 0,2 мг/л питательной среды. Модификация питательной среды по витаминному составу предусматривала повышение Тиамина с 0,5 до 1 мг/л., а так же включение в стандартную среду глицина в дозе 0,05 мг/л. На исследуемых нами питательных средах проводился процесс мультипликации оздоровленных эксплантов земляники сорта Ирма. Технология черенкования пробирочных растений общепринятая в системе микроклонального размножения.

Эксперимент длился на протяжении трех циклов мультипликации с продолжительностью по 28 дней в каждом. Первая партия для размножения была отобрана из эксплантов растений-доноров, стерилизованных по модифицированной методике. Количество растений в первой мультипликации в каждом варианте составляло по 3 шт. В результате эксперимента определялся коэффициент размножения.

Таблица 1. Коэффициент размножения растений земляники *in vitro* в зависимости от питательной среды.

	Выход черенков, шт./растение			
	Контроль	Вариант 1	Вариант 2	Вариант 3
	МС Стандарт	МС Стандарт + CO ₂ (50 мг/л)	МС модификация	МС модификация + CO ₂ (50 мг/л)
1 размножение	8	12	14	16
Кол-во черенков	24	36	42	48
2 размножение	9	11	11	15
Кол-во черенков	216	396	462	720
3 размножение	14	15	14	16
Кол-во черенков	3 024	5 940	6 468	11 520

Полученные результаты, свидетельствуют о влиянии модификации питательных сред на показатели размножения безвирусного материала как за счет внесения изменений в стандартной среде содержания минеральных компонентов, гормонов и витаминов, так и за счет включения в них углекислого газа. Сравнивая вариант 2 с контролем следует отметить значительное повышение выхода жизнеспособных черенков за счет дополнения нитратного азота, сульфата железа и включения в состав ИУК и глицина. Преимущество на 84 день (3-ий этап размножения) составило 114 %. Наличие двойной дозы в контрольном варианте такого важного компонента развития растений как 6-БАП по отношению к варианту 2 не позволило повысить коэффициент размножения. Заслуживающими пристального внимания является результат, достигнутый за счет введения углекислого газа в исследуемые питательные среды. Так в варианте 1 без изменения минерального состава питательной среды и введения в нее дополнительных гормонов и витаминов использование углекислоты привело повышению выхода черенков на 96,4%, что незначительно уступает коэффициенту размножения в варианте 2. Аналогичная тенденция наблюдается и при включении углекислоты в состав модифицированной питательной среды (вариант3). Увеличение выхода черенков по отношению к варианту 2 достигает 78%.

Микроклональное размножение сортов винограда Дагестана

Мамедова К.К., Нухманова П.Ш., Дамирова К.А., Алиева З.М.

Дагестанский государственный университет. ул. М. Гаджиева, 43а, Махачкала, Россия.
zalieva@mail.ru

Культура винограда (*Vitis vinifera* L.) вносит существенный вклад в экономику многих регионов, в том числе Дагестана. Виноград можно возделывать на почвах, малопригодных для других сельскохозяйственных культур. При этом одним из лимитирующих факторов часто выступает производство качественного посадочного материала, особенно для трудно возделываемых в естественных условиях редких и ценных сортов. Разработка рациональных приемов при клональном микроразмножении винограда позволяет использовать их в системе оздоровления и размножения посадочного материала, а также совершенствовать способы адаптации растений, полученных *in vitro*, для увеличения выживаемости в условиях *in vivo*. Индукция множественных побегов из апикальных меристем на различных типах питательных сред один из способов повышения эффективности размножения винограда *in vitro*. Растения винограда, полученные с помощью микроклонального размножения, являются предбазовым посадочным материалом класса А, предназначенным для закладки суперэлитных маточников, являющихся основой для производства сертифицированного посадочного материала (Медведева, 2008). Существует необходимость повышения эффективности метода и его совершенствования с целью повышения выхода и снижения себестоимости конечного продукта – оздоровленных адаптированных к нестерильным условиям микрорастений.

Для каждого вида и сорта растений оптимальный набор факторов культивирования индивидуален, поэтому данная работа посвящена оптимизации методики микроклонального размножения эндемичных сортов винограда Дагестана. В опытах были использованы сорта винограда Агадаи, Хатми, Хусайне Белый. Основными задачами работы были подбор питательных сред для разных этапов культивирования эксплантов и оптимизация их гормонального состава. На разных этапах микроразмножения были использованы среды Мурасиге-Скуга (МС) или Левокумского (ЛК) с добавлением ИМК (0.1, 0.5, 1.0, 2.0 мг/л) и/или БАП (0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 2.5 мг/л).

Для этапа введения в культуру *in vitro* в ходе экспериментов была отобрана агаризованная среда ЛК, обогащенная БАП (0,5 мг/л). На среду высаживали экспланты точек роста, заготовленные с зеленых побегов визуально здоровых кустов винограда и обработанные в соответствии с требованиями работы в стерильной культуре. На этапе микроразмножения также была использована агаризованная среда ЛК, содержащая БАП (0,5 мг/л), а также жидкая среда ЛК + БАП (0,5 или 1 мг/л). Этап микроразмножения *in vitro* проводился с растениями, достигшими размера 5-8 см. На 40-е сутки их извлекали из пробирок, выделяли узловые экспланты и верхушечные почки размером 0,5-1 см, которые помещали на жидкую среду ЛК + БАП (0,5 мг/л), где культивировали в течение 15-20 дней. Полученные регенеранты для пролиферации побегов пересаживали на жидкую питательную среду, содержащую БАП в концентрации 0,5 или 1 мг/л. На этапе укоренения полученные *in vitro* побеги высотой 1,5-2 см высаживали на укоренение на агаризованную среду МС с уменьшенным содержанием макроэлементов (1/4 нормы), сахарозы (10 мг/л) и ИМК (0,1 мг/л).

Выживаемость эксплантов точек роста сорта Хусайне Белый была высокой (90-100%). Оптимальным для роста эксплантов оказался вариант среды с БАП (0,1) и сочетанием БАП (1) и ИМК (1). Высокие показатели среднего количества почек на эксплант были отмечены в вариантах с БАП (0.1, 0.5, 1). Интенсивная закладка почек (90-100%) отмечена на среде МС + БАП (0.1, 0.5 или 1), МС + БАП (1) + ИМК (2), а также МС + БАП (2.5) + ИМК (0.5), низкая – в варианте МС + БАП (0.1) + ИМК (0.1). Оптимальной для роста эксплантов сорта Агадаи явилась жидкая питательная среда МС + БАП (2) + ИМК (2), а для закладки почек – МС + БАП (2.5) + ИМК (0.5). В целом закладка почек у эксплантов сорта Агадаи происходила менее интенсивно (в среднем около 50%), чем Хусайне (60-100 %). Выживаемость эксплантов сорта Хатми также была выше, чем у сорта Агадаи, на среде с 1 мг/л БАП она достигала 100%. Исходя из результатов, полученных на различных вариантах питательных сред для этапа ввода в культуру *in vitro* эксплантов сорта Хатми в качестве оптимальной по выживаемости и образованию почек была выбрана среда ЛК с добавлением 0.5 мг/л БАП.

Опыты с микрочеренкованием *in vitro* показали, что высокая выживаемость микропобегов сорта Хатми (100%) наблюдалась в течение трех последовательных пассажей на среде ЛК, содержащей 0.5 или 1 мг/л БАП. Закладка почек достигала 100% в первом пассаже, в последующих пассажах несколько снижалась, но оставалась на достаточно высоком уровне – 85-88%. В среднем формировались 3-5 побегов на эксплант.

Для развития корневой системы побеги переносили на среду МС, содержащую низкую (0.1 мг/л) концентрацию ИМК. Более активный ризогенез наблюдали у эксплантов сорта Хатми, размеры корня достигали в среднем 7.3 см, тогда как у сорта Агадаи 1.6 см.

Проведенные исследования показали возможность успешного размножения Дагестанских сортов винограда методом культуры *in vitro*. Для сортов винограда Хатми и Агадаи отработана схема клонального микроразмножения, включающая все последовательные этапы от введения в культуру *in vitro* и получения большого числа побегов, до их укоренения. При введении эксплантов точек роста винограда в культуру *in vitro* и на этапе микрочеренкования установлены оптимальные концентрации регуляторов роста, изучено их влияние на рост и развитие эксплантов.

Определение устойчивости трансгенных растений табака *in vitro*

Ралдугина Г.Н. *, Евсюков С.В. *, Богоутдинова Л.Р. **, Карпычев И.В. *, Гулевич А.А. **, Баранова Е.Н. **

* Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.

** Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии,
Москва, Тимирязевская 42, Москва, Россия.
raldugina42@mail.ru

Растения табака сорта «Самсун» были трансформированы генетической конструкцией, содержащей гены синтеза холиноксидазы из *Arthrobacter globiformis* (*codA*) и устойчивости к канамицину *nptII*. Трансгенность растений-регенерантов была доказана ПЦР с праймерами как для *codA*, так и для *nptII*. Из полученных трансформантов были отобраны растения, содержащие оба гена, так как в некоторых из побегов мог присутствовать только один из генов, содержащихся в конструкции. Экспрессия гена *codA* была показана с помощью ОТ-ПЦР. Известно, что ген холиноксидазы участвует в синтезе глицин-бетаина – четвертичного аммонийного соединения, предохраняющего клетки растений от воздействия абиотических стрессов. Чтобы быстро отобрать наиболее устойчивые растения, листовые экспланты сформированных укорененных растений нескольких линий были помещены в чашки Петри на агаризованную каллусообразующую среду МС, содержащую NaCl в концентрации 0, 200 и 400 мМ. После инкубации чашек в течение 3-х суток в климатической камере без освещения при $t = 25^{\circ}\text{C}$, экспланты были разделены на 2 части. Половина была перенесена на идентичную каллусообразующую среду, и оставлена в тех же условиях, а вторая часть эксплантов была перенесена на среду для побегообразования с теми же концентрациями соли и помещена в световую камеру с освещенностью 3 кЛк с фотопериодом 16/8 (день/ночь). Через 4 недели проводили подсчет эксплантов, образовавших побеги, и взвешивали экспланты, образовавшие каллус после культивирования в темноте на среде для каллусообразования. В результате этого эксперимента было четко показано, что экспланты нетрансформированных растений при воздействии 200 мМ NaCl погибали уже на 7-9 сутки культивирования, тогда как экспланты всех растений, экспрессирующих ген холиноксидазы, при 200 мМ соли образовывали каллусы, и их масса была выше или равна биомассе без засоления. Похожий эффект наблюдали и на среде, стимулирующей побегообразование. Экспланты нетрансформированных растений на засоленной среде погибали на 7-10 сутки, а экспланты трансгенных растений образовывали побеги и при 200 мМ NaCl. При 400 мМ все экспланты погибали. Таким образом, можно достаточно быстро в условиях *in vitro* выявлять устойчивые трансформанты, используя только фрагменты растений, а сами растения сохраняя в культуре для дальнейшего выращивания.

Работа выполнена в рамках проекта РФФИ (грант 19-016-00207) и при частичной финансовой поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 0574-2019-002 и № АААА-А19-119080690056-3).

Оптимизация технологии промышленного культивирования микроводорослей

Маркелова А.Г., Бедбенов В.С., Габрелян А.К., Габрелян Д.А.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
fialma@yandex.ru

Массовое культивирование микроводорослей становится все более популярным в мире, что неудивительно, – многообразие их метаболитов позволяет использовать полученную биомассу в пищевой, косметической, фармацевтической промышленности и в сельском хозяйстве. И, хотя интерес к интенсивному культивированию появился более полувека назад (в нашем Отделе в частности), некоторые проблемы остались нерешенными. В частности, культивирование в лаборатории, в контролируемых условиях, отличается от промышленного; внедрение «лабораторных» технологий в производство требует решения следующих задач: обеспечение стабильного получения больших объемов биомассы с высокой плотностью и максимально возможная бактериологическая чистота, удешевление производства. Тестируя разные типы культиваторов, мы использовали накопительный режим культивирования. Для обеспечения высокой скорости роста водорослей (залог меньшей бактериальной зараженности) в культиваторах объемом 120 л необходимо, чтобы плотность засева была около 15 млн. кл/мл. Кроме того, засеваемая культура должна находиться в экспоненциальной фазе роста – клетки должны пройти несколько циклов деления. Нами был выбран путь постепенного масштабирования объемов культивирования – нужный штамм, в нашем случае *Chlorella* spK IPPAS C-1, из пробирки засевался на среду ½ Тамия в 2 сосуда (250 мл каждый), плотность исходного засева 5 млн. кл/мл. В этих сосудах культура выращивалась в интенсивных условиях в специальной установке, разработанной в лаборатории, при температуре 32 ± 1 °С и освещении с интенсивностью 200 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. Для перемешивания культуры и дополнительного снабжения углекислым газом использовали барботаж стерильной газовой смеси, обогащенной CO_2 до концентрации 1,5-2%. Когда оптическая плотность культуры, измеренная при 750 нм (ОП_{750}) достигала 12-15 отн. ед. (что соответствует 450-500 млн. кл/мл), оба сосуда служили засевом для прямоугольного культиватора объемом 5 л с лопаточным перемешиванием, который был сконструирован как промежуточный, для получения 5 л максимально плотной и чистой суспензии. По ходу экспериментов модернизировалась конструкция культиватора – способ перемешивания, способ освещения, барботирование газовой смесью, максимально возможное соблюдение стерильности. В итоге удалось добиться стабильного получения культуры с $\text{ОП}_{750} = 12-13$ отн. ед. (соответствует 450-500 млн кл/мл) на 4-ый день роста при низкой бактериальной загрязненности. Однако прямоугольная конструкция оказалась небезупречной – наблюдалось оседание клеток на дно в некоторых местах, особенно, при выращивании других штаммов с более крупными клетками. Полученные 5 л суспензии использовались в качестве засева для цилиндрического культиватора объемом 120 л. Для этого биореактора среда готовилась в виде 5 л концентрированных растворов на дистиллированной воде, простерилизованных автоклавированием. Остальной объем достигался добавлением очищенной фильтрами водопроводной водой, что очень важно, т.к. неочищенная вода может ингибировать рост водорослей. Для цилиндрической конструкции культиватора оказалось довольно сложным обеспечить клетки водорослей достаточной освещенностью, т.к. при достижении суспензией определенной оптической плотности (начиная с $\text{ОП}_{750} = 2$ отн. ед.) света оказывалось недостаточно, хотя освещение было не только снаружи культиватора, но и изнутри. В цилиндрическую емкость была помещена «труба», в ней размещались светодиоды (подобранные с максимальной близостью к естественному спектру), толщина слоя суспензии в культиваторе была не более 12 см. Перемешивание достигалось усиленным барботажем – трубка с отверстиями, подсоединенная к баллону с CO_2 , была погружена в культивируемую суспензию. Несмотря на это, достигнуть значений ОП_{750} больше чем 5 отн. ед. (соответствует 200 млн кл/мл) не удалось. Клетки хлореллы оставались жизнеспособными, и при помещении в исходные условия интенсивного культивирования продолжали делиться. Цилиндрическая конструкция 120-литрового культиватора оказалась неэкономичной для получения биомассы высокой плотности, но приемлемой в других случаях. По окончании эксперимента суспензию сливали, центрифугировали, полученную пасту переносили в чашки Петри. Часть замораживали, часть хранили при 4 °С, в холодильнике. В таких условиях паста может храниться несколько месяцев. В настоящее время запланированы эксперименты с непрерывным культивированием, а также принципиально новыми конструкциями культиваторов. На основе коллекции IPPAS постоянно ведется поиск новых штаммов микроводорослей, обладающих уникальными свойствами, перспективными в плане биотехнологии, продолжают работы по вводу их в интенсивную культуру.

Работа выполнена на базе “Научно-производственного биотехнологического комплекса для проведения работ по изучению, сохранению и практическому применению культивируемых клеток и органов высших растений и микроводорослей” при финансовой поддержке Мегагранта Правительства Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1882).

Опыт использования TIS-технологий для клонального микроразмножения лиственных древесных растений

Ветчинникова Л.В., Серебрякова О.С., Петрова Н.Е., Степанова А.И., Кузнецова Т.Ю.

Институт леса – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Пушкинская ул., д. 11, Петрозаводск, Россия.

vetchin@krc.karelia.ru

Для сохранения и воспроизводства ценных видов лиственных древесных растений все шире применяется клональное микроразмножение. С его помощью можно сохранить в потомстве все ценные признаки, свойственные исходным генотипам, и тиражировать их независимо от времени года. Однако данный способ вегетативного размножения растений остается пока трудоемким и дорогостоящим. В определенной степени это обусловлено тем, что для культуры растительных тканей и органов *in vitro* используется полутвердая агаризованная питательная среда, работа с которой требует ручного труда.

Значительный прогресс в этом направлении произошел в конце 20 века с появлением новой технологии – Temporary Immersion System (TIS) или системы временного погружения растительного материала в жидкую питательную среду. На ее основе были разработаны различные установки в виде небольших емкостей или сосудов, внутри которых осуществляется циклическое чередование притока/оттока жидкой среды и потока воздуха в условиях *in vitro*. Наиболее перспективными среди них оказались замкнутые полуавтоматические устройства типа RITA® (1995 г.), BIT® (1999 г.) и SETIS® (коммерческая серия BIT), а позднее – PlantForm (2011 г.).

Для оптимизации технологии клонального микроразмножения и массового тиражирования экономически ценных представителей сем. Betulaceae нами использовались сосуды PlantForm или «минибиореакторы», которые обладают существенными преимуществами: 1) простота конструкции в виде пластикового контейнера с плотно прилегающей крышкой и входами для подключения системы управления процессом; 2) единый сосуд для размещения растительного материала и жидкой питательной среды; 3) экономное использование площадей при культивировании растений *in vitro* за счет квадратной формы сосудов и их установки друг на друга.

Объектами исследований служили карельская береза *Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti, далекарлийская береза *B. pendula* Roth var. *dalecarlica* Schneid. (L. f.), ольха мелкопильчатая *Alnus incana* f. *angustissima* Holmberg ex Nylander) и др., входящие в состав коллекции *in vitro* клонов редких растений семейства Betulaceae, созданной нами ранее (<http://www.ckr-rf.ru/usu/465691/>). При проведении опытов в каждом «минибиореакторе» (20x16x16 см, объемом ~4 л) на поверхности специальной перфорированной площадки, закрепленной выше уровня жидкой питательной среды, свободно размещали разное количество побегов: от 25 до 400. В контрольном варианте побеги располагали индивидуально на полутвердой агаризованной питательной среде в стеклянных сосудах (объемом 100 мл) по 5–7 шт. в каждом. После завершения опытов определяли коэффициент размножения (или количество вновь образованных пазушных побегов на одном исходном), прирост побегов при их культивировании *in vitro* в течение 4 недель, визуально оценивали наличие хлороза и уровень жизнеспособности побегов.

Согласно полученным данным, использование «минибиореакторов» с жидкой питательной средой способствовало повышению коэффициента размножения побегов *in vitro* более чем в два раза по сравнению с полутвердой агаризованной. Созданные условия оказались оптимальными для развития фотосинтезирующей поверхности у миксотрофных побегов, причем в опыте частота хлороза листьев была в 7 раз ниже по сравнению с контролем. Высокий уровень абсорбции питательных веществ и фитогормонов в условиях жидкой питательной среды, по всей вероятности, способствовал росту и развитию побегов, а аэрация воздушного пространства препятствовала накоплению этилена внутри сосуда. Жизнеспособность побегов составила 90% и выше, а изредка наблюдаемая витрификация устранялась путем изменения продолжительности или частоты «погружения» побегов в жидкую питательную среду и/или потока воздуха в течение суточного цикла.

Таким образом, опыт использования TIS-технологии для клонального микроразмножения лиственных древесных растений оказался успешным. Отмечены дополнительные преимущества данной технологии, которые включают экономный расход средств на приобретение реактивов (например, за счет исключения агара) и удобная настройка полуавтоматической системы временного погружения растительного материала в жидкую питательную среду и потока воздуха. В целом ее применение позволило одновременно получать большое количество экономически ценного и генетически однородного посадочного материала, который не только открывает новые возможности для лесного хозяйства, но и может стать основой для решения фундаментальных проблем физиологии и биохимии растений.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета в рамках выполнения государственного задания ФИЦ «Карельский научный центр РАН» (Институт леса КарНЦ РАН).

Особенности культур бородатых корней ряда представителей рода *Scutellaria*

Степанова А.Ю. *, Соловьева А.И. *, Малунова М.В. *, Панов Ю.М. **, Лелишенцев А.А. ***

* Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.

** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, Москва, Россия.

*** Институт клинических исследований и фармацевтической экспертизы, биоаналитическая лаборатория, Угрешская ул., д. 2, стр 8/9, Москва, Россия.
step_ann@mail.ru

Род *Scutellaria* (сем. Lamiaceae) – один из самых многочисленных среди лекарственных растений. В корнях различных видов данного рода синтезируются и накапливаются ценные вторичные метаболиты – флавоны, обладающие антиоксидантной, седативной, противовоспалительной, цитотоксической, а также антикоронавирусной активностью. Показано, что синтез фармакологически ценных флавонов в большей степени сохраняется в культуре бородатых корней (hairy roots). Hairy roots – это корневая культура, полученная с помощью трансформации растения почвенной бактерией *Agrobacterium rhizogenes*. К преимуществам данной культуры относятся стабильность синтеза вторичных соединений, высокая скорость роста и культивирование на питательных средах без добавления гормонов роста. Наиболее исследованы культуры hairy roots самого известного представителя рода *Scutellaria* – шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis*). Однако большой интерес представляют также мало изученные виды рода, особенно редкие эндемичные виды. К их числу относятся *Scutellaria przewalskii* и *Scutellaria pycnoclada*, произрастающие в мало доступных гористых районах Узбекистана. Целью исследования было изучение ростовых характеристик культур hairy roots *S. przewalskii* и *S. pycnoclada* и анализ качественного и количественного состава их флавоноидов, а так же сравнение с составом hairy roots *S. baicalensis*. Полученные бородатые корни *S. przewalskii* и *S. pycnoclada* были проверены на наличие *rolA*, *rolB*, *rolC* и *rolD* генов с помощью метода ПЦР. Для дальнейшего исследования были использованы только те линии hairy roots, у которых было подтверждено наличие всех *rol*-генов. Сравнение показателей проводили на жидкой и твердой питательной среде. Индекс роста исследуемых культур, в основном, значительно отличался, как между видами, так и на разных средах. Среди всех культур максимальным индексом роста обладали hairy roots *S. baicalensis*, культивируемые в жидкой питательной среде – 43. У *S. przewalskii* – 32, у *S. pycnoclada* – 4,7. При выращивании hairy roots на жидкой питательной среде, индекс роста был выше, чем на твердой среде. Качественный анализ метанольных экстрактов из полученных корневых культур с помощью HPLC-MS/MS выявил наличие в них корнеспецифичных флавонов, характерных для растений данного рода: байкалина, байкалеина, вогонина, вогонозида и их предшественника – хризина. Всего было выявлено 19 флавоноидов, в том числе характерные для надземной части растений, – висцидулин III 6-O-β-D-глюкозид, апигенин, апигетрин, изокартамидин-7-O-β-D-глюкоронид, картамидин-7-O-β-D- глюкоронид, скутелларин и нарингенин. Однако последний отсутствовал в экстрактах *S. pycnoclada*. Необходимо отметить, что флавоны надземной части в исследуемых hairy roots присутствовали в незначительных или следовых количествах. В культуре hairy roots *S. przewalskii*, так же как и в культуре *S. baicalensis*, был выявлен ороксалин А и скуллакапфлавоны II, но у *S. pycnoclada* они отсутствовали. Количественный анализа содержания байкалина, байкалеина, вогонина, вогонозида и хризина был выполнен с помощью метода HPLC. Исходя из общего содержания флавонов культуры, выращиваемые, как на твердой, так и жидкой среде образуют ряд: *S. przewalskii* > *S. baicalensis* > *S. pycnoclada*. Сравнение общего содержания флавонов в hairy roots всех изучаемых видов при культивировании на твердой и жидкой среде показало более высокое содержание на жидкой среде. Интересно, что у *S. przewalskii* содержание флавонов на жидкой и твердой среде различалось меньше всего. Это делает полученную нами культуру *S. przewalskii* уникальной, способной синтезировать схожее количество флавонов вне зависимости от плотности среды. Кроме того, в hairy roots *S. przewalskii* уровень содержания флавонов был значительно выше, чем во всех остальных культурах. Даже в hairy roots *S. baicalensis*, обладающих довольно высокой способностью к синтезу флавонов, их содержание было примерно в 2 раза ниже. Исследуемые культуры также значительно отличались друг от друга по соотношению отдельных флавонов и соотношению глюкорониды/агликоны. Так доля агликоновых форм флавонов при культивировании на жидкой среде была максимальной у *S. przewalskii*, а при культивировании на твердой – у *S. baicalensis*. Выявленные отличия могут быть связаны с разной активностью ферментов биосинтеза флавонов в исследуемых культурах, для подтверждения данного предположения необходимы дальнейшие исследования.

Особенности образования вторичных метаболитов в культурах клеток высших растений

Кочкин Д.В., Носов А.М.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова. Ленинские горы, 1/12, Москва, Россия.
dmitry-kochkin@mail.ru

Растения синтезируют сотни тысяч соединений так называемого специализированного или вторичного метаболизма/обмена. Изучение генетики, молекулярной биологии, физиологии и биохимии вторичного метаболизма в интактных растениях (*in planta*) – является одной из наиболее динамично развивающихся областей современной биологии растений. На этом фоне успехи в изучении закономерностей вторичного метаболизма в такой важной для физиологии растений модельной системе как культивируемые в асептических условиях растительные клетки (культуры клеток *in vitro*) – выглядят значительно слабее. По иронии судьбы именно с изучением культур клеток высших растений были связаны одни из первых успехов в биохимии и энзимологии вторичного метаболизма. Однако сейчас многие исследователи обсуждая данный вопрос ограничиваются повторением «классической догмы»: вторичный метаболизм не свойственен культивируемым *in vitro* клеткам растений и при длительном выращивании в стерильных условиях растительные клетки теряют способность к формированию сложного (часто наблюдаемого *in planta*), многокомпонентного состава специализированных соединений. В большинстве случаев это убеждение опирается на результаты таргетированного фитохимического анализа – поиск в культурах клеток только тех соединений, которые считаются основными (в количественном отношении) для соответствующих видов растений (источник такой информации – фитохимия интактных растений). Между тем современное развитие инструментальных методов фитохимического анализа (прежде всего – жидкостной хромато-масс-спектрометрии) позволяет достаточно быстро проводить анализ практически полного состава метаболитов в конкретном растительном образце. При этом изучение культур клеток растений с помощью жидкостной хромато-масс-спектрометрии, как направление в фитохимии, сейчас находится на самом начальном этапе развития.

В предлагаемом докладе на основании собственных результатов фитохимического изучения (в т.ч. с применением жидкостной хромато-масс-спектрометрии) культур клеток растений самых разных систематических групп (представители семейств Тахасеае, Dioscoreасеае, Агалиасае, представители семейств порядка Lamiales и некоторых других систематических групп растений), а также с использованием данных литературы приводятся факты, позволяющие обосновать следующие тезисы:

1. Вторичный метаболизм сохраняется в культивируемых *in vitro* клетках растений. Однако состав метаболитов может существенно отличаться в клетках *in planta* и *in vitro*.

2. Культивируемые *in vitro* клетки растений сохраняют способность к образованию весьма сложных, многокомпонентных смесей вторичных метаболитов. Сложный состав вторичных метаболитов может сохраняться даже в культурах клеток, которые поддерживаются в активно растущем состоянии длительное время.

3. Изменение вторичного метаболизма в культурах клеток растений (по сравнению с интактными растениями) носит закономерный характер, и в некоторых случаях может быть спрогнозировано.

Работа выполнена при финансовой поддержке Мегагранта Правительства Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1882).

Особенности распределения ассимилятов по органам растений сортов риса

Скаженник М.А., Ковалев В.С., Гаркуша С.В., Пшеницына Т.С., Балясный И.В.

Федеральный научный центр риса, п. Белозерный, 3, Краснодар, Россия.
sma_49@mail.ru

Продукционный процесс определяет биологическую и хозяйственную урожайность сельскохозяйственных культур и является теоретической основой формирования агрофитоценоза. Основными компонентами урожая зерновых культур являются: число плодоносящих побегов на единице площади посева и продуктивность плодonoса (колоса, метелки и пр.), определяемая числом зерен на нем и массой отдельной зерновки. Количественные параметры этих элементов продуктивности у новых сортов риса вызывают изменения их урожайности, однако их взаимосвязь исследована недостаточно. Повышение урожайности у их сортов можно ожидать лишь в том случае, когда синтезируемые в процессе фотосинтеза ассимиляты в первую очередь используются на формирование продуктивного стеблестоя и на образование высокопродуктивной метелки, что обеспечит формирование повышенной емкости акцептора - количества зерен на единице площади посева. В основе получения высокого хозяйственного урожая зерновых культур лежит более эффективное поглощение энергии ФАР и более интенсивное использование образующихся ассимилятов на рост генеративных органов и налив зерновок. Это приводит к увеличению доли зерна в общей биомассе посева, то есть к повышению коэффициента хозяйственной эффективности фотосинтеза ($K_{\text{хоз}}$, %). Каковы возможности и физиологические механизмы для повышения $K_{\text{хоз}}$ у новых сортов риса в нашей умеренной по климату зоне рисосеяния? В настоящее время у районированных высокопродуктивных сортов Рапан и Хазар в оптимальных условиях вегетационного опыта (при оптимальной густоте растений и нормальной обеспеченности их элементами минерального питания) величина $K_{\text{хоз}}$ составляет 47-48%, тогда как у зарубежных сортов в тропической зоне рисосеяния она достигает 53-58% и получен образец с величиной его 60%. Ключевым механизмом повышения $K_{\text{хоз}}$ является высокая озерненность и плотность метелки, в основе формирования которой лежит более полное использование ассимилятов побега на образование собственных органов, в первую очередь крупных метелок и стебля, на накопление в последнем больших запасов углеводов для последующего полноценного налива зерновок. У ранее созданных сортов этому мешает образование боковых непродуктивных побегов у растений, первое время растущих за счет ассимилятов главных побегов, а затем затеняющих их. С учетом этого и был создан образец со слабым непродуктивным кущением, с урожайностью 15 т/га. На это указывают некоторые наши данные о том, что у генотипов риса с умеренным кущением меньше расходуется ассимилятов на образование непродуктивных побегов, а больше их используется на формирование метелки, в итоге у них возрастает урожайность. Сильное кущение растений оказывает отрицательное влияние на продуктивность метелки и урожайность сортов. Однако вопрос о связи оптимального распределения ассимилятов по органам растения новых сортов с их урожайностью недостаточно исследован. Работы в этом направлении сдерживаются из-за недостаточной изученности особенностей продукционного процесса у интенсивных и экстенсивных сортов риса, не позволяющей установить основные морфофизиологические признаки и свойства у генотипов, определяющих их урожайность и устойчивость к полеганию. В связи с этим особенности продукционного процесса сортов риса, определяющие их разную урожайность, связаны с целым комплексом физиологических и морфологических признаков растений, выявление которых и установление их корреляций с формированием биологической массы, отдельных элементов структуры урожая является нашей главной задачей. Не исследованы продуктивность фотосинтеза и донорно-акцепторные отношения у образцов с разным распределением ассимилятов по органам побега, определяющим формирование величины отдельных элементов урожая зерна и в целом его уровень на разных фонах минерального питания. Изучение этих вопросов имеет важное значение для общей физиологии растений и особенно для физиологии, селекции и технологии возделывания риса. В данном исследовании изучали фотосинтетические и продукционные процессы интенсивных и экстенсивных сортов риса на разных фонах минерального питания. Установлено, что большая доля ассимилятов фотосинтеза побега интенсивных сортов используется на формирование высоко озерненной метелки, определяющей продуктивность генотипа, но при этом снижается их устойчивость к полеганию. У экстенсивных сортов формируются более мощные, устойчивые к полеганию стебли, но с меньшей продуктивностью метелки. По величине данных параметров можно проводить оценку генотипов на продуктивность и их устойчивость к полеганию. Установленный характер распределения ассимилятов по органам побега риса позволяет определить морфологические и физиологические признаки растений, определяющие урожайность интенсивных и экстенсивных сортов, для использования их в селекции и агротехнике.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 19-416-230021.

Особенности регенерации лиственницы сибирской через соматический эмбриогенез в культуре *in vitro*

Третьякова И.Н., Пак М.Э.

Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение
ФИЦ КНЦ СО РАН, 660036, ул. Академгородок 50/28, Красноярск, Россия.
culture@ksc.krasn.ru

Основным преимуществом соматического эмбриогенеза хвойных в культуре *in vitro*, как стратегии размножения видов (по сравнению с половым и вегетативным размножением), является высокая пролиферативная активность эмбрионной культуры (ЭК), которая может поддерживаться в течение длительного периода времени путем субкультивирования или криоконсервации.

Коллекция Института леса им. В.Н. Сукачева включает 42 длительно пролиферирующие эмбрионные клеточные линии *Larix sibirica*, которые в течение двенадцати лет продуцируют массовые соматические зародыши (до 11103 глобулярных зародышей на 1 г ЭК). Однако для успешной регенерации таких зародышей и получения клонированных растений необходимо изучить процесс реализации морфофизиологических программ, генетическую стабильность полученных эмбрионных культур и соответствие их родительскому генотипу.

Первым признаком эмбрионной культуры (ЭК) у лиственницы является удлинение, поляризация и неравномерное деление соматических клеток, а также локализация ИУК на одном конце удлиненной клетки. Далее, формируется хорошо развитая эмбрионная ткань, представленная эмбрионально-суспензорной массой (ЭСМ), в которой идет активное образование глобулярных соматических зародышей через кливаж. В противоположность ЭК, неэмбрионные каллусы (НЭК) состоят из изодиаметрических, активно делящихся клеток. ЭСМ *Larix sibirica* содержит высокое содержание ИУК (в 100 раз больше, чем в НЭК) и низкое содержание АБК.

Прочтение транскриптомов ЭК и НЭК в культуре *in vitro Larix sibirica* посредством автоматизированной обработки показало, что наибольшими различиями в уровне экспрессии ЭК характеризуются белки, отвечающие за регуляцию физиологических функций и связанные с развитием зародыша.

Исследование регенерационной способности клеточных линий (КЛ) лиственницы сибирской показало значительную вариабельность по реализации их репродуктивного потенциала. Между КЛ наблюдалась значительная изменчивость по количеству и размеру глобулярных зародышей в пролиферирующих эмбрионных культурах и плоидности зародышей. Стабильность по плоидности в клеточных культурах сохраняется до двух лет культивирования. С увеличением возраста культур увеличивается число мутирующих клеток.

Созревание и прорастание соматических зародышей происходит у отдельных эмбрионных клеточных линий. В этих линиях развивались крупные глобулярные зародыши, которые были стабильными по продуктивности ЭСМ, плоидности, имели слабую изменчивость по микросателлитным локусам. На стадии созревания зародыши завершали эмбриогенез и далее прорастали. Сеянцы отдельных КЛ успешно росли в теплице и далее в почве лесопитомника. Клонированные деревья были генетически стабильными и полностью соответствовали КЛ, из которой они были получены. В *восьмилетнем* возрасте у деревьев появились генеративные органы, т.е. происходило сверххранное репродуктивное развитие.

Таким образом, соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* является идеальной моделью для изучения цитогистологических, физиологических и молекулярно-генетических событий, проходящих в процессе эмбриогенеза древесного организма, также может служить для лесовыращивания перспективных клонированных деревьев.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда науки в рамках научного проекта № 19-44-240009.

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

Тюрина Т.М.^{**}, Кочкин Д.В.^{* **}, Глаголева Е.С.^{**}, Тумова М.В.^{*}, Носов А.М.^{* **}

* Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, 127276.

** Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234.
tyurina.tatiana812@gmail.com

Семейство Аралиевые (*Araliaceae*) включает около 1500 видов, широко применяемых в традиционной и современной фитотерапии. Представители семейства отличаются разнообразием тритерпеновых гликозидов, имеющих фармацевтическую значимость. Плантационное выращивание растений рода *Panax spp.* – продуцентов гинзенозидов – часто сопряжено со значительными трудностями, поэтому в настоящее время в качестве источника целевых соединений все более перспективным является использование культур растительных клеток. Изучение закономерности образования и накопления вторичных метаболитов в системах *in vitro* в сравнении с исходным растением позволяет расширить представления о возможностях направленного воздействия на процессы биосинтеза или получения новых соединений. 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. Культивирование проводили на паспортных средах в присутствии и в отсутствие кинетина (гормональный состав для *P. japonicus*: контроль – НУК 2.0 м/л, кинетин 1.0 м/л; эксперимент – НУК 2.0 м/л; для *P. fruticosa*: контроль – 2,4-Д 2.0 м/л, БАП 1.0 мг/л; эксперимент – НУК 2.0 м/л, кинетин 1.0 м/л); при этом на экспериментальной среде штаммы культивировали не менее 11-12 циклов. Культуры выращивали в колбах на качалке в стандартных условиях и в 20 л барботажных биореакторах в отъемно-доливном режиме (5 циклов субкультивирования для каждого варианта). Ростовые и физиологические характеристики определяли стандартными методами. Качественное и количественное определение содержания тритерпеновых гликозидов в клеточной биомассе и среде культивирования проводили методом ультраэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (УЭЖХ-МС) методом внешней калибровки против стандартных образцов тритерпеновых гликозидов.

Изучение динамики роста и особенностей ростовых характеристик исследуемых штаммов в колбах, несмотря на различия в составах сред, не выявило существенных различий в ростовых параметрах для всех вариантов. Методом УЭЖХ-МС с использованием внешних стандартов был проведен анализ качественного и количественного состава тритерпеновых гликозидов в образцах биомассы и культуральной среды экспериментальных вариантов культур клеток *P. japonicus* и *P. fruticosa*. 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 (максимальное суммарное содержание гликозидов до 42 мг/сух. массы (27 сутки) и более 25 мг/мл среды (27 сутки) для биомассы и среды культивирования, соответственно). Преобладающими группами 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 разных групп в клеточной биомассе *P. japonicus* по мере увеличения общей продолжительности аппаратного выращивания (в период с 4 по 6 циклы). При сравнении содержания индивидуальных гинзенозидов разных групп в образцах биомассы *P. japonicus* при выращивании в колбах (19 сутки) и биореакторах (20 сутки) 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 полисиас.

Работы были проведены на базе «Научно-производственного биотехнологического комплекса для проведения работ по изучению, сохранению и практическому применению культивируемых клеток и органов высших растений и микроводорослей» (Мегагрант Правительства РФ, договор № 075-15-2019-1882) с использованием оборудования Уникальных научных установок ИФР РАН (УНУ ОБК ИФР РАН и УНУ ВРККК ВР ИФР РАН).

Особенности роста каллусных культур *Pinus sylvestris* в культуре *in vitro*

Яровицкая В.В., Третьякова И.Н.

Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение
ФИЦ КНЦ СО РАН, 660036, ул. Академгородок 50/28, Красноярск, Россия.
culture@ksc.krasn.ru

В исследованиях использовали стабильно-пролиферирующие клеточные линии сосны обыкновенной, полученные в 2019–2020 гг. в ходе индукции соматического эмбриогенеза в культуре мегагаметофитов с незрелыми зародышами. Клеточные линии были получены от плюсовых деревьев, произрастающих на территории Базаихи (Свердловский район, г. Красноярск). Получены каллусные культуры интенсивного роста, которые сформировались через месяц после введения в культуру, из них пять пролиферирующих эмбриогенных клеточных линий. Возраст эмбриогенных культур 10 мес. Исследование динамики прироста показало характерные особенности роста клеточных линий у разных деревьев. Наблюдалась неоднородность роста клеточных линий, полученных от одного дерева-донора. Прирост клеточных линий составил 0,268 гр. за 6 месяцев.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда науки в рамках научного проекта № 19-44-240009.

**От цианобактерий до археplastид: функциональное многообразие и роль
в эволюции РII сигнальных белков-трансдукторов**

Лапина Т.В. , Селим К.** , Форчхаммер К.** , Ермилова Е.В.**

* Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, Россия.

** Университет Эберхарда и Карла. Тюбинген, Германия.

e.ermilova@spbu.ru

Исследования систем передачи сигналов у различных организмов выявили разнообразие компонентов, которые формируют регуляторные сети. Несмотря на разнообразие и сложность этих систем, некоторые белки - процессоры сигналов - оказались консервативными в процессе эволюции и функционируют не только у прокариот (бактерий и архей), но и у эукариот. Примером таких сигнальных процессоров являются белки из семейства РII. Среди эукариот, РII выявлены только у представителей Archaeplastida.

Канонические белки РII оценивают энергетическое состояние клеток посредством конкурентного связывания АТФ и АДФ и определяют баланс углерода и азота посредством связывания 2-оксоглутарата. Предок Archaeplastida унаследовал сигнальный белок РII от древнего цианобактериального эндосимбионта. Нами впервые охарактеризованы РII-белки у представителей Chloroplastida и впервые установлено, что в процессе эволюции белки РII растений приобретали способность связывать глутамин через С-терминальное расширение - Q-петлю. По нашим данным у представителей Chlorophyta ключевым ферментом в контроле биосинтеза аргинина является N-ацетил-L-глутаматкиназа (NAGK), которая, как у цианобактерий и высших растений, регулируется сигнальным белком из семейства РII.

Экспериментально доказано, что РII-белки зеленых и красных водорослей формируют тримеры и структурно сходны с бактериальными гомологами. Впервые проведенный комплексный анализ структуры и функций РII-белка модельной красной водоросли *Porphyra purpurea* показал, что РII-зависимая сигнальная система красных водорослей по своей организации занимает промежуточное эволюционное положение между РII-системами цианобактерий и Chlorophyta. Нами также впервые охарактеризована структура и молекулярно-биохимические свойства РII-белка уникальной зеленой водоросли *Polytomella parva* (PpaRII), не содержащей хлоропластного генома и утратившей способность к фотосинтезу, и показано, что PpaRII формирует субъединицу в комплексе с NAGK.

В ходе проведенных исследований установлено, что наиболее консервативной мишенью РII белков в процессе эволюции от цианобактерий до Archaeplastida оказался контролирующий биосинтез аргинина фермент, N-ацетил-L-глутаматкиназа. Сравнительный анализ структуры и сенсорных свойств РII у цианобактерий, красных и зеленых водорослей, а также высших растений указывает на эволюционную пластичность РII-сигнальных систем.

Ответная реакция каллусной культуры *Linum grandiflorum* на действие элиситора биотической природы

Гончарук Е.А. *, Назаренко Л.В. **, Аксенова Р.С. **

* Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.

** ГАОУ ВО «Московский государственный педагогический университет».

Малая Пироговская ул, 1, стр.1, Москва, Россия.

goncharuk.ewgenia@yandex.ru

Дикий вид *L. grandiflorum* занимает особое положение, являясь перспективной культурой в ландшафтном земледелии и потенциальным продуцентом фармакологически ценных природных соединений фенольной природы, обладающих высокой биологической активностью. Известно, что химический синтез вторичных метаболитов, имеющих фармакологическую значимость, достаточно сложно реализуем. В то же время большое внимание уделяется поиску новых методов, способствующих повышению биосинтетической способности культур-продуцентов и в этом направлении широко применимы методы биотехнологии, позволяющие моделировать необходимые условия выращивания *in vitro*. Ряд синтезируемых растениями вторичных метаболитов является результатом ответа последних на действие различных агроэкологических стрессоров, поэтому при дальнейшем культивировании отобранных для выращивания в лабораторных условиях дикорастущих видов происходит снижение их биосинтетической способности. В этой связи использование элиситоров способствует стимуляции биосинтеза вторичных веществ. Известно также, что элиситоры способны выступать триггерами экспрессии ключевых генов, ответственных за повышение активности клеток на биохимическом и молекулярном уровне. Так, сведения о влиянии на способность накопления дикими видами льна соединений фенольной природы фрагментарны, однако, расширение области использования данной культуры как декоративной и фармакологически ценной требует изучения этого аспекта. Объектом исследования являлись каллусные культуры, полученные из сегментов гипокотилей 14-дневных проростков дикого вида льна крупноцветкового *L. grandiflorum*. Для получения первичной и пересадочной каллусной ткани использовали модифицированную питательную среду Гамборга, содержащую 2% сахарозы и гормон ауксин (дихлорфеноксиуксусную кислоту - 2,4-Д) в концентрации 2 мг/л для индуцирования каллусогенеза. Каллусные культуры культивировали на питательной среде Гамборга при 16-час. фотопериоде в течение 30 дней. При изучении действия элиситора дрожжевой экстракт добавляли к основной питательной среде в концентрации 200 и 500 мг/л в начале пассажа. Длительность пассажа составляла 30 дней. Каллусные культуры анализировали после кратковременного (24 часа) и длительного (7 суток) действия элиситора, учитывая их морфофизиологические характеристики. Фенольные соединения извлекали 96%-ным этанолом из замороженного жидким азотом и измельченного растительного материала в течение 45 мин при +45°C. Гомогенаты центрифугировали (13000 об/мин, 15 мин) и надосадочную жидкость использовали для спектрофотометрического определения суммарного содержания растворимых фенольных соединений при 725нм. Калибровочную кривую строили по рутину. Морфофизиологические показатели каллусной культуры, выращенной на основной питательной среде, следует охарактеризовать преимущественно желтым цветом с выраженными светло-зелеными участками, рыхлой структурой и высокой оводненностью в течение всего пассажа. Применение элиситора приводило к изменениям морфофизиологических характеристик культуры и имело концентрационно-зависимый эффект как при краткосрочном, так и при длительном воздействии дрожжевого экстракта. Так, при действии более низкой концентрации элиситора отмечалось увеличение количества светло-зеленых пигментированных участков относительно контроля, тогда как более высокая концентрация не приводила к подобным изменениям цвета каллусной ткани. Длительность действия элиситации в данном случае не влияла на анализируемые показатели. Известно, что действие элиситоров способствует накоплению фенольных соединений в растениях. Как известно, элиситация может быть оптимальным решением в вопросе получения вторичных метаболитов в культуре растений *in vitro*, а в определенных концентрациях элиситоры индуцируют или повышают у растений способность к биосинтезу вторичных метаболитов, вызывая морфологический или физиологический «отклик». Данные проведенных исследований позволили установить, что уровень содержания вторичных метаболитов в контроле на основной питательной среде почти на 30% выше при длительном воздействии элиситора, чем при кратковременном. Что касается концентрационного эффекта, то в большей степени он проявлялся при действии высокой концентрации как при кратковременном, так и при длительном воздействии элиситации. При кратковременном воздействии элиситора увеличение содержания фенольных соединений происходило только при действии высокой концентрации и составляло 200% относительно контроля, тогда как при длительном воздействии способность к накоплению вторичных метаболитов увеличивалась на 40 и 84% соответственно возрастающим концентрациям. Таким образом, установлено, что элиситация *Linum grandiflorum* приводила к изменениям морфофизиологических характеристик каллусных клеток, а также к увеличению их способности к накоплению фенольных соединений. Данный процесс зависел от длительности действия элиситора и его концентрации.

Отработка промышленной биотехнологии получения целевых стероидных гликозидов с высокой биологической активностью на основе культур клеток *Dioscorea deltoidea* Wall.

Титова М.В. , Кочкин Д.В.* **, Иванов И.М.* , Ключин А.Г.* ,
Шумило Н.А.* , Сарвин Б.А.* **, Носов А.М.* ***

* Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, 127276.

** Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234.

*** Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119234.
titomirez@mail.ru

Для суспензионной культуры клеток диоскореи дельтовидной (мутантный штамм-сверхпродуцент фураностаноловых гликозидов ИФР-ДМ-05-03) была отработана технология масштабирования длительного непрерывного аппаратного выращивания в режиме полупотока.

Проводили культивирование штамма отъемно-доливым способом в барботажных биореакторах с рабочим объемом 20, 75 и 630 л. Для выращивания использовали питательные среды с минеральной основой по Мурасиге и Скугу (Murashige, Skoog, 1962), в соответствии с коллекционным паспортом.

Для каждого типа биореактора было осуществлено несколько циклов длительного непрерывного выращивания различной продолжительностью и с различным количеством циклов субкультивирования. Расход воздуха на барботаж был оптимизирован по отсутствию седиментации клеток и клеточных агрегатов и составлял 0,1-1,0 л/л/мин в зависимости от фазы ростового цикла. Концентрацию растворенного кислорода pO_2 поддерживали на уровне 10-40% от насыщения при отсутствии интенсивного пенообразования. Для уменьшения отрицательного воздействия перемешивания, на начальных фазах роста культуры устанавливали минимальную скорость воздушного потока по отсутствию седиментации клеток (степень повреждения определяли микроскопически). Температуру суспензии поддерживали на уровне $26,0 \pm 0,5^\circ C$. Для сравнения использовали стандартное периодическое выращивание в колбах на качалке.

Пробы для проведения химического анализа на содержание спиростаноловых и фураностаноловых гликозидов отбирали в середине экспоненциальной фазы роста и в начале фазы стационара в конце каждого цикла субкультивирования (в момент слива суспензии-долива среды при максимальном уровне накопления клеточной биомассы по сухому весу). Количественный ВЭЖХ-МС анализ спиростаноловых и фураностаноловых гликозидов проводили по методикам, опубликованным ранее (Boris Sarvin et al., 2018; Kochkin et al., 2016).

Динамика роста штамма во всех системах не отличалась от результатов, полученных ранее для других штаммов культуры клеток *D. deltoidea*. Максимальное накопление сухой биомассы клеток на 14-18 сутки выращивания достигало в среднем 7,5-13,0 г/л, жизнеспособность не опускалась ниже 75%. Для всех вариантов было выявлено присутствие характерных для этого штамма (Khandy et al., 2016; Kochkin et al., 2016) целевых биологически активных веществ изопреноидной природы - фураностаноловых гликозидов, их общее содержание варьировало в пределах 3-7% от сухой массы клеток в зависимости от системы выращивания. Среди изомеров индивидуальных фураностаноловых гликозидов, максимальное накопление наблюдали для R-протодиосцина. Также было выявлено присутствие в клеточной биомассе спиростаноловых гликозидов, в т.ч. диосцина, причем их содержание возрастало на поздних сроках выращивания (стационарная фаза) – до 0,1 % от сухой массы клеток. В соответствии с отработанной методикой, процессы культивирования при постоянном контроле технологических параметров повторяли многократно, таким образом продемонстрированы стабильность и воспроизводимость физиологических показателей используемого штамма. Показано, что по сравнению с классическим методом периодического культивирования в биореакторах, общая продуктивность процесса культивирования в режиме полупотока повышается в среднем на 15-20% за счет отсутствия лаг фазы и времени, необходимого на подготовку и перезагрузку оборудования.

Исследования выполнены при поддержке Мегагранта Министерства науки и высшего образования РФ, договор № 075-15-2019-1882, на базе «Научно-производственного биотехнологического комплекса для проведения работ по изучению, сохранению и практическому применению культивируемых клеток и органов высших растений и микроводорослей». Все работы были проведены с использованием оборудования Уникальных научных установок «Опытный биотехнологический комплекс» и «Всероссийская коллекция культур клеток высших растений» ИФР РАН (УНУ ОБК ИФР РАН и УНУ ВРККК ВР ИФР РАН).

Перспективы биотехнологии производства биотоплива на основе фототрофных микроорганизмов в Казахстане

Заядан Б.К. *, Лось Д.А. **, Аллавердиев С.И. **, Синетова М.А. **, Садвакасова А.К. *,
Болатхан К. *, Балуч Х. *, Сарсекеева Ф.К. *

* Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан.

**Институт физиологии растений имени Тимирязова РАН, Москва, РФ.

zbolatkhan@gmail.com

В последнее время весь мир сталкивается с двумя основными проблемами: нехваткой пресной воды и энергетическим кризисом. Фототрофные микроорганизмы являются перспективным объектом для производства биотоплива главным образом из-за высокой скорости размножения, высокой фотосинтетической способности и низких требований к источникам питания. Культивирование цианобактерий на сточных водах может стать перспективным подходом для производства биотоплива. Эта интеграция является экономически выгодной и экологически чистой технологией для устойчивого производства биотоплива на основе микроводорослей и цианобактерий, поскольку огромное количество воды и питательных веществ в ней могут быть вторично использованы ими для роста. В связи с этим, фототрофные микроорганизмы имеют двойное применение - производство биомассы для устойчивого производства биотоплива и биоремедиация сточных вод.

Цель данной работы – получение и совершенствование активных штаммов фототрофных микроорганизмов - продуцентов липидов, с оптимизацией условий их массового культивирования для дальнейшего получения на их основе жидкого биодизельного топлива.

Выделение аксеничных культур микроводорослей, их культивирование и хранение осуществляли по стандартным альгологическим методам. Экстракцию липидов из предобработанной биомассы осуществляли по методу Фольча. Определение суммарных липидов проводили калориметрически по методу Агатовой Л. И. Полученные метиловые эфиры жирных кислот анализировали при помощи газо-жидкостного хроматографа масс-спектрометрическим детектором Agilent 5975S.

С целью определения потенциальных продуцентов биодизельного топлива были исследованы коллекционные штаммы цианобактерий и микроводорослей, основу которых составляют штаммы, выделенные из Большого Алматинского озера, озера **Балхаш**, Алаколь и из горячих источников Алматинской области Республики Казахстан в период с 2017 по 2020 годы, а также различные мутантные штаммы микроводорослей, полученные методами индуцированного мутагенеза. Новые выделенные штаммы микроводорослей идентифицированы как *Parachlorella kessleri* K-6, *Chlorella sorokiniana*, *Monoraphidium* sp. ZBD-06, *Dunaliella salina*- B-1, *Parachlorella kessleri*-BZB, *Chlorella vulgari* K-5, *Chlamydomonas* sp., *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* C-2 и др.

Из зеленых микроводорослей, большой интерес представляют мутантные штаммы *Chlorella pyrenoidosa* C-2m1 и *Chlorella pyrenoidosa* C-2m2, полученные на основе коллекционного штамма *Chlorella pyrenoidosa* C-2 методами мутагенеза и селекции и характеризующиеся высокой продуктивностью и накоплением липидов.

Среди исследованных цианобактерий, коллекционные штаммы *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, *Cyanobacterium aponium* IPPAS B-1201 и штамм, выделенный из рисовых полей провинции Баглан, Афганистан *Anabaena variabilis* R-I-5 обладают наиболее высокими показателями по скорости роста, флуоресценции, выходу биомассы и суммарному количеству липидов. Среди них, штамм одноклеточной цианобактерии *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 депонирован не только в «Республиканской Коллекции микроорганизмов» Комитета науки Министерства образования и науки РК, а также в Коллекции микроводорослей Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской Академии Наук под регистрационным номером IPPAS B-1200. Получен патент Республики Казахстан на полезную модель «Штамм *Cyanobacterium* sp. IPPAS-1200 в качестве сырья для производства биотоплива».

С целью оптимизации условий массового культивирования штаммов-продуцентов липидов *Cyanobacterium* sp. IPPAS-1200, *Cyanobacterium aponium* IPPAS B-1201, была проведена серия экспериментов по выращиванию данных культур на сточной воде из водоканала после биологической очистки. Полученные результаты свидетельствуют о высоком ремедиационном потенциале у исследованных штаммов цианобактерий. Так, установлено, что после выращивания культур цианобактерий на сточной воде, удалось понизить концентрацию органических загрязнений и физико-химических показателей в среднем на 94,3%. При этом максимальный показатель очистки исследуемой сточной воды составил 98%. Анализ жирнокислотного состава, полученной таким образом биомассы показал, что коллекционные штаммы *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 и *Cyanobacterium aponium* IPPAS B-1201 характеризовались высокой продуктивностью по накоплению жирных кислот, данные показатели составили 59,9 мг и 45,8 мг на 1 г сухого веса соответственно.

Полученные результаты позволяют рекомендовать штаммы *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 и *Cyanobacterium aponium* IPPAS B-1201 как в биоремедиации коммунально-бытовых сточных вод, так и для получения биомассы для производства биодизельного топлива.

Ключевые слова: Биодизель, продуцентов-липиды, жирнокислотных состав, идентификации биоремедиации сточных вод, производства биодизеля, штаммы микроводорослей и цианобактерии.

Получение *in vitro* культур *Rhodiola quadrifida* как источника биологически активных веществ

Малунова М.В., Саламайкина С.А., Соловьева А.И., Степанова А.Ю.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
mmalunova@yandex.ru

Родиола четырехраздельная (родиола холодная, красная щетка) (*Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch.) – редкое лекарственное растение. Ареал произрастания *R. quadrifida* ограничен высокогорьями Алтая, Монголии, Китая. Экстракты, приготовленные из корневищ данного вида, используются в традиционной китайской медицине в качестве кровоостанавливающего, противокашлевого, тонизирующего средства, в лечении гинекологических заболеваний. В природе данный вид размножается как вегетативным, так и генеративным путем. Однако семенная продуктивность и выживаемость молодых растений *R. quadrifida* невелики. В настоящее время, в связи с узкой приспособленностью к специфическим условиям обитания, *R. quadrifida* отнесена к малоперспективным для интродукции видам. Потому, для сохранения природных популяций данного вида необходимо найти альтернативные способы получения растительного сырья для нужд традиционной медицины и фармакологии. Решением данной проблемы является использование методов биотехнологии. Цель данного исследования состояла в получении культур hairy roots и каллусов *R. quadrifida*, анализ их ростовых характеристик, определение и сопоставление уровня содержания основных физиологически активных вторичных метаболитов – салидрозида и розавина. Культуру hairy roots получали с помощью инкубации семядолей и гипокотилей в суспензии *Agrobacterium rhizogenes* (штамм А4). Появление первичных корней наблюдали на 14–28 сут после трансформации. После двух пассажей на агаризованной среде МС полученные корни помещали в жидкую питательную среду того же состава. Каллусы получали из корней, стабильно растущих в течение 12 месяцев. Для этого корни помещали на среду МС с добавлением 3 мг/л 2,4-D и 0,5 мг/л БАП. Полученная культура корней *R. quadrifida* проявляла отрицательный геотропизм характерный для hairy roots и росла весьма интенсивно. Кривая роста имела S-образную форму, включала все стандартные фазы роста, индекс роста в конце цикла культивирования составлял 8,3. Каллусы, иницированные из hairy roots, росли менее интенсивно, их индекс роста в конце цикла культивирования составлял 4,8. С помощью ПЦР-анализа с праймерами к онкогенам агробактерии (*rolB* и *rolC*) было показано, что полученные культуры имели ПЦР-фрагменты ожидаемой длины. Это свидетельствует о трансгенной природе полученных hairy roots и иницированных из них каллусов. Далее с помощью HPLC/MS было подтверждено наличие основных вторичных метаболитов *R. quadrifida* – салидрозида и розавина в каллусах, и только салидрозида в hairy roots. Содержание салидрозида в каллусной культуре было значительно выше, чем в hairy roots и составляло 0,158 и 0,047% сухого веса, соответственно. Содержание розавина в каллусах составило 0,07%. Поскольку содержание розавина и салидрозида в каллусной культуре близко к уровню содержания данных веществ в корневищах растений *R. quadrifida*, растущих в естественных условиях, это делает данную культуру перспективной с точки зрения возможности ее биотехнологического использования.

**Получение и характеристика каллусных и суспензионных культур клеток *Alcea kusjariensis* (Ијин ex Grossh.)
Ијин — лекарственного эндемика Кавказского региона**

Титова М.В.^{*}, Носов А.В.^{*}, Фоменков А.А.^{*}, Кочкин Д.В.^{*,},
Куличенко И.Е.^{*}, Попова Е.В.^{*}, Носов А.М.^{*,**}**

^{*} Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, 127276;

^{**} Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234.
titomirez@mail.ru

Род *Alcea* L. насчитывает около 80 видов, многие из которых обладают широким спектром биологической активности, в том числе антиоксидантным и антимикробным действием. *Alcea kusjariensis* (Ијин ex Grossh.) Ијин, или шток-роза кусаринская, — эндемик Кавказского региона и занесен в Красную книгу Азербайджана. Надземные части и корни *A. kusjariensis* в основном содержат биологически активные полисахариды. Есть данные по применению корней *A. kusjariensis* в качестве противоопухолевого средства. Показано, что полисахариды шток-розы кусаринской усиливают резистентность организма к опухолевому росту, повышают иммунные свойства, стимулируют образование цитолитических Т-тромбоцитов. Также описано благотворное действие экстракта шток-розы кусаринской при легочных заболеваниях. Однако до сих пор не проводилось детального химического анализа и определения биологической активности растений данного вида, чему частично препятствует ограниченность ресурсов данного растения в регионах произрастания и его статус «краснокнижного» эндемика. В данном исследовании была поставлена задача получения культур клеток *A. kusjariensis* в качестве потенциального альтернативного источника БАВ характерных для данного растения. Зрелые семена *A. kusjariensis* стерилизовали и проращивали на питательной среде с минеральной основой по Шенку-Хильдебрандту (SH) с добавлением 0.5% сахарозы, 0.7% агара, 0.1 г/л мезоинозита, 5 мг/л тиамин, 0.5 мг/л пиридоксина и 5 мг/л никотиновой кислоты. Для получения культур клеток использовали экспланты из семядоли и настоящих листьев, которые помещали на среду того же состава с добавлением 1 мг/л 2,4-Д и 0.1 мг/л кинетин. По результатам экспериментов были отобраны 2 стабильно растущие в темноте каллусные линии с циклом культивирования 30 сут и индексом роста по сухой биомассе 9–11. Данные каллусные культуры использовали для получения первичных суспензий, для которых определяли основные ростовые характеристики. Для всех линий было характерно наличие лаг-фазы по сухому и сырому весу продолжительностью 3–5 сут; начало фазы стационара наблюдалась примерно на 14–18 сут культивирования, фаза деградации — на 21 сут. На протяжении культивирования для всех суспензий было характерно увеличение размера клеток и отношения сырого веса к сухому, связанное с увеличением вакуолей в процессе старения. Жизнеспособность клеток сохранялась на уровне 74–85%. Для всех линий максимальное накопление сухой биомассы не опускалось ниже 6.5 г/л, удельная скорость роста варьировала в пределах 0.13–0.22 сут⁻¹. Таким образом, впервые получены стабильно растущие каллусные и суспензионные культуры лекарственного растения *A. kusjariensis*. В данный момент проводится их скрининг на наличие БАВ.

Исследования выполнены при поддержке РФФИ, договор № 18-54-06021 (Аз_а). Все работы были проведены на базе «Научно-производственного биотехнологического комплекса для проведения работ по изучению, сохранению и практическому применению культивируемых клеток и органов высших растений и микроводорослей» с использованием оборудования Уникальных научных установок «Опытный биотехнологический комплекс» и «Всероссийская коллекция культур клеток высших растений» ИФР РАН (УНУ ОБК ИФР РАН и УНУ ВРККК ВР ИФР РАН).

Получение и характеристика каллусных культур клеток *Alhagi persarum*
Boiss. et Buhse — продуцентов изофлавоноидов

Титова М.В.* , Кочкин Д.В.* **, Соболюкова Г.И.* , Фоменков А.А.* , Сидоров Р.А.* , Носов А.М.* **

* Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва, 127276.

** Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234.
titomirez@mail.ru

Исследовали интенсивность каллусогенеза на эксплантах из различных органов интактного растения и стерильных проростков верблюжьей колючки *Alhagi persarum* Boiss et Buhse, широко используемого в народной медицине вида пустынных областей Средней Азии, Западной Сибири, Казахстана. Наиболее интенсивный каллусогенез (практически 100% вне зависимости от состава используемой питательной среды) происходил на эксплантах, полученных из органов стерильных проростков. При использовании в качестве исходного материала интактных растений, каллусогенез не превышал 30%. Полученные линии каллусных культур клеток отличались по морфологии и интенсивности роста. Как правило, полученные культуры характеризовались плотной консистенцией и низкой степенью оводненности клеток. За полтора года культивирования рост всех исследуемых линий улучшился в 1.1–1.5 раза, что свидетельствует о характерном для клеток растений *in vitro* отборе по пролиферативной активности. Для наиболее стабильной по физиологическим показателям линии Ap1-207 с был проведен анализ количества и состава жирных кислот (ЖК) суммарных липидов и вторичных метаболитов. Было идентифицировано 19 индивидуальных С12-С24 ЖК, основную долю из которых (более 90%) составляли пальмитиновая, стеариновая, линолевая и α -линоленовая кислоты; суммарное содержание минорных ЖК не превышало 2%. Доминирование в составе суммарных липидов насыщенных ЖК (более 45%) на фоне высокого содержания ненасыщенной α -линоленовой кислоты (около 33%), возможно, связано с адаптацией клеток к условиям выращивания *in vitro*. Анализ образуемых вторичных метаболитов был проведен с помощью УЭЖХ ЭР МС. Установлено наличие соединений, относящихся к различным структурным группам изофлавонов. Были обнаружены агликоны (каликозин, формонетин, изомер афрормозина), гликозиды (гликозид формонетина), а также эфиры гликозидов (малонилгликозиды каликозина, формонетина, изомера афрормозина, глицистеина и генистеина). Обнаруженные вторичные метаболиты широко распространены среди растений семейства Fabaceae, однако у представителей рода *Alhagi spp.* изофлавоны встречаются сравнительно редко. Информации о наличии малонилированных гликозидов изофлавонов у растений *Alhagi spp.* в доступной литературе не обнаружено. Полученные результаты согласуются с разрабатываемым в наших работах с культурами клеток других видов положением о специфике вторичного метаболизма в клетках высших растений *in vitro*.

Исследования выполнены при поддержке РФФИ, договор № 18-54-06021 (Аз_а). Работы по получению культур клеток и анализу ростовых характеристик выполнены на базе «Научно-производственного биотехнологического комплекса для проведения работ по изучению, сохранению и практическому применению культивируемых клеток и органов высших растений и микроводорослей» с использованием оборудования Уникальных научных установок «Опытный биотехнологический комплекс» и «Всероссийская коллекция культур клеток высших растений» ИФР РАН (УНУ ОБК ИФР РАН и УНУ ВРККК ВР ИФР РАН).

Получение низкоагрегированной суспензионной культуры голубики щитковой с высоким уровнем накопления фенольных соединений

Брилкина А.А., Рыбин Д.А., Ветрова Я.А., Березина Е.В.

Нижегородский государственный университет им Н.И. Лобачевского. Гагарина пр., 23, Нижний Новгород, Россия.
annbril@mail.ru

Голубика щитковая *Vaccinium corymbosum* L. относится к семейству Вересковые (*Ericaceae* Juss.) и, как и другие представители семейства, характеризуется повышенной способностью к синтезу фенольных соединений, в первую очередь флавоноидов и проантоцианидинов. Данные вторичные метаболиты обладают значительной антиоксидантной активностью, что обуславливает высокую хозяйственную ценность голубики. Получение фенольных соединений из растений ограничено сезонностью их развития, а также медленным приростом биомассы, характерным для вересковых. В связи с этим удобным способом получения фенольных соединений являются суспензионные культуры клеток.

Целью работы являлось получение суспензионной культуры клеток *V. corymbosum* и анализ ее способности к накоплению фенольных соединений.

Суспензионные культуры *V. corymbosum* были получены из листовых каллусов, индуцированных из стерильных растений, размножаемых *in vitro*. Для выращивания суспензионных культур использовали питательную среду WPM с фитогормонами 2,4-Д и БАП (0,5 мг/л). Для снижения степени агрегации клеток в культуре использовали также модификации питательной среды: с добавлением пектиназы или целлюлазы и со снижением концентрации кальция. Выращивание культур проводили на свету на орбитальных шейкерах с радиусом вращения 1 и 2 см (скорость вращения 120 об/мин) в течение 16-30 дней. Клетки достигали стационарной фазы роста через 16-18 дней после пересадки. По окончании цикла культивирования проводили анализ ростовых параметров и жизнеспособности клеток и определение уровня фенольных соединений (растворимых фенольных соединений, катехинов и проантоцианидинов).

Суспензионные культуры клеток голубики щитковой, выращиваемые на шейкерах с различными радиусами вращения, отличались как в морфологически, так и по степени накопления фенольных соединений. Суспензионные клетки, выращиваемые на шейкере с радиусом вращения 1 см, имели более округлую форму и размер 40-90 мкм. Клетки голубики щитковой культивируемые на шейкере с радиусом вращения 2 см имели более вытянутую форму и размер 50-110 мкм. При использовании немодифицированной среды WPM в суспензионной культуре голубики наблюдалась значительная агрегация клеток. Добавление в питательную среду пектиназы значительно снизило степень агрегации в суспензиях, культивируемых на шейкерах обоих вариантов. Кроме того, в присутствии пектиназы и целлюлазы возросло интенсивность роста клеток и их сухая биомасса.

Содержание фенольных соединений в клетках также зависело от радиуса вращения шейкера. Накопление фенольных соединений клетками голубики щитковой лучше происходило в случае использования шейкера с радиусом вращения 2 см. Скорее всего причинами подобного эффекта является лучшее перемешивание суспензии клеток и соответственно лучшая доступность питательных веществ. Либо клетки испытывают большее механическое воздействие и защищают себя за счет фенольных соединений. Добавление пектиназы и целлюлазы положительно сказалось и на накоплении катехинов и проантоцианидинов. В присутствии данных ферментов в питательной среде клетки голубики накапливали фенольные соединения в 2,5-3 раза интенсивнее. Содержание катехинов и проантоцианидинов в суспензионных культурах голубики не уступает их содержанию в листьях растений открытого грунта, выявленное нами ранее.

Таким образом, выращивание суспензионных культур *V. corymbosum* для получения фенольных соединений целесообразно в присутствии пектиназы или целлюлазы на орбитальных шейкерах с радиусом вращения 2 см.

Полученная суспензионная культура клеток голубики щитковой может являться перспективным источником ценных биологически активных фенольных соединений.

Получение фотосинтезирующих hairy roots водяного ореха *Trapa natans* L. методами агробактериальной трансформации и биобаллистики

Михайлова Е.В.* , Артюхин А.Е.* , Мусин Х.Г.* , Гумерова Г.Р.* , Хисматов Т.Р. , Кулуев Б.Р.***

* Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Проспект октября 71, Уфа, Россия.

** Уфимский государственный нефтяной технический университет, ул. Космонавтов 1, Уфа, Россия.
mikhele@list.ru

Водяной орех *Trapa natans* L. – однолетнее водное растение семейства Дербенниковые (*Lythraceae*), широко распространенное на юге Евразии, в Африке, Северной Америке и Австралии. В России оно находится под угрозой вымирания. Уникальным свойством водяного ореха, которое может найти практическое применение, является способность его корней к фотосинтезу. Одной из проблем *in vitro* культур является подверженность богатых питательных сред контаминации, а при коммерческом культивировании — еще и высокая стоимость таких сред.

Hairy roots — уникальные корни, индуцируемые почвенной бактерией *Agrobacterium rhizogenes*, способные к неограниченному росту, благодаря чему они используются в качестве биофабрик по производству биологически активных веществ. Для поддержания культур таких корней обычно используются среды с как минимум в 2 раза более высоким содержанием сахарозы, чем требуется для культур интактных растений. Получение фотосинтезирующих hairy roots позволило бы выращивать их на бедных питательных средах.

Попытки трансформации водяного ореха никогда ранее не предпринимались. Стерильные интактные растения, пророщенные из эмбрионов, были инфицированы *A. rhizogenes* штаммов 15834, K599 и A4. Первый оказался наиболее эффективным, тогда как с использованием последнего корни не появлялись.

Для биобаллистической трансформации был изолирован с помощью LongAmp Taq ДНК-полимеразы (NEB) линейный ампликон, содержащий гены *rolA*, *rolB* и *rolC* и *rolD* из штамма K599. Следует отметить, что показавший себя успешным штамм 15834, по всей видимости, генетически отличается от штаммов A4 и K599, поскольку праймеры, подобранные к участку ДНК, содержащему *rol* гены, на основе данных полногеномного секвенирования *A. rhizogenes*, имеющихся в базе данных NCBI, не отжигались на ДНК штамма 15834. Эффективность биобаллистической трансформации была сравнима с эффективностью штамма K599: корни образовывались у 1 из 6 трансформированных растений.

И в том, и в другом случае корни образовывались в стерильной дистиллированной воде без содержания сахарозы.

Если при агробактериальной трансформации корни возникали только в узлах листьев, то при биобаллистической — только в эмбриональной ткани. Если при агробактериальной трансформации часть образующихся корней была бесцветной для невооруженного взгляда, то при биобаллистике получали только насыщенно-зеленые корни. Сравнение микроскопических изображений нормальных зеленых и коричневых корней и листьев водяного ореха, а также полученных hairy roots, показал, что в клетках как зеленых, так и бесцветных индуцированных корней содержатся хлоропласты в большем количестве, чем в клетках листьев. Также у нормальных корней и у индуцированных отличалась форма клеток. Если у первых клетки были вытянутыми, то у вторых они больше напоминали клетки пролиферативных тканей, что является одним из признаков истинных hairy roots, которые обладают способностью к неограниченному росту.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-74-00056).

Проблемы многолетнего круглогодичного культивирования *in vitro* земляники садовой

Корнацкий С.А.

Российский университет дружбы народов, 6, Миклухо-Маклая ул., Москва, Россия.
vitrolab@rambler

Метод *in vitro* достаточно давно и успешно используется в практике растениеводства для размножения большого числа видов растений, включая землянику. В отношении земляники, потребность в таком подходе возникла, прежде всего, потому, что традиционные схемы размножения культуры наземными вегетативными органами ведут к массовому распространению ряда опасных патогенов – земляничного клеща, нескольких видов нематод, а также фитопатогенных вирусов. Непрерывное культивирование растительного материала в течение календарного года позволяет стабилизировать пролиферирующие культуры, решить проблемы латентной контаминации, накопить определенное количество растений для решения практических задач.

Однако, несмотря на большой научный опыт и многообразие информации в вопросах клонального микроразмножения земляники, по-прежнему остается ряд проблем, снижающих эффективность метода.

К наиболее очевидным проблемам при массовом микроразмножении земляники можно отнести витрификацию стерильных культур, без решения которой сложно прогнозировать конечный результат и эффективность работ. Неоднократно этот вопрос разносторонне изучался в отношении ряда культур, но окончательного решения найдено не было. Нами была установлена определенная закономерность повышения степени витрификации с увеличением начального значения рН питательной среды до автоклавирования, длительности пассажа и температуры воздуха в помещении, где происходило культивирование, особенно у сортов земляники склонных к витрификации. Так, например, для наиболее подверженного витрификации сорта земляники Кимберли оптимальными оказались следующие условия культивирования: стартовая рН среды – 5,6, длительность пассажа – 3 недели, температура культивирования +18... +20°C. При иных комбинациях факторов наблюдали прогрессивное увеличение числа витрифицированных культур в общем объеме материала. Положительным для снижения числа таких культур было использование при укупорке пробирок поливинилхлоридной пленки взамен полиэтиленовой. В этом случае длительность пассажа могла быть продлена до 4 недель с соответствующим повышением коэффициента размножения до 1:6-8 вместо 1:3-4. Другие изучаемые сорта Азия и Флоренс успешно развивались при температуре +22...+24°C в течение 4 недель. Кроме того, на данном этапе очень важен систематический мониторинг культур по фитосанитарному состоянию. В нашем эксперименте, начатом в 2015 году, в каждом пассаже проводилась жесткая выбраковка культур с малейшими признаками бактериальной контаминации по визуальной оценке, а также удаление витрифицированного материала.

Критической стадией в микроразмножении земляники, особенно некоторых сортов, являлась элонгация. В то время как у сортов Азия, Флоренс в течение 1 мес. формировалось от 8 до 20 микророзеток высотой 3-5 см из расчета на 1 культивационный сосуд (колба 100 мл), то у конгломератов сортов Кимберли, к концу этого периода в большинстве случаев отмечались признаки сильной витрификации. Лишь единичные полноценные микророзетки успели образоваться к тому моменту, когда ресурс питательной среды был исчерпан. Превышение оптимальной длительности пассажа приводило в последующие 2 недели к отмиранию эксплантов из-за интоксикации продуктами жизнедеятельности. Вместе с тем, было отмечено, что данный негативный результат существенно нивелировался, когда культивационные сосуды (колбы) размещали таким образом, что температура в базальной части конгломератов была на 4-5°C ниже, чем терминальной (своеобразный эффект «холодной полки»). Данная ситуация практически всегда имеет место в стеллажной светокомнате, когда лампы нижнего яруса дополнительно подогревают расположенную выше полку. В нашем случае, учет этого обстоятельства позволил продлить ресурс использования питательной среды до 1,5 мес. и получить в итоге микророзетки требуемого качества у проблемного сорта. Кроме того, дополнительный анализ проблемы привел к предположению о том, что необходимо принимать во внимание и особенности газообмена между внутренним объемом культивационного сосуда и окружающей средой, так как герметичная укупорка полимерной пленкой колб с сортами Кимберли усугубляла витрификацию и дополнительно способствовала гибели культур. Последующая проверка этого предположения позволила решить вопрос регуляции газообмена с помощью замены укупорочного материала на газопроницаемый.

Очень часто в подобных исследованиях много внимания уделяется особенностям корнеобразования микророзеток. Однако по нашим наблюдениям, для успешной приживаемости микрорастений в процессе адаптации к нестерильным условиям, особенно в производственных масштабах, это играет второстепенную роль. На первый план, в этом случае, выходят общие физико-физиологические параметры микрорастений, т.е. конкретные размеры растений, фазы их развития и конкретные условия, в которых непосредственно проводится адаптация. Попытки массовой адаптации микрорастений в искусственных условиях, как правило, очень трудозатратны и малопродуктивны. Недостаточный уровень освещенности для начала полноценного фотосинтеза и стерильный почвенный субстрат, который очень быстро заселяется в этот период патогенной микрофлорой, губительной для микрорастений, являются основными проблемами на стадии адаптации.

Разработка протокола создания гаплоидных форм *Beta vulgaris* L.

Колесникова Е.О., Бердников Р.В.

ООО «СоюзСемСвекла». Рамонь, Воронежская обл., Россия.
kolesnikovaeo@souzssemsvekla.ru

Существенный практический и теоретический интерес для селекции *Beta vulgaris* L. имеет внедрение в процесс создания новых гибридов клеточных, а также молекулярногенетических подходов. Биотехнологические приемы могут использоваться при оплодотворении растений *in vitro*, получении гибридных зародышей, создании новых форм, обладающих продуктивностью и определенной устойчивостью. Так на основе гаплоидии возможно создание генетически стабильных линий в течение 2 генераций. Это имеет преимущества перед классическими селекционными подходами, поскольку одноэтапное получение гомозигот позволяет быстро фиксировать морфофизиологические параметры адаптивности, сокращать сроки создания гибридов, отвечающих требованиям современного рынка. По данным ряда исследователей, использование материала с одинарным набором хромосом позволяет сократить селекционный процесс на четыре поколения. Гаплоиды можно применять также для стабилизации числа хромосом межвидовых гибридов, получения стрессоустойчивых форм с применением диких видов, получения линий-восстановителей ЦМС и т.д. В связи с вышеизложенным повышение эффективности индукции гаплоидов у *Beta vulgaris* L. является актуальным. Цель исследований состояла в изучении комплекса параметров, влияющих на процесс создания гаплоидных форм сахарной свеклы для селекционных задач. Исследования показали, что на сегодняшний день получение Н-форм *Beta vulgaris* целесообразно проводить, используя культуру неоплодотворенных семязачтков. При изучении индукционной способности репродуктивных структур 30 генотипов, регенерационный ответ был получен от 20. Причем семяпочки МС-форм, О-типов и многосемянных опылителей образовывали гаплоиды с различной частотой. Это указывало на то, что генотип донорских растений являлся существенным фактором. Следует отметить, что значительное влияние на выход гаплоидов оказывала как предобработка бутонов низкими положительными температурами, так и температурные условия культивирования введенных *in vitro* семязачтков. Минеральный состав питательной среды по прописи Мурасиге-Скуга (MS) позволял получать больше регенерантов по сравнению с составом Гамборга и Эвелега (B5). Существенное значение имело повышенное содержание в среде углеводов и пониженное – агар-агара. Добавление цитокининов (6-БАП) и ауксинов (ИУК, ИМК) в питательную среду вызывало мощную активизацию ростовых процессов. Соотношение гормональных компонентов и их концентрации в питательной среде оказывали лимитирующее влияние на формирование гаплоидных микроклонов у отзывчивых генотипов. Более 50% регенерантов образовывались непосредственно из семязачтков через формирование эмбриоидов, остальные – через стадию каллусогенеза. Анализ пloidности показал, что первом случае более 85% регенерантов имели гаплоидный набор хромосом. У растений, образованных из каллуса, насчитывалось 70% гаплоидов. Регенеранты имели высокие показатели роста, а также обладали склонностью к микроклонированию, что дало возможность сформировать Н-линии *Beta vulgaris* L. *in vitro*. Проведенные исследования позволили выявить основные факторы, влияющие в разной степени на процесс индукции гаплоидов и создать эффективный протокол получения растений сахарной свеклы с одинарным набором хромосом.

**Разработка селективных условий *in vitro* для получения генотипов ячменя
Hordeum vulgare L. с комплексной стрессоустойчивостью**

Шуплецова О.Н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого», Ленина, 166 а, Киров, Россия.
olga.shuplecova@mail.ru

В настоящее время актуально создание генотипов особенно, зерновых культур, устойчивых к комплексу почвенных стрессоров: повышенной кислотности, ионной токсичности металлов и засухе. Эффективным способом повышения генетического разнообразия растений и получения стрессоустойчивых форм является направленная селекция клеточных культур в стрессовых условиях *in vitro* и получение соматклонов. Однако, несмотря на продолжительное время использования соматклональной изменчивости в селекционной практике, сортов на этой основе создано мало. Широкому применению клеточной селекции зерновых культур препятствует низкая их регенерационная способность в селективных условиях *in vitro* и нестабильность проявления целевых признаков у растений-регенерантов. Остаются до конца нерешенными технические трудности при создании селективных сред с тем или иным стрессовым фактором и, особенно, с комплексом стрессовых воздействий различной природы, когда необходимо учитывать мало прогнозируемые эффекты их совмещения. Кроме того, при проведении клеточной селекции приходится учитывать характер формирования устойчивости растений (полигенный/моногоенный) к стрессору, а также биохимические и физиологические ее составляющие на уровне изолированной клетки и на уровне растения-регенеранта.

Нами разработаны селективные системы *in vitro* для создания сортов ярового ячменя *Hordeum vulgare* L., устойчивых к повышенной кислотности почв, токсичности алюминия, тяжелых металлов и засухе. В основу разработки положено культивирование каллуса на селективных средах со стрессорами различной природы и последующей регенерацией растений. Подобраны комбинации селективных агентов, не вызывающих антагонистический эффект при одновременном внесении в селективные среды. Для активизации морфогенеза в питательные среды вносили абсцизовую кислоту, обладающую фиторегуляторным и протекторным воздействием на каллусную ткань в стрессовых условиях. Также предложен способ повышения устойчивости каллусных культур и регенерированных из них растений к эдафическим стрессорам путем инокуляции каллусной ткани метилотрофными бактериями *Methylobacterium sp.*

Практический интерес представляет создание и поиск генотипов с оптимальным сочетанием признаков устойчивости и продуктивности. Но продукционная способность относится к числу признаков, по которым не существует определенного ответа *in vitro*. Поэтому для повышения эффективности клеточной селекции необходима комплексная оценка растений-регенерантов в условиях *in vivo*, также выявление связи между продуктивными признаками регенерантов и применяемыми для их получения условиями отбора в каллусной культуре.

Полученные в разработанных селективных системах *in vitro* растения-регенеранты оценивали на кислых почвенных фонах с алюминием и кадмием, а также в условиях засухи. Сравнительный анализ проводили относительно исходного генотипа и растений-регенерантов, полученных на питательных средах без селективных агентов. Изучали влияние селективных условий отбора *in vitro* на биохимические показатели, тестирующие степень проявления окислительного стресса в сочетании с продуктивными признаками растений-регенерантов ячменя в 1-3 поколениях. Установлено снижение симптомов окислительного стресса, тестируемого по интенсивности перекисного окисления липидов, выходу электролитов и накоплению в листьях антоцианов, у регенерантных форм, прошедших отбор на этапе каллусной ткани в селективных системах с алюминием и водным дефицитом, по сравнению с линиями, регенерированными из каллусов, не подвергнутых селективному воздействию. Растения-регенеранты, полученные в результате клеточной селекции, имели преимущество по содержанию фотосинтетических пигментов в листьях, скорости фотосинтеза (повышался уровень ассимиляции CO₂), эффективности водного обмена в листьях и развитию вегетативных и репродуктивных органов.

Получены регенерантные линии, более адаптированные к почвенной токсичности алюминия и кадмия, по сравнению с исходным генотипом. Устойчивость к металлам, индуцированная у ячменя проведением через культуру изолированной ткани, сопровождалась усилением способности регенерантных линий аккумулировать токсичные металлы, особенно в корнях. Кроме того, выявлена способность регенерантов сочетать устойчивость к абиотическим стрессорам с устойчивостью к гельминтоспориозным болезням.

Таким образом, проведенные исследования подтвердили перспективность использования разработанных нами селективных систем *in vitro* для расширения генетического разнообразия ярового ячменя, а также получения генотипов, устойчивых к комплексу стрессоров различной природы.

**Разработка технологии клонального микроразмножение тополя лавролистного
(*Populus laurifolia* Ledeb.) в культуре *in vitro***

Настинова Г.Э. *, Малаева Е.В. **, Амикова Е.А. *

* Калмыцкий государственный университет им. Б.Б. Городовикова, ул. Пушкина, 11, Элиста, Россия.

** Волгоградский региональный ботанический сад, пос. Metallургов, 68, Волгоград, Россия.
nastinova.ge@yandex.ru

Клонирование наиболее редких и ценных в хозяйственном отношении культурных и дикорастущих видов, создание генетических банков на основе пересадочных культур и криобанков, получение биомассы, как источника ценных биологически активных веществ – все это различные направления биотехнологии, позволяющие сохранить и воспроизвести генофонд растительных ресурсов.

Одним из перспективных видов для интродукции и акклиматизации в Юга России является Тополь лавролистный (*Populus laurifolia* Ledeb.). В Целинном районе Калмыкии, на южном склоне хребта Хамур, в 5 км от поселка Хар-Булук произрастает единичный на Юге России представитель тополя лавролистного (*Populus laurifolia* Ledeb.) Высота тополя 20 м, диаметр около 1,44 м. Прилегающий земельный участок имеет выходы природных ключей с пресными подземными и минеральными водами, имеющими лечебное значение. Объект включён в систему особо охраняемых территорий Постановлением Совета Министров Калмыцкой АССР от 8 октября 1981 года № 473 под названием «Одинокий тополь». Он представляет собой памятник природы регионального значения «Одинокий тополь с каскадом родников». Дерево является победителем конкурса «Российское дерево года 2019» по итогам электронного голосования на сайте Программы rosdrevo.ru и финалистом конкурса «Европейское дерево года 2020» – 3 место. Включен в Национальный реестр старовозрастных деревьев России. Возраст данного тополя оценивается в более 100 лет.

Тополь лавролистный отличается выносливостью. Он неприхотлив к плодородию почв и дефициту влаги, устойчив к неблагоприятным климатическим условиям (высокой и низкой температуре). Ствол украшает множество стеблей, которые покрыты густой листвой. Она ярко-зеленая и обладает ланцетной формой и короткими черешками. Тополь имеет густую эффектную крону, дающую полутень, он хорошо выносит загазованность на улицах города. При правильной высадке саженцев можно создать настоящую «живую» стену. Средняя высота таких плотных эффектных изгородей 150–250 см. Тополь лавролистный может быть очень ценным растением для городов и населенных пунктов Юга России для использования в сфере ландшафтного дизайна – для озеленения садовых участков и парковых зон.

Использование клонального микроразмножение является крайне актуальным для данного ценного генотипа тополя. Целью нашего исследования является разработка технологии клонального микроразмножения тополя лавролистного в культуре *in vitro*. Исходным материалом служили пазушные почки одно-двухлетних побегов тополя лавролистного, взятые в апреле. Методика биотехнологических исследований с культурами изолированных тканей и органов растений основывалась на общепринятых классических приемах работы (Бутенко, 1999), так и методах, разработанных в лаборатории биотехнологии ГБУ ВО «ВРБС».

В качестве стерилизатора использовали различные концентрации Лизоформин® 3000 действующее вещество – глутаровый альдегид, глиоксаль и дидецилдиметиламмоний хлорид). Оптимальный режим стерилизации определяли по жизнеспособности первичных эксплантов и наличию инфекции. Для получения стерильной культуры тополя лавролистного использовали Лизоформин® 3000 в концентрации 5–7%, время экспозиции от 3 до 5 минут.

Для культивирования растений *in vitro* использовали минеральную основу питательных сред MS (Murashige, Skoog, 1962) и WPM (Lloyd, McCown, 1980), с добавлением 20–40 г/л углевода (сахарозы или глюкозы), 100 мг/л мезоинозитола, 6–8 г/л агара. Продолжительность каждого субкультивирования составляла 20–30 дней. На этапе укоренения изучали влияние различных регуляторов роста группы ауксинов: β-индолилуксусная кислота (ИУК), β-индолилмасляная кислота (ИМК) и -нафтилуксусная кислота (НУК) в концентрациях от 1,0 мг/л до 3,0 мг/л. Для получения и поддержания активно пролиферирующей культуры *in vitro* весьма важным является правильный выбор цитокинина. В настоящей работе использовали цитокинины 6-БАП, кинетин, зеатин и 2iP в различных концентрациях (от 0,5 до 3,0 мг/л) и в сочетании с ауксинами. Коэффициент размножения варьировал от 3,0 до 7,0. Максимальные показатели длины корней у тополя лавролистного наблюдали на питательной среде WPM при использовании в качестве ауксина ИУК в концентрации 1,0 мг/л.

Адаптацию растений регенерантов тополя лавролистного проводили в две стадии. В первые две недели поддерживали относительную влажность 75–80%. Это достигалось созданием условий «влажной камеры» с ежедневным кратковременным проветриванием. Температура поддерживалась на уровне не выше 25°C и не ниже 20°C, освещенность – 2500 тыс. люкс. Оптимальными сроками адаптации растений – регенерантов явился период с января по март. Высадка растений в эти сроки позволила получить к маю адаптированные саженцы. В качестве субстрата использовалась смесь торфа, песка и вермикулита в соотношении 1:1:1. Выход адаптированных растений составил 75–90%.

Растительно-бактериальные ассоциации в условиях осмотического стресса *in vitro*

Денисова А.Ю. **, Евсеева Н.В. *, Ткаченко О.В. **, Бурьгин Г.Л. *,
Позднякова Н.Н. *, Матора Л.Ю. *, Щеголев С.Ю. *

* Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, пр. Энтузиастов, 13, Саратов, Россия.

** Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И.Вавилова, Театральная площадь, 1, Саратов, Россия.
alena.denisova1408@yandex.ru

Стресс, вызванный водным дефицитом, является одним из самых разрушительных абиотических факторов, отрицательно влияющих на рост и урожайность культурных растений. Инокуляция растений стимулирующими рост ризобактериями, смягчающими стресс у растений, является рентабельным и экологически безопасным вариантом стратегий борьбы с неблагоприятным эффектом засухи. Предполагаемые механизмы воздействия ризобактерий, повышающие засухоустойчивость растений, включают изменение фитогормонального статуса растений, синтез осмолитов, повышение активности антиоксидантных ферментов. Однако морфологические, физиологические и молекулярные механизмы бактериально-опосредованной стрессоустойчивости растений и функционирование макро- и микроассоциантов в условиях осмотического стресса остаются недостаточно изученными. При этом исследование функционирования растительно-микробных ассоциаций целесообразно проводить в контролируемых условиях *in vitro*, что позволяет исключить непредвиденные воздействия, которые неизбежно присутствуют при выращивании растений в условиях *in vivo*, и делает возможным оценку только целевых факторов в изучаемых системах. Кроме того, в случае бактериальной инокуляции культурных растений все больше внимания уделяется ассоциациям микроорганизмов из разных таксонов, которые могли бы дополнить друг друга и оказать ростстимулирующий и адаптационный эффекты на растения.

Цель работы – исследование влияния бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 и их смешанной культуры на физиолого-морфологические и биохимические параметры микроклонов картофеля в условиях осмотического стресса *in vitro*.

Были использованы микрорастения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Невский из коллекции микроклонов картофеля *in vitro* ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ. В качестве инокулянтов были выбраны 2 штамма бактерий из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН: *A. brasilense* Sp245 (слабосолеустойчивый) и *O. cytisi* IPA7.2 (галотолерантный). Бактерии добавляли в среду Мурасиге-Скуга для выращивания растений в концентрации 10^6 кл/мл. Осмотический стресс создавали путем добавления в среду культивирования полиэтиленгликоля (М.м. 6000) в концентрации 25 г/л, что соответствовало осмотическому давлению в среде выращивания –0,3 МПа. Оценивали физиолого-морфологические параметры растений, содержание малонового диальдегида, активность ферментов пероксидазы и каталазы в листьях на 7-ые сутки действия стресса и на 7-ые сутки репарации. Показано, что использование бактерий улучшало морфологические параметры микроклонов картофеля, достоверно увеличивая длину побега и количество корней. Бактеризация способствовала смягчению действия стресса, что проявлялось в снижении уровня малонового диальдегида в листьях, как продукта перекисного окисления липидов в растительных клетках. Коинокуляция дополнительно приводила к повышению активности пероксидазы и каталазы, что способствовало более быстрому снижению окислительного стресса в растениях. Штамм *O. cytisi* IPA7.2, ранее выделенный нами из ризосферы картофеля, оказывал более значительное протекторное действие на физиолого-биохимические процессы в растениях при стрессе и репарации по сравнению с *A. brasilense* Sp245. Полученные результаты расширяют представление об эффекте коинокуляции растений ризобактериями и антиоксидантной защиты растений в условиях осмотического стресса, а также позволяют рекомендовать использование рассмотренных нами бактерий в составе комбинированных биоудобрений.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 19-016-00116.

Растительные системы экспрессии для получения рекомбинантных белков медицинского назначения

Пермякова Н.В., Маренкова Т.В., Белавин П.А., Загорская А.А., Сидорчук Ю.В.,
Уварова Е.А., Кузнецов В.В., Розов С.М., Дейнеко Е.В.

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», пр-т академика
Лаврентьева, 10, Новосибирск, Россия.
deineko@bionet.nsc.ru

Биопродукция рекомбинантных фармацевтических препаратов в растительных системах экспрессии рассматривается как перспективная альтернатива существующим платформам на основе клеток млекопитающих или бактерий. Культивирование растительных клеток в контролируемых условиях биореакторов обеспечивает продукцию белка высокого качества в соответствии с нормами GMP, а быстрый рост клеток, невысокая стоимость компонентов питательных сред и полное отсутствие риска контаминации вирусами и прионами животного происхождения свидетельствуют о неоспоримом преимуществе растительных экспрессионных систем. Несмотря на успешность использования клеточных культур растений для коммерческого получения фармацевтически ценных белков, в этом направлении остается все еще много нерешенных проблем, наиболее важной среди которых является недостаточно высокий выход рекомбинантного белка. В настоящее время многие крупные мировые фармакологические компании и исследовательские коллективы работают над решением этой проблемы в основном за счет оптимизации генетических конструкций и отбора наиболее «благоприятных» событий при случайном характере интеграций трансгенов в растительный геном, а также за счет особенностей организации хлоропластного генома, где трансген может быть представлен сотнями и тысячами копий. Коллективом исследователей лаборатории биоинженерии растений для наработки рекомбинантных белков в растительных системах экспрессии используются два подхода: доставка целевых генов в ядерный геном с применением методов агробактериальной трансформации, биобаллистики и *floral dip* с дальнейшим получением суспензионных клеточных культур, а также доставка целевых генов в хлоропластный геном и получение транспластомных растений. Предложен принципиально новый подход, направленный на адресное встраивание ДНК с целевым геном в районы ядерного генома, характеризующиеся высокой транскрипционной активностью, например, в районы генов «домашнего хозяйства», с применением методов геномного редактирования в варианте *knock-in*. Данный подход был успешно реализован в проекте РНФ (№17-14-01099), в котором решалась проблема поиска сайтов-мишеней для адресной доставки целевых генов в транскрипционно-активные районы генома клеточной культуры *A.thaliana*. Для отработки отдельных этапов получения рекомбинантных белков в растительных системах экспрессии коллективом исследователей используются модельные системы с применением гена *gfp*, кодирующего зеленый флюоресцирующий белок. На основе клеточных линий *A. thaliana* с геном *gfp* получена серия нокаутных мутаций по репортерному гену с применением метода геномного редактирования CRISP/Cas9. Данный подход успешно используется в работах по улучшению качества рекомбинантных белков, связанного с изменением профиля их гликозилирования по «человеческому» типу. Получена серия моноклональных клеточных линий *A. thaliana* со случайными встройками в геном генов *uidA* и *gfp*, проведен сравнительный анализ выхода рекомбинантного белка с транскрипционной активностью исследуемых генов. Создан геномно-инженерный инструментарий для геномного редактирования *A. thaliana* в варианте *knock-in*, а также оптимизированы некоторые параметры доставки целевого гена в район-мишень. Разработана система проверки эффективности направляющих РНК, изменено расположение гена устойчивости к антибиотику в cassette экспрессии, введены дополнительные фрагменты ДНК (гайды), обеспечивающие вырезание экспрессионной cassette эндонуклеазой Cas9 с образованием линейной ДНК. Оптимизация параметров геномного редактирования в варианте *knock-in* позволила повысить эффективность этого процесса и получить большее число инсерций в целевой район-мишень. Созданы три типа генетических конструкций pInt-dIFN-H3.3 Var1, pInt-dIFN-H3.3 Var2 pInt-dIFN-H3.3 Var3, несущих матрицу для гомологичной рекомбинации, с применением которых методом биобаллистической трансформации получены клеточные линии *A.thaliana* с геном *dIFN*, кодирующим гамма интерферон человека, доставленный в район гистонового гена H3.3 методом геномного редактирования в варианте *knock-in*. Получены моноклональные клеточные линии, несущие в геноме целевой ген *dIFN*, доставленный в район гистонового гена H3.3. Секвенированием фрагментов гена H3.3, прилежащих к фланкам гена *dIFN*, доказана его интеграция в целевой район. Выполнен анализ экспрессии генов *A. thaliana*, окружающих целевой сайт применением метода ПЦР в реальном времени. В моноклональных клеточных линиях с геном *dIFN*, доставленным в район гистонового гена H3.3, проведена оценка накопления целевого белка – гамма интерферона человека методом ИФА. Обсуждаются перспективы доставки целевых генов в районы генов «домашнего хозяйства» методом геномного редактирования по сравнению со случайными встройками инсерций при агробактериальной и биобаллистической трансформации.

Работа поддержана проектом РНФ 21-14-00091 «Использование метода CRISPR/Cas9 для выявления районов генома *Arabidopsis thaliana* с максимально высоким выходом целевого рекомбинантного белка».

Реакция изолированных эксплантов нута на гормональный и минеральный состав среды

Суворова Г.Н., Донская М.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр зернобобовых и крупяных культур», п/о Стрелецкое, ул. Молодежная, 1, 302502 Орел, Россия.
galina@vniizbk.ru

Нут *Cicer arietinum* L. является ценной бобовой культурой популярной во всем мире. В Российской Федерации производство нута увеличилось в несколько раз за последнее десятилетие. В 2018 году в России на площади 819 тыс. га было произведено 620 тыс. т зерна нута. Расширение площадей посевов требует новых сортов с улучшенными характеристиками и новых методов их создания. Методы культуры тканей могут успешно использоваться в сочетании с классической селекцией. Несмотря на имеющиеся протоколы культивирования изолированных тканей нута *in vitro*, не существует эффективного и универсального метода регенерации растений нута. Цель настоящих исследований заключалась в изучении реакции изолированных фрагментов эпикотелей проростков нута на регуляторы роста и минеральный состав среды *in vitro*.

Материалом для исследований служили образцы нута коллекции ВИР: к-1029 (семена черные морщинистые, тип Desi), к-1507 (семена коричневые, гладкие, тип Desi), к-1737 Красноградский 5 (семена желтые, гладкие тип Kabuli). Было изучено 14 вариантов питательных сред, различающихся составом регуляторов роста, минеральной основой и органическими добавками. Скорость роста эксплантов определяли отношением прироста тканевой массы в течение первого пассажа к числу дней культивирования. Считали число сформировавшихся побегов через месяц с начала культивирования. Статистическую обработку данных проводили методом дисперсионного анализа, используя программу Microsoft Excel 2010. В ходе эксперимента были разработаны оптимальные режимы стерилизации для всех типов семян.

Результаты анализа показали существенное влияние фактора генотипа, а также состава регуляторов роста на прирост тканевой массы и на развитие побегов в культуре изолированных фрагментов эпикотелей. Наиболее эффективным для роста было сочетание 6-бензиламинопурина (БАП) с α -нафтилуксусной кислотой (НУК). Следует отметить что на средах, содержащих в качестве ауксина НУК, наряду с морфогенной тканью происходило нарастание каллусной массы. Наибольший отклик на культивирование *in vitro* показал образец к-1507. Темпы роста и число побегов не зависели от концентрации регуляторов роста в изученных пределах в составе среды. Замена минеральной основы среды MS на среду B5 способствовала увеличению числа побегов на экспланте. Влияние типа цитокинина было несущественным в отношении количественных показателей, но на средах с 2iP наблюдалось меньше некротизированных участков чем на средах, содержащих БАП. Максимальная скорость прироста тканевой массы 29,08 мг/сутки отмечена на среде MS с 10 μ M 2iP и 0,5 μ M индолил-3-масляной кислоты. Максимальное число побегов 5,5 на эксплант формировалось на среде с 5 μ M БАП и 0,1 μ M НУК. Органические добавки в виде глутамина или гидролизата казеина не оказывали существенного влияния на формирование и рост морфогенной ткани нута.

Результаты исследований выявили сортовую специфичность эксплантов нута к условиям *in vitro*. Для развития морфогенных тканей нута необходимо присутствие в питательной среде цитокининов наряду с ауксинами. Минеральные основы сред B5 и MS одинаково эффективны в отношении формирования морфогенной ткани, для увеличения выхода побегов может быть использована основа среды B5.

Реакция микроводорослей на недостаток минерального питания при аноксии

Цыганков А.А., Гречаник В.И.

Институт фундаментальных проблем биологии РАН-обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН,
Пушино, Московская обл., Институтская, 2.
tft-00@mail.ru

Совместное действие таких стрессовых факторов как недостаток минерального питания и аноксии хорошо изучено на фотогетеротрофных культурах *Chlamydomonas reinhardtii*. Показано, что при недостатке серы, азота или фосфора культуры последовательно проходят такие стадии адаптации как фаза выделения кислорода, фаза поглощения кислорода, анаэробная фаза, фаза выделения водорода и фаза терминации. При этом начиная со стадии поглощения кислорода активность фотосистем II (ФСII) снижается, причем с наибольшей скоростью это происходит при недостатке серы. Когда скорость фотосинтеза у таких культур становится ниже скорости дыхания содержание кислорода в среде становится равным нулю, происходит перевосстановление пула пластохинонов, резкое возрастание содержания аскорбата, разобщение водоокисляющего комплекса и ФСII с резким падением активности ФСII. Важным отличием фотоавтотрофных и фотогетеротрофных культур является повышенная скорость выделения кислорода и меньшая скорость дыхания. Фотоавтотрофные культуры при недостатке серы способны к выделению водорода, хотя для этого требуется использование специального светового режима (высокая интенсивность света в кислородвыделяющей стадии и низкая в фазе поглощения кислорода). Анализа ФСII с использованием ЛР теста у этих культур, а также у культур, адаптирующихся к недостатку азота, в литературе не встречается.

В данной работе показано, что культуры при полном наборе элементов питания в среде в условиях замены воздуха в газовой фазе на аргон испытывают стресс, проявляющийся в достижении меньшей концентрации хлорофилла в стационарной фазе, и снижении эффективного и теоретического квантового выхода ФСII.

При недостатке серы фотоавтотрофные, как и фотогетеротрофные культуры *C. reinhardtii*, проявляют те же фазы адаптации и аналогичную динамику накопления и расходования крахмала в разных стадиях адаптации к недостатку серы. Как в аэробных, так и в анаэробных условиях недостаток серы приводит к значительному возрастанию флуоресценции на начальном этапе освещения (в точке J на ОЛР кривой), что может свидетельствовать о разобщении водоокисляющего комплекса и ФСII. В отличие от фотогетеротрофных фотоавтотрофные культуры не проявляют скачкообразного снижения эффективного квантового выхода ФСII в момент наступления анаэробноза. При этом наблюдалась фаза выделения водорода, в которой выделялось 132 мл H₂/л культуры.

Фотоавтотрофные культуры *C. reinhardtii* при недостатке азота снижали активность ФСII значительно медленнее, чем при недостатке серы. При этом активность ФСII снижалась в основном за счет повышенного восстановления пула пластохинонов. Повышенного накопления аскорбата не наблюдалось, содержание крахмала возрастало на протяжении всего эксперимента, причем выделения водорода не наблюдалось. ЛР тест не показывал возможности разобщения водоокисляющего комплекса и ФСII. Для выделения водорода оказалось необходимым применить специальный световой режим (170 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ в кислородвыделяющей и 30 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ с начала кислородпоглощающей стадии). В этих условиях культуры выделяли 86 мл H₂/л культуры.

Работа поддержана грантом РФФИ №19-14-00255.

Регуляция продуктивности растений картофеля жасмоновой кислотой

Мухаматдинова Е.А., Данилова Е.Д., Ефимова М.В.

Национальный исследовательский Томский государственный университет, Ленина пр-т. 36, Томск, Россия.
muhamatdinowa.ewg@yandex.ru

В последнее время происходит снижение урожайности многих сельскохозяйственных культур. Одним из способов повышения продуктивности растений является применение фитогормонов. Особое внимание уделяется жасмоновой кислоте (ЖК) и ее конъюгатам, известным под общим названием жасмонаты. Известно, что экзогенное внесение жасмоновой кислоты непосредственно в область корней позволяет прямо воздействовать на процесс клубнеобразования картофеля через стимуляцию растяжения клеток в тканях апекса столонов. Проблема сокращения сроков клубнеобразования и получение оздоровленного (освобожденного от инфекции) семенного материала актуальна на сегодняшний день. Решение данного вопроса позволит, с одной стороны, увеличить продуктивность картофеля, с другой стороны, улучшить качество сырья для пищевой, животноводческой и технической сфер. Экономически выгодным и не требующим длительных временных затрат способом получения оздоровленного семенного материала, является микроклональное размножение растений с последующим культивированием *in vitro*.

Оздоровленные растения-регенеранты картофеля получали из апикальной меристемы и на протяжении 28 суток культивировали *in vitro* на агаризованной половинной питательной среде Мурасиге и Скуга ($\frac{1}{2}$ МС) в присутствии или в отсутствие 10 мкМ ЖК. Корни растений отмывали от агаризованной среды и проводили двухнедельную адаптацию микроклонов к жидкой $\frac{1}{2}$ МС и условиям воздушной среды под люминесцентными лампами L36W/77 Fluora («Osram», Германия) при плотности потока квантов ФАР 100–150 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ в фитотроне с 16-часовым фотопериодом и температурой 20±3°C. Оценивали следующие ростовые показатели – площадь ассимилирующей поверхности, сырую и сухую массу надземных и подземных органов, количество листьев и столонов. Статистическую достоверность данных выявляли с помощью непараметрического критерия Краскела – Уоллиса (Anova by Ranks) с использованием программы Statistica 10.

Нами установлено, что ЖК в концентрации 10 мкМ положительно влияла на продуктивность растений-регенерантов *Solanum tuberosum* L среднеспелого сорта Луговской. Добавление ЖК в питательную среду при росте микроклонов картофеля в культуре *in vitro* способствовало увеличению суммарной площади листьев и количества столонов на 58% и 25% соответственно. Кроме того, внесение ЖК также способствовало увеличению сырой и сухой массы растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта Российского фонда фундаментальных исследований № 17-54-61016-Египет_а.

Регуляция распределения углерода между крахмалом и нейтральными липидами у зеленых микроводорослей

Синетова М.А.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
maria.sinetova@mail.ru

Зеленые микроводоросли филогенетически близки к высшим растениям, имеют многие сходные пути метаболизма и могут служить удобным модельным объектом для их изучения в благодаря своему простому строению. Кроме того среди зеленых микроводорослей много перспективных продуцентов крахмала и триацилглицеринов (ТАГ), которые могут быть использованы для производства биотоплива и пищевых и кормовых добавок. Водоросли могут использовать солнечный свет для фотосинтеза, а также могут расти миксотрофно и гетеротрофно, используя органический углерод. Как и у растений, у зеленых микроводорослей полученная в процессе фотосинтеза глюкоза запасается в крахмальных зернах в строме хлоропласта. Крахмал представляет собой динамичный пул углерода, который синтезируется на свету и используется в качестве источника углерода и энергии в темноте и в энергоемких процессах деления клетки. Соотношение процессов синтеза и разложения зависит от условий окружающей среды и стадии клеточного цикла. Углерод, фиксированный в процессе фотосинтеза, также может накапливать в составе липидов. Основные классы липидов микроводорослей это мембранные липиды (гликозилглицериды, фосфоглицериды и бетаиновые липиды) и запасные липиды, в основном в форме ТАГ. В качестве запасного вещества ТАГ также имеют тенденцию накапливаться на свету и разлагаться в темноте, но отличаются от крахмала локализацией (в отличие от крахмала, липидные капли локализованы в цитоплазме) и энергоемкостью.

При стрессовых воздействиях, например при голодании по макроэлементам, а также в стационарной фазе роста в клетках зеленых микроводорослей накапливаются большие количества крахмала и ТАГ. Соотношение этих пулов запасного углерода существенно отличается у разных зеленых микроводорослей на уровне рода, вида и даже штамма. Есть штаммы, которые накапливают практически исключительно крахмал, есть штаммы, которые накапливают преимущественно ТАГ с небольшим количеством крахмала и есть штаммы, которые сначала накапливают значительные количества крахмала, а потом переходят к накоплению ТАГ. Причины этих различий к настоящему времени практически не изучены. Общим предшественником биосинтеза жирных кислот и глюкозы, соответственно компонентов ТАГ и крахмала, является глицеральдегид-3-фосфат, поэтому предполагалось, что процессы биосинтеза ТАГ и крахмала конкурируют за углерод. В последнее десятилетие было проведено много исследований процессов распределения углерода в условиях азотного голодания между этими пулами, основными объектами этих исследований были мутанты *Chlamydomonas reinhardtii*, неспособные синтезировать крахмал. Полученные результаты оказались противоречивыми, выяснилось, что взаимодействие между пулом липидов и пулом крахмала не ограничивается только конкуренцией за углерод, но включает в себя также и конкуренцию за АТФ и восстанавливающие эквиваленты. Восстановительный статус клетки зависит от соотношения НАД(Ф)/НАД(Ф)Н, которое регулируется как генетически, так и условиями окружающей среды (интенсивностью и спектральным составом света, типом источника углерода, стадией роста и клеточного цикла). Энергетический аспект взаимодействия между процессами накопления крахмала и липидов практически не изучен.

Основной современный путь исследования процессов распределения углерода по запасным пулам – сравнительный анализ транскриптомов, протеомов и метаболомов. Анализ данных, полученных на микроводорослях различных систематических групп и с разной динамикой накопления крахмала и липидов позволяет выявить общие закономерности в регуляции этих процессов и те особенности, которые определяют основной тип запасного продукта.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 20-14-00280.

Регуляция синтеза вторичных метаболитов в культуре *in vitro*

Тимофеева О.А., Хуснетдинова Л.З., Мохамед Г.Р.

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия.
otimjfeeva2008@mail.ru

Культура клеток высших растений представляется весьма перспективным источником для получения ценных биологически активных веществ. Однако очень часто содержание необходимых соединений в культуре *in vitro* значительно ниже, чем в интактном растении. В связи с этим необходимо разрабатывать приемы для интенсификации накопления вторичных метаболитов в культуре *in vitro*. Для решения этих задач возможны разные подходы: модификация питательных сред с помощью фитогормонов или предшественников, а также варьирование условий освещенности при выращивании клеточных культур.

Впервые из корневых эксплантов *Hyoscyamus muticus* L. получены каллусные и суспензионные культуры, продуцирующие тропановые алкалоиды и обладающие ризогенным потенциалом. Гистологические исследования продемонстрировали, что ризогенные каллусные и суспензионные культуры *H. muticus* L. имеют сложное строение и характеризуются наличием нодулярных структур, которые, по-видимому, необходимы для синтеза и накопления тропановых алкалоидов. Применение метил-жасмоната (100 и 200 мкМ) позволило повысить продуктивность суспензионной культуры *H. muticus* L., образующей атропина в четыре раза больше, чем у растений, и в 5,5 раз больше по сравнению с корнем.

Создана коллекция клеточных культур *V. corymbosum*, различающихся по содержанию антоцианов и проантоцианидинов, которая может служить перспективным материалом для получения линий-продуцентов ценных соединений для различных областей промышленности. Изучено влияние спектрального состава света на накопление антоцианов и проантоцианидинов в каллусной ткани *Vaccinium* spp. L. Показано, что красный свет наиболее эффективно усиливает образование и расширяет спектр антоцианов в каллусной культуре. Образование проантоцианидинов было более эффективно в темноте. Добавление предшественника (L-фенилаланин) в концентрации 3 мМ увеличивает содержание антоцианов и в концентрации 6 мМ – содержание проантоцианидинов в суспензионной культуре *Vaccinium* spp. L. Обработка метил-жасмонатом в течение 72 ч (50 мкМ) увеличивает содержание и изменяет состав антоцианов, а обработка в течение 24 ч (100 мкМ) – содержание проантоцианидинов в суспензионной культуре *Vaccinium* spp. L.

Роль АВР1 в регуляции работы Н⁺-АТФазы плазмалеммы в клетках суспензионной культуры табака

Кирпичникова А.А.^{*}, Архимандритова (Теплякова) С.Б.^{**}, Чэнь Т.^{***}, Шапиро А.С.^{*}, Шишова М.Ф.^{*}

^{*} Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, Россия.

^{**} Текущий адрес: Федеральный исследовательский центр, Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), ул. Большая Морская, 42, 44, Санкт-Петербург, Россия.

^{***} Текущий адрес: Chengdu New Sun Crop Science Co., Ltd., No. 35, Gongye Five Road, Hengshan Town, Pujiang, Chengdu, 611630, Sichuan, People's Republic of China.
nastin1972@mail.ru

Хорошо известна важная роль Н⁺-АТФ-азы плазмалеммы (ПМ) в обеспечении роста растяжением за счет изменения рН клеточной стенки. Регуляция работы протонной помпы ПМ осуществляется на различных уровнях: транскрипционном и пост-трансляционном. Одним из факторов, участвующих в регуляции работы Н⁺-АТФазы является фитогормон ауксин. К настоящему времени приоритетной является гипотеза об интенсификации работы фермента за счет фосфорилирования. Однако интенсивность роста растяжением по ряду данных может регулироваться ауксин связывающим белком 1 (АВР1), функция которого до сих пор дискуссионна. Данное исследование нацелено на выявление возможной роли АВР1 в модуляции активности Н⁺-АТФазы плазмалеммы. Исследование проводили на клетках суспензионной культуры табака ВУ-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow) двух линий: дикого типа и линии NAS, являющейся антисенс-трансформантом по гену, кодирующему АВР1.

Развитие культуры ВУ-2 заключается в последовательной смене этапов деления, интенсивного роста растяжением и завершения роста на 7, 14 и 18 сутки после посева, соответственно. Линия NAS сохраняет эту последовательность, но имеет меньшую амплитуду удлинения клеток.

Фракция плазмалеммы была получена при помощи дифференциального центрифугирования с последующей очисткой в водной двухфазной системе ПЭГ/Декстран. Гидролитическую активность Н⁺-АТФазы фракции ПМ оценивали по накоплению неорганического фосфата спектрофотометрическим методом. Для определения интенсивности подкисления экстраклеточной среды протонной помпой ПМ клеток суспензионной культуры табака был использован индикатор кислотности бромкрезоловый пурпуровый.

Показано, что рост клеток табака дикого типа имеет нелинейный характер с максимумом на 14 день развития культуры. Анализ гидролитической и транспортной активности Н⁺-АТФазы ПМ выявил сходный характер работы фермента, что соответствовало динамике увеличения количества Н⁺-АТФаз в составе везикулярной фракции (по результатам Вестерн-блотт анализа) и накоплению продуктов транскрипции генов *PMA1*, *PMA2*, *PMA3*, *PMA6*, кодирующих фермент ПМ.

В клетках суспензионной культуры линии NAS1 в возрасте 14 дней уровень экспрессии указанных генов не повышался и не отличался от уровня их экспрессии в возрасте 7 дней. Данные на транскрипционном уровне соответствовали низкой интенсивности роста и снижению представленности протонной помпы в составе плазмалеммы. Гидролитическая и ацидофицирующая активность клеток линии NAS1 менялась нелинейно, как и у клеток дикого типа, но была значительно меньшей по амплитуде.

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что снижение чувствительности клеток к ауксину в результате снижения количества АВР1 приводила к ослаблению интенсивности роста растяжением. Данный эффект был опосредован отсутствием регуляции Н⁺-АТФазы на транскрипционном уровне.

Исследования выполнены при поддержке РФФИ (проект №19-04-00655).

Роль активных форм кислорода в регуляции взаимодействия растений картофеля с эндофитными микроорганизмами *B. subtilis* 26Д

Сорокань А.В., Бурханова Г.Ф., Максимов И.В.

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа, Россия.
fourtyanns@googlegmail.com

Эндофитными называются бактерии, способные колонизировать внутренние ткани растения, не вызывая его заболеваний и не оказывая отрицательного влияния на развитие. Они способны вызвать определенные физиологические реакции в растительном организме, которые приводят к системной устойчивости – ISR (induced systemic resistance). Индуцируемая устойчивость регулируется жасмоновой (ЖК) и салициловой (СК) кислотами. Сигналинг этих соединений, как показано в литературе, тесно связан с генерацией и распределением активных форм кислорода в различных компартментах клетки, и, соответственно, активностью НАДФН-оксидазной сигнальной системы. Поскольку активные формы кислорода (АФК) играют роль в запрограммированной гибели клеток, общих реакциях на стресс и системной передаче сигналов, они могут оказывать большое влияние на эффективность инфекции и колонизации внутренних тканей растений. Однако, окислительный взрыв в растениях является одной из наиболее ранних реакций на воздействие патогенных микроорганизмов. Поэтому важным является вопрос о механизмах, позволяющих эндофитным бактериям успешно колонизировать ткани хозяев, не вызывая иммунной реакции растения на их инвазию.

В работе использованы пробирочные стерильные растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Ранняя роза, культивируемые в течение 25 сут на агаризованной среде Муросиге-Скуга с добавлением 1мМ СК либо 0,1 мМ ЖК. Инокулировали суспензией бактерий *B. subtilis* 26Д (10^5 кл/мл) нанесением по 3 мкл на 5 верхних листьев. Через 15, 30, 45, 60 минут растения фиксировали для биохимических и гистохимических анализов и через 7 суток подсчитывали число колониеобразующих единиц (КОЕ).

Было выявлено, что обработка растений ЖК снижает содержание колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий во внутренних тканях растений практически на порядок, СК – на 1/3.

На начальных этапах в растительных клетках в месте контакта с бактериями происходила локальная выработка АФК, перекиси водорода и супероксид-аниона, что соответствовало реакции растений на присутствие патогенных микроорганизмов. Позднее этот эффект сходил на нет. Однако в растениях, испытывающих воздействие экзогенной СК в те же временные точки участки листьев окрашиваются сходно, хотя и более интенсивно, и эффект длится дольше. Наиболее интенсивная окраска наблюдается в растениях под действием ЖК и супероксид-анион локализуется вблизи проводящей системы, что, по-видимому, блокирует системное продвижение бактерий по тканям. Содержание перекиси водорода в необработанных и обработанных СК растениях через 15 мин после контакт с *B. subtilis* 26Д остается на уровне контроля, а затем несколько снижается. Под действием ЖК инокуляция бактериальной суспензией увеличивает этот показатель на всем протяжении опыта, так же как пероксидазную активность и транскрипционную активность гена анионной пероксидазы, участвующей в защитных реакция против возбудителя фитофтороза.

Липоксигеназы являются ключевыми ферментами растений, участвующих в образовании производных окисления ПНЖК – оксипинов, представляющих собой разнородный класс биологически активных метаболитов, к которым относят, в частности, ЖК. Увеличение активности липоксигеназ наблюдается в процессе реакции гиперчувствительности на действие патогенных бактерий. Однако, воздействие эндофитных бактерий так же увеличивает этот показатель в испытывающих воздействие ЖК растениях в первые 30 минут после инокуляции.

Было показано, что обработка растений экзогенной перекисью водорода перед инокуляцией растений так же снижала содержание бактерий *B. subtilis* 26Д во внутренних тканях растений. Таким образом, под действием жасмоновой кислоты растения картофеля реагируют на симбиотические микроорганизмы как на патогенную микрофлору, развивая сходные ответные реакции, связанные с окислительным взрывом.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 20-76-00003.

Содержание метаболитов, обладающих фотозащитной и антиоксидантной активностью, в талломах представителей разных таксономических групп красных водорослей

Яньшин Н.А.* , Лемешева В.С.* , Биркемайер К. , Бойцова Е.А.* , Тараховская Е.Р.***

* Санкт-Петербургский государственный университет. Университетская наб. 7/9, Санкт-Петербург, Россия.

** Университет Лейпцига. Линнестрассе, 3, Лейпциг, Германия.

elena.tarakhovskaya@gmail.com

Биосинтез и избирательное накопление метаболитов, обладающих фотозащитной и антиоксидантной активностью, позволили красным водорослям успешно освоить морские биотопы, существенно различающиеся по освещенности и спектральному составу света. К подобным защитным соединениям относятся каротиноиды, токохроманолы, аскорбиновая кислота, фенольные соединения, а также микоспорин-подобные аминокислоты (МАК) – специфические вторичные метаболиты красных водорослей, ряда грибов и цианобактерий.

Целью данной работы явилось сравнение содержания низкомолекулярных первичных и вторичных метаболитов, выполняющих фотозащитные и антиоксидантные функции, в талломах 14 видов красных водорослей, различающихся по таксономическому положению и особенностям экологии.

Объектами исследования служили: *Ceramium virgatum*, *Ptilota gunneri*, *Phycodryx rubens*, *Polysiphonia stricta*, *Rhodomela lycopodioides*, *Vertebrata fucoides*, *Odonthalia dentata* (Ceramiaceae); *Corallina officinalis* (Corallinales); *Polyides rotunda*, *Furcellaria lumbricalis*, *Coccotylus brodiei*, *Euthora cristata*, *Cystoclonium purpureum* (Gigartinales) и *Palmaria palmata* (Palmariales). Названия и систематическое положение водорослей даны по AlgaeBase. Водоросли были собраны в Кандалякшском заливе Белого моря. Анализ низкомолекулярных метаболитов был осуществлен методом газовой и жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией. Хроматографическое разделение МАК проведено на колонках Phenomenex Gemini, для масс-спектрометрии использована система Esquire 3000+ (Bruker, Bremen, Germany) с электроспрей-ионизацией. Для GC-MS-анализа использован хроматограф Trace GC Ultra, совмещенный с масс-спектрометром с двойной фокусировкой и магнитным секторным масс-анализатором (ThermoFinnigan, Bremen, Германия) с электронной ионизацией под управлением программного обеспечения ChemStation. Содержание фотосинтетических пигментов в талломах водорослей определено стандартными спектрофотометрическими методами.

Полученные данные показали, что 9 видов красных водорослей содержат значимые количества МАК. Преобладающими МАК были шинорин, порфира-334, астерина-330, палитин, палитинол, микоспорин-глицин и микоспорин-серин. Наиболее высоким содержанием и широким спектром МАК отличалась *P. palmata* – вид, характеризующийся значительной экологической пластичностью и массово встречающийся как в сублиторальной, так и литоральной зоне северных морей. Также относительно высокое содержание МАК показано у представителей пор. Ceramiaceae (*C. virgatum*, *V. fucoides*, *P. stricta*). Фенольные соединения, идентифицированные в экстрактах водорослей, включали в себя гидроксикоричные кислоты, салициловую и 3-гидроксibenзойную кислоты, фенилацетальдегид и производные фенилэтиленгликоля. Была отмечена отрицательная корреляция между содержанием в талломах водорослей МАК и фенольных соединений. Наибольшее количество метаболитов фенольной природы накапливают представители пор. Gigartinales (в частности, *F. lumbricalis*).

В отличие от бурых макрофитов, клетки которых содержат несколько токоферолов в сопоставимых количествах, красные водоросли накапливают преимущественно альфа-токоферол. Содержание этого антиоксиданта не показало четкой корреляции с таксономическим положением или экологией водорослей. Наибольшая концентрация альфа-токоферола была отмечена в талломах *C. officinalis*, *P. rotunda* и *C. virgatum*. Напротив, общее содержание каротиноидов в водорослях зависело от глубины их произрастания: оно было максимальным у образцов, собранных на литорали (в условиях наибольшей освещенности). По-видимому, это объясняется тем, что основная функция этих пигментов у красных водорослей – фотозащитная, в то время как роль светособирающей антенны, преимущественно, берут на себя фикобилины. В целом, полученные данные позволяют прийти к выводу, что тенденция к накоплению специфических фотозащитных и антиоксидантных метаболитов, таких как МАК и фенольные соединения, является характеристикой, свойственной определенным таксономическим группам водорослей. В частности, представители пор. Ceramiaceae и Gigartinales, сходные по экологическим предпочтениям, в относительно высоких концентрациях накапливают, соответственно, МАК и фенольные метаболиты.

Проект выполняется при поддержке РФФИ (грант № 20-04-00944).

Содержание фенолов и антиоксидантная активность экстрактов каллусов солодки

Ермошин А.А., Неугодникова Е.А.

Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина.
Ленина пр., 51, Екатеринбург, Россия.
Alexander.Ermoshin@urfu.ru

Солодка голая и близкий к ней вид солодки уральская издавна использовались в народной медицине разных стран. Это одно из наиболее известных лекарственных растений, используемых официальной медициной многих стран как отхаркивающее и смягчающее средство, а также для улучшения вкуса галеновых препаратов. В официальной медицине используется корневище растения. Основным действующим веществом являются сапонины. Несмотря на длительное использование солодки в медицине, в последнее время к её изучению вновь проявляется интерес – активно изучается состав не только подземной, но и надземной биомассы. Интерес представляют флавоноиды надземной биомассы, которые кроме антиоксидантного действия проявляют противовирусную и противораковую активность. Таким образом, исследование химического состава и биологической активности солодки не потеряло своей актуальности.

Ресурсные запасы солодки в СССР были велики, однако в Российской Федерации её запасы ограничены. Кроме того, в ряде регионов солодка занесена в региональные Красные книги, что делает её сбор невозможным. Солодка голая легко поддается культивированию, однако выращивание многолетних лекарственных растений требует отчуждения на длительное время сельскохозяйственных земель, а при нарушении агротехники солодка может дичать и становиться злостным сорняком. Это и обуславливает интерес к культивированию клеток солодки *in vitro*.

Для получения каллусной культуры в качестве исходного сырья использовали растения, из коллекции Ботанического сада Уральского отделения РАН. В качестве исходного сырья использовали листовые экспланты, так как экспланты из корневища оказались нежизнеспособны. Первичный каллус получали на среде МС с 3% сахарозы и 9 вариантами сочетания фитогормонов: 0,2; 1 или 5 мг/л БАП в сочетании с 2; 10 и 20 мг/л НУК. Наилучшие результаты показали варианты среды с 0,2 БАП + 20 НУК; 1 БАП + 20 НУК и 1 БАП + 2 НУК мг/л. Выживаемость каллусов на них составляла от 100 до 87%. На средах с добавлением 5 мг/л БАП все каллусы погибли. Наибольшая скорость роста и выживаемость каллусов показана при добавлении 1 мг/л БАП и 10 мг/л НУК. Для каллусов, выращенных на этой среде, были определены суммарное содержание фенолов, флавоноидов и антиоксидантная активность экстрактов. Результаты сравнивали с экстрактом, полученным из корневища интактного растения исходного генотипа. Содержание фенолов в каллусной культуре оставило $1,72 \pm 0,16$ мг/г сухого веса. В экстракте корневища – $3,55 \pm 0,07$ мг/г. Содержание суммы флавоноидов – $1,02 \pm 0,14$ мг/г сухого веса в каллусах, против $8,29 \pm 0,63$ мг/г в корневище.

И фенолы, и флавоноиды являются мощными антиоксидантами, с чем часто связаны их терапевтические эффекты. Проведено сравнение восстановительной способности полученных экстрактов и их способность ингибировать продукцию оксида азота *in vitro*. Оксид азота – широко распространенная сигнальная молекула, и его образование связано с развитием ряда патологических процессов у человека. По нашим данным экстракт каллусной культуры на 166 ± 9 % увеличивает восстановление молибдата аммония относительно чистого растворителя (этанол). Экстракт корневища - на 452 ± 32 %. Для сравнения, галловая кислота в концентрации 0,5 мг/мл - на 248 ± 11 %, а рутин в той же концентрации - на 113 ± 9 %. В опытах с нитропруссидом натрия добавление экстракта культуры клеток снижало образование оксида азота на 74 ± 26 %, а добавление экстракта корневища – на 131 ± 44 %. Галлат ингибировал образование NO на 36 ± 12 %, аскорбат – на 24 ± 1 %, а рутин в этой реакции не проявил активность.

Таким образом, в клетках каллусной культуры, полученной из листовых эксплантов содержание фенолов и флавоноидов, составляет только 48% и 12%, соответственно, от их количества в корневище. Однако быстрая скорость роста каллусной культуры может сделать её перспективной для получения фенольных соединений. Синтез флавоноидов в полученной культуре малоперспективен - необходима оптимизация состава среды и условий культивирования. Общий восстановительный потенциал экстракта каллусной культуры был в 2,7 раза ниже, чем у экстракта, полученного из корневища. Тем не менее, его использование как антиоксиданта представляется перспективным, так как восстановительный потенциал экстракта культуры клеток солодки достоверно выше, чем стандартного препарата, содержащего 0,5 мг/мл рутина. Способность ингибировать образование NO у экстрактов достоверно выше, чем для трех известных антиоксидантов, что делает перспективным дальнейшее изучение каллусной культуры солодки голой как продуцента антиоксидантов.

Суспензионная культура клеток табака как модель для изучения роста растяжением

Шишова М.Ф., Емельянов В.В.

Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, Россия.
mshishova@mail.ru

Уникальная особенность суспензионной культуры табака VBI-0 и Vu-2 заключается в том, что клетки наряду с делением, сохраняют способность к росту растяжением. Этот процесс многократного увеличения размеров, как и любой морфофизиологический процесс, затрагивает все компартменты растительной клетки. Рост растяжением включает в себя несколько этапов, заключающихся в последовательном изменении осмотического и тургорного давления, размягчении клеточной стенки, усилении синтетических процессов, приводящих к удлинению плазмалеммы, тонопласта, формированию вторичной клеточной стенки и т.п.

Накоплены многочисленные данные о важности H^+ -АТФ-азы плазмалеммы (ПМ) в обеспечении роста растяжением за счет изменения рН клеточной стенки. Однако до сих пор дискуссионным остается вопрос, как регулируется работа протонного насоса: за счет активации на транскрипционном или посттрансляционном уровне?

На модельной системе, представленной клетками суспензионной культуры, получены убедительные данные о том, что рост растяжением представляет собой нелинейный процесс, который полностью соответствует активации H^+ -АТФазы ПМ. При этом регистрируется увеличение количества фермента, коррелирующее с усилением экспрессии ряда генов, кодирующих протонный насос плазмалеммы. При этом наблюдали усиление известных систем регуляции работы фермента на посттрансляционном уровне (киназы, 14-3-3 белки и т.п.).

Интенсивная вакуолизация позволила предположить и, в дальнейшем, доказать изменение активности H^+ -АТФазы тонопласта. В этом случае также наблюдалась прямая зависимость активности фермента, его количества и экспрессии генов, кодирующих его субъединицы.

Наряду с вышеперечисленным, метаболомное профилирование показало, что стадия роста растяжением характеризуется высоким содержанием сахаров, в том числе глюкозы и фруктозы, и органических кислот. Возможно, эти метаболиты играют важную роль в создании и поддержании высокого уровня осмотического давления, необходимого для растяжения клетки. Однако это также может свидетельствовать об усилении дыхания и метаболизма в целом, а, следовательно, увеличении содержания АТФ, что, естественно будет стимулировать работу H^+ -АТФаз плазмалеммы и тонопласта.

Полученные данные позволяют предложить модель перераспределения функциональной значимости протонных насосов растительной клетки в процессе роста растяжением на примере клеток суспензионной культуры табака.

Исследование проведено при частичной поддержке РФФИ (проект №19-04-00655).

Участие карбоангидразы САНЗ в функционировании фотосинтетического аппарата *Chlamydomonas reinhardtii*

Терентьев В.В., Шукушина А.К.

ИФПБ РАН, Пущино, Россия.
v.v.terentyev@gmail.com

Уровень CO_2 оказывает влияние на структурно-функциональное состояние фотосинтетического аппарата зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. Например, показано его влияние на степень стэкированности тилакоидов, соотношение 1 и 2 фотосистем (ФС) и, вероятно, их общее содержание, размер внешней антенны ФС2, количество и состав каротиноидов, степень дезоксидации каротиноидов виолаксантинового цикла, содержание белков LHCSR3, LHCSR1 и PsbS, максимальный квантовых выход ФС2, интенсивность нефотохимического тушения и др. Кроме того, отмечено CO_2 -индуцированное перемещение митохондрий из центрального расположения в клетке водоросли на периферическое, где они формируют тесный контакт с мембраной хлоропласта. Также в работах отмечено влияние CO_2 на степень формирования в хлоропласте пиреноида, в котором при активации CO_2 -концентрирующего механизма (ССМ) концентрируется и плотно упаковывается фермент Рубиско, участвующий в ассимиляции CO_2 .

Известно, что реакцию взаимопревращения различных форм неорганического углерода катализируют металлсодержащие ферменты карбоангидразы (КА), которые обнаружены практически во всех живых организмах. На данный момент их разделяют на 8 независимых семейств – α , β , γ , δ , ζ , η , θ , ι . В клетке *C. reinhardtii* содержится 13 КА, которые относятся к 4-м семействам (α , β , γ и θ) и локализуются практически во всех компартментах клетки. Три из них, относящиеся к разным семействам, локализуются в крупном хлоропласте, занимающим большую часть клетки: люменальная α -САНЗ и стромальные β -САН6 и недавно отнесенный к θ -КА белок LCIB. Каким образом эти КА могут быть вовлечены в CO_2 -индуцированные изменения структурно-функционального состояния фотосинтетического аппарата *C. reinhardtii*, описанные выше, практически не изучено.

Для всех КА хлоропласта *C. reinhardtii* предполагалось участие в ССМ. Однако с открытием САНЗ появились данные о том, что эта КА также может участвовать и в функционировании ФС2. На данный момент для САНЗ предполагаются обе эти функции. Было показано, что САНЗ локализуется в тилакоидах, пронизывающих пиреноид, где ускорение дегидратазного направления реакции ($\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$) приводит к образованию CO_2 свободно диффундирующего через мембрану тилакоида в пиреноид к Рубиско. Более того, при активации ССМ (т.е. низком CO_2) было выявлено перемещение САНЗ в область пиреноида, чему предшествовало фосфорилирование белка. Более того, мутант *cia3* с отсутствующей САНЗ в люмене тилакоидов погибает при низком CO_2 , а отсутствие САНЗ в люмене оказывает влияние на фенотип мутантов по белку LCIB. При этом показано, что уровень экспрессии гена САНЗ постоянен и практически не изменяется при изменении уровня CO_2 , или подавлении формирования пиреноида (*pur*- мутант), т.е. блокировании ССМ, а отсутствие САНЗ в люмене тилакоидов (штаммы *cia3* или СС2699) не влияет на формирование пиреноида (активацию ССМ) и его фенотип. САНЗ в большом количестве обнаруживается в мембранах, обогащенных ФС2, при чем это количество коррелирует с содержанием белков ФС2 (D1, PsbO), а в пересчете на хлорофилл (Хл) препараты показывают схожую КА-активность $\sim 31 \text{ WAU} (\text{мг Хл})^{-1}$ от изолирования к изолированию. Результаты свидетельствуют, что КА-активность САНЗ поддерживает функцию водоокисляющего комплекса (ВОК) ФС2 в неоптимальных или стрессовых условиях, вероятно за счет стимулирования отвода H^+ от активного центра ВОК в результате ускорения дегидратазного направления реакции (см. выше). Например, показано, что активность ФС2 в *cia3* сильнее подавляется при смещении pH среды от оптимального для ВОК (6,0–6,5) как в кислую (до 5,5), так и в щелочную (до 7,0) стороны. А при pH выше 7,0 КА-активность САНЗ снижает долю ФС2 с необратимой потерей активности. При этом в оптимальных условиях показана почти в два раза более сильная устойчивость фотосинтетической активности ФС2 в присутствии САНЗ при длительной фотоинактивации препаратов. О том, что эффекты связаны именно с КА-активностью САНЗ свидетельствует их потеря в присутствии ингибиторов КА в концентрациях ниже 1 мкМ. Имеются данные о том, что отсутствие САНЗ около ВОК может сказываться на его нативной структуре, что проявляется в увеличении доли низкопотенциальной формы цитохрома b559, имеющего контакт с белком PsbP, и подавлении переноса электрона на акцепторной стороне ФС2, отражающегося на форме кривой быстрого нарастания флюоресценции Хл (ОЛР). Кроме этого, на целых клетках *C. reinhardtii* выявлено, что отсутствие САНЗ вызывает относительно быстрое изменение формы хлоропласта светом средней интенсивности.

Кроме участия САНЗ в ССМ и функционировании ФС2 для нее предположены и другие функции. Например, показано, что САНЗ может быть вовлечена в процессы дисетурации жирных кислот тилакоидной мембраны, а также было выявлено возможное взаимодействие САНЗ с белковыми транспортерами тилакоидной мембраны TAT2 и TAT3, что предполагает вовлечение САНЗ в транспорт белков в люмен. Изучение влияния САНЗ на функциональное состояние фотосинтетического аппарата представляет значительный интерес и с точки зрения сельского хозяйства, поскольку в мутантах томатов и табака САНЗ локализовалась также в хлоропластах, а сами растения показывали повышенный выход продуктивности, за счет стимулирования процессов фотосинтеза. Грант РФФИ № 19-34-90056.

Фенольные соединения в клеточных культурах растений: образование, регуляция, перспективы использования

Загоскина Н.В.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
zagoskina@ifr.moscow

Фенольные соединения (ФС) относятся к одним из наиболее распространенных вторичных метаболитов растений. Они присутствуют практически во всех клетках и тканях, а основными местами их биосинтеза и локализации служат пластиды (хлоропласты), эндоплазматический ретикулум, клеточная стенка, вакуоли и ядра. Важное значение имеет структура ФС, наличие гидроксильных групп и их расположение, от чего зависит их функциональная роль. Известно участие этих метаболитов в процессах фотосинтеза, дыхания, аллелопатии, защиты клеток от действия УФ радиации, высоких доз светового воздействия, тяжелых металлов и других стрессовых факторов. Высказывается предположение о том, что биосинтез ФС в растительных клетках повышается при действии активных форм кислорода, что свидетельствует о корреляции между их накоплением и уровнем окислительного стресса. Для многих представителей этих вторичных метаболитов установлена антиоксидантная активность, что проявляется у всех организмов, включая человека. В настоящее время значительное число ФС, а также фенол-содержащих растительных экстрактов успешно используется в фармакологии в качестве веществ-нутрицевтиков (не синтезируются в организме человека, а поступают извне).

Увеличение числа жителей на Планете, изменение ее экологии, исчезновение некоторых лекарственных растений, ухудшения состояния почв ставит перед всем человечеством поиск новых подходов для получения фармакологически-ценных веществ, в том числе ФС. И в этом случае важное значение отводится биотехнологии, позволяющей сохранять в условиях *in vitro* уникальные виды растений, получать культуры клеток, тканей и органов растений, регулировать в них накопление биологически активных веществ, а также создаваться условия для синтеза новых соединений.

Известно, что при культивировании клеток и тканей растений в условиях *in vitro* способность к образованию ФС сохраняется, хотя в большинстве случаев на более низком уровне по сравнению с исходными тканями. В связи с этим большое число исследований направлено на изучение физиолого-биохимических характеристик каллусных и суспензионных культур, в том числе регуляции биосинтеза ФС. Получение фенол-продуцирующих культур зависит от выбора экспланта; подбора питательных сред с учетом состава макро- и микроэлементов, витаминов, источников азота и фосфора, углеводов; соотношения ауксинов и цитокининов – как важных «регуляторов» их роста. Большое значение для накопления ФС в культурах *in vitro* имеют условия выращивания: свет, температура, pH, содержание кислорода. Воздействие на культуры прекурсоров, предшественников, ингибиторов может изменять количество и состав этих метаболитов, в том числе приводя к «новообразованию» отдельных компонентов. В последние годы возрос интерес к использованию элиситоров биотического и абиотического происхождения в качестве «регуляторов» накопления ФС в культурах *in vitro*. К ним относят соединения грибного и бактериального происхождения, тяжелые металлы, жасмоновую кислоту и другие. Считают, что эффективность элиситоров обусловлена действием активных форм кислорода, количество которых в этих условиях возрастает и служит «сигналом» для активации вторичного метаболизма. Накопление ФС в клеточных культурах растений можно повысить при действии на них мутагенов, селекцией высоко-продуктивных линий, иммобилизацией суспензионных клеток в альгинатных гелях, культивированием в биореакторах. Все это свидетельствует о большом диапазоне факторов, действие которых приводит к изменениям в накоплении ФС в клеточных культурах растений.

Для ФС характерна высокая антиоксидантная активность, которая у некоторых их представителей превышает таковую аскорбиновой кислоты. Именно этот аспект привлекает внимание ученых и практиков в связи с возможностью использования этих представителей вторичного метаболизма в фармакологии в качестве веществ-антиоксидантов. Несмотря на большое число работ по изучению содержания и состава ФС в различных клеточных культурах растений, до сих пор нет четко разработанной схемы повышения их количества, что может служить основой разработки инновационных биотехнологий в будущем.

**Физиолого-биохимическая характеристика штамма *Chlorella* sp. IPPAS C-1210,
перспективного продуцента липидов**

Бобровникова Л.А.^{*,*}, Пахолкова М.С.^{**}, Сидоров Р.А.^{***}, Синетова М.А.^{***}**

* Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова. Ленинские горы, 1, Москва, Россия.

** Северный Арктический Федеральный Университет им. М.В. Ломоносова.

Наб. Северной Двины, 17, Архангельск, Россия.

*** Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.

lidia.bo@yahoo.com

Микроводоросли сем. *Chlorellaceae* являются промышленно важными микроорганизмами в качестве перспективных продуцентов липидов, поэтому предполагается использовать их для коммерческого производства. В последнее время многие исследования были направлены на получение триацилглицеридов, главных претендентов на сырьё для производства биодизеля, из клеток различных представителей сем. *Chlorellaceae* ввиду таких их преимуществ, как подходящий жирнокислотный состав, высокая производительность и устойчивость к выращиванию в открытых водоёмах. Помимо использования *Chlorellaceae* в области биоэнергетики, большое внимание уделяется применению этих микроводорослей для биоремедиации сточных вод, оптимизации метанового брожения и в производстве пищевых добавок для сельскохозяйственных животных.

Штамм *Chlorella* sp. IPPAS C-1210 был выделен и очищен до аксенически чистого из накопительной культуры, полученной из пробы, отобранной из пресного озера Иссык (Казахстан). Данный штамм является эффективным продуцентом липидов, в частности триацилглицеридов, запасаая их в цитоплазме, и в перспективе мог бы использоваться в таких областях промышленности как биоэнергетика, пищевая промышленность и сельское хозяйство.

Задачей данной работы является биохимическая и физиологическая характеристика штамма *Chlorella* sp. IPPAS C-1210 с целью оптимизации его роста и продуктивности.

Были проведены эксперименты по изучению оптимальных для роста штамма условий культивирования: температуры, рН, источников азота и углерода. Была изучена реакция культуры на разную концентрацию бикарбонат- и хлорид-ионов в среде. Рост культуры оценивался спектрофотометрически по оптической плотности, измеренной при 750 нм. Пробы для анализа биохимического состава клеток были отобраны в эксперименте со средами, содержащими разные источники азота (нитрат, мочеви́на) и углерода (углекислота, бикарбонат). Проведено определение концентрации пигментов, крахмала, белка и липидов в клетках. Показано, что наибольшая продуктивность по биомассе и липидам наблюдалась при росте на среде с добавлением бикарбоната, наибольшая продуктивность по крахмалу – при росте на классической среде BBM-3N.

Работа выполнена на базе «Научно-производственного биотехнологического комплекса для проведения работ по изучению, сохранению и практическому применению культивируемых клеток и органов высших растений и микроводорослей» при финансовой поддержке Мегагранта Правительства Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1882).

Фотоморфогенез растений ежевики при клональном микроразмножении

Калашиникова Е.А. *, Шульгина А.А. *, Анисимов А.А. *, Василев А.В. **, Начева Л.Р. ***,
Киракосян Р.Н. *, Тараканов И.Г. *

* Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева, ул. Тимирязевская, 49, Москва, Россия.

** Аграрный университет Пловдив, ул. Менделеева, 12, Пловдив, Болгария.

*** Институт садоводства, ул. Остромила, 12, Пловдив, Болгария.

Ягодные культуры не всегда с высокой эффективностью можно размножить отводками, корневыми отпрысками, а также делением куста. Биотехнологический метод клонального микроразмножения позволяет решить эту проблему и уже широко используется в промышленных масштабах. Однако приведенные в литературе регламенты выращивания данных культур на всех этапах клонального микроразмножения не в полной мере реализуют их морфогенетический потенциал *in vitro*. Одним из регуляторных факторов, оказывающим эффективное влияние на морфофизиологические процессы у растений, является спектральный состав света, изменение которого может приводить к побегообразованию, корнеобразованию, повышению интенсивности роста и др. Наши исследования посвящены разработке эффективных методов регуляции морфогенеза и получения высококачественного посадочного материала у древесных садовых растений (в частности, ежевики) размножаемых вегетативно с использованием технологий *in vitro*, на основе фотоморфогенетической регуляции физиологических процессов с использованием облучателей на основе светоиспускающих диодов (СД). Необходимо физиологическое обоснование алгоритмов оптимизации процесса клонального микроразмножения относительно трудно адаптирующихся к этим условиям представителей древесных садовых культур в специальных условиях светокультуры за счет регулирования параметров светового режима, в первую очередь - спектрального состава света, в том числе – коррекции светового режима на разных этапах размножения и последующей адаптации растений. Комплексная характеристика изменчивости физиологических процессов позволит дать информацию о возможности и путях стимуляции развития растений *in vitro* для формирования эффективно функционирующего фотосинтетического аппарата, благодаря чему они будут более успешно преодолевать стресс при дальнейшем переносе для акклимации в условиях *ex vitro*. Сегодня СД являются единственными источниками света, которые могут обеспечить гибкость при управлении его спектральным составом. За счет использования СД можно регулировать и контролировать рост, фотосинтез и/или фотоморфогенез. А приобретение новых знаний и представлений в фотобиологии и морфогенезе, наряду с быстрым развитием СД-технологий, могут способствовать разработке технологий эффективного культивирования растений *in vitro*. В первой серии экспериментов экспланты растений ежевики, *Rubus caesius* L., сортов Black satin и Tornfree выращивали *in vitro* в факторостатных условиях с использованием облучателей на основе узкополосных красных ($\Delta \lambda = 645-666$ нм), зеленых ($\Delta \lambda = 500-540$ нм) и синих ($\Delta \lambda = 435-458$ нм) СД фирмы Сее (США). В качестве контроля использовали белые СД фирмы Valoya (Финляндия). Для размножения использовали питательную среду Мурасига и Скуга, содержащую БАП 0,5 мг/л, Эпин 1 мг/л и ИУК 0,5 мг/л. Измерения спектра излучения фитооблучателей проводили с помощью спектрометра PC100N фирмы UPRtek (Тайвань) с программным обеспечением фирмы «Интех-Лайтинг» (Россия), значения фотосинтетической фотонной облученности (PPFD) для каждого диапазона и суммарная облученность определялись с помощью прибора LI-250A с квантовым датчиком LI-190R (Li-Coq, США). Во второй серии экспериментов изучали действие спектрального состава света на адаптационные процессы при посадке растений *ex vitro* (все микрорастения в этом случае предварительно выращивали в одинаковых условиях с использованием белого света). Посадку производили в сосуды с питательным грунтом «Агробалт-С»; поддерживали оптимальную влажность субстрата путем полива по весу. В ходе исследований установлено, что квазимонохроматический красный, а также зеленый свет способствуют более интенсивному росту растяжением побегов у обоих сортов. Адаптация растений *ex vitro* лучше проходила на белом свете. Однако, у растений сорта Tornfree сопоставимые данные были получены и на красном свете, а у сорта Black satin – на синем свете. При использовании бинарных световых режимов (К + С, К + З, С + З) наиболее интенсивный рост растений наблюдали при совместном действии красного и зеленого света. В ходе изучения реакции растений ежевики *ex vitro* на выращивание с использованием квазимонохроматического излучения на основе узкополосных СД получены данные по развитию фотосинтетического аппарата, особенностям фотосинтетического газообмена и транспирации, накоплению фотосинтетических пигментов, световые кривые фотосинтеза и данные по накоплению биомассы (в том числе – по органам). Многие из этих показателей могут быть использованы в качестве надежных критериев оптимизации световых режимов при клональном микроразмножении растений.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-516-18008 Болг_а.

Хроматографический анализ вторичных метаболитов *Chromochloris zofingiensis*

Заднепровская Е.В. *, Козлова Т.А. *, Аллахвердиев С.И.**

* Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.

** Институт фундаментальных проблем биологии РАН. Институтская ул., 2, Пушкино, Россия.
zadneprovskaya@ifr.moscow, kozlova@ifr.moscow, suleyman.allakhverdiev@gmail.com

Известно, что микроводоросли являются многообещающим источником сырья для производства биотоплива, биологически активных добавок, косметики и т.д. Зеленая микроводоросль *Chromochloris zofingiensis* (Donz) Fucikova & L.A.Lewis – перспективный вид для производства коммерчески ценных пигментов и жирных кислот характеризующаяся высокими показателями удельного роста клеток, сверхвысокой плотностью клеток, способностью накапливать значительные концентрации вторичных каротиноидов. Однако наличие плотных клеточных стенок осложняет экстракцию пигментов из биомассы данной водоросли.

Цель исследования – сравнить различные методы экстракции пигментов, а также определить профили жирных кислот и пигментов в клетках *Ch. zofingiensis* (IPPRAS C108). Водоросль выращивали в конических колбах объемом 0,5 л, на модифицированной среде Bold Basal Medium (BBM) при искусственном освещении 4,5 кЛк, температуре 23-25°C. Часть проб была установлена на шейкере, часть биомассы выращивалась при непрерывной продувке стерильным воздухом (0,1 л*мин⁻¹). Профили пигментов определяли с помощью ВЭЖХ (жидкостный хроматограф Shimadzu LC-10A), используя стандарты ксантофиллов. Жирнокислотный состав нейтральных липидов определен методом газовой хроматографии (ГХ Цвет-800).

Опыт по экстракции пигментов состоял из трех экспериментальных линий, включающих в себя использование лиофилизации и ультразвуковой дезинтеграции (10 минут на УЗ-гомогенизаторе – вторая линия; 40 минут – УЗ-ванна – третья экспериментальная линия) клеточных стенок. Первоначально все равные образцы биомассы *Ch. zofingiensis* подверглись механической обработке. Затем все опытные образцы экстрагировались смесью органических растворителей (хлороформ: метанол = 2:1). Экстракция пигментов контрольных проб проводилась с помощью указанной смеси растворителей.

Установлено, с помощью ВЭЖХ анализа, что наилучшие показатели экстракции дали методы с применением УЗ-дезинтеграции клеточной оболочки микроводорослей (УЗ-ванна имеет ряд преимуществ). Выяснено соотношение основных каротиноидов *Ch. zofingiensis*, которое составляет: α-каротин – 1,2%, β-каротин – 2,5-7%, лютеин – 36,0-37,8%, астаксантин – 2,09-4,54%. Также был проведен анализ профилей хлорофиллов и жирных кислот после разных методов экстракции. Метод экстракции с использованием УЗ-ванны показал в 2.5-3,5 раз выше результаты, чем прямая экстракция смесью растворителями в контроле.

Цитофизиологические особенности суспензионных культур клеток *Dioscorea deltoidea* Wall.

Луныкова М.К. **, Титова М.В. *, Глаголева Е.С. **, Носов А.В. *, Фоменков А.А. *, Кочкин Д.В. **, Еремеева Е.А. **, Константинова С.В. **, Носов А.М. **

* Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, 127276.

** Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234.
titomirez@mail.ru

Dioscorea deltoidea Wall (диоскорея дельтовидная) произрастает в горных районах Азии и представляет собой многолетнюю листопадную лиану. В местах произрастания она активно используется в традиционной медицине. В культуре *in vitro* диоскорея дельтовидная синтезирует фураностаноловые гликозиды, благодаря чему экстракт культуры клеток диоскореи обладает широким спектром биологического действия. На данный момент в ИФР РАН в коллекции депонированы две линии культуры клеток данного вида: ДМ-03 и ДМ-05к. Обе линии получены посредством обработки исходного штамма ИФР Д1 химическим мутагеном N-нитрозо-N-метилмочевинной, при этом ДМ-05к была получена в результате одинарной, а ДМ-03 – в результате двойной обработки. Целью работы было сравнить линии ДМ-03 и ДМ-05к суспензионной культуры клеток *D. deltoidea* по цитологическим и физиологическим характеристикам.

В ходе исследования проводили определение динамики роста, ростовых характеристик, оценку жизнеспособности и агрегированности по стандартным биотехнологическим методам. Клетки, находящиеся в S-фазе митотического цикла, выявляли с использованием клик-реакции 5-этинил-2'-дезоксидеоксиуридина с азидами флюорохромов. Анализ дыхательной активности проводили при помощи полярографической ячейки открытого типа с электродом Кларка и ингибиторов дыхания (азид натрия и салицилгидроксамовой кислоты). Активность антиоксидантных ферментов измеряли спектрофотометрическими методами. Количественный анализ фураностаноловых гликозидов осуществили с помощью УЭЖХ ЭР МС.

Для исследуемых линий была проведена оценка динамики изменения роста по сырой и сухой биомассе, а также степень жизнеспособности. Установлено, что суспензионная культура клеток ДМ-05к обладала более высокими ростовыми характеристиками по сравнению с линией ДМ-03. В частности, максимальное накопление сухой биомассы в культуре ДМ-05к (13 г/л) было выше, чем у ДМ-03 (11 г/л). Доля клеток, находящихся в S-фазе митотического цикла, варьировала в пределах 3,5-4,0% для ДМ-03 и 3,0-6,0% для ДМ-05к на разных фазах роста. Возможно, более низкие доли S-фазных клеток у ДМ-03 в начале ростового цикла говорят о меньшей интенсивности пролиферации. На протяжении ростового цикла размеры клеток варьировали более чем в 3 раза для обеих линий, при этом в суспензии линии ДМ-05к доля крупных клеток (более 29 мкм) была в целом больше, чем у ДМ-03. Стоит отметить большую гетерогенность линии ДМ-03 по форме клеток: в популяции наблюдаются значительные количества (около 5%) удлинённых изогнутых клеток и агрегатов из таких клеток. По степени агрегированности клеток обе линии являются относительно мелкоагрегированными.

Значения скорости общего дыхания для двух линий диоскореи практически не отличались. Для обеих линий она, как правило, была максимальна в лаг-фазе и в начале экспоненты и значительно снижалась к концу цикла. Для обеих линий преобладал цитохромный путь дыхания, в то время как вклад альтернативного и остаточного дыхания возрастал в фазе стационара в 2 раза и более по сравнению с экспоненциальной фазой роста. Начиная с экспоненциальной фазы роста доля альтернативного дыхания для линии ДМ-03 была в 2 раза больше, чем для ДМ-05к.

Первичный скрининг активности антиоксидантных ферментов (аскорбатпероксидазы, каталазы и супероксиддисмутазы) показал, что для ДМ-03, по предварительным оценкам, их активность в целом выше.

По результатам УЭЖХ ЭР МС анализа, для обеих линий характерно преобладание 25(R)-форм фураностаноловых гликозидов над 25(S)- формой и преимущественное содержание протодиосцина над дельтозидом, при этом линия ДМ-03 отличается большей долей S-форм и меньшим содержанием дельтозида. Помимо этого, для линии ДМ-03 было показано большее суммарное содержание фураностаноловых гликозидов на 14 сутки (82,8 мг/г сухой массы), по сравнению с ДМ-05к (64,9 мг/г сухой массы).

Таким образом, для линий ДМ-03 и ДМ-05к суспензионной культуры клеток *D. deltoidea* были выявлены различия по ростовым, цитологическим, физиологическим и биосинтетическим характеристикам. Полученные результаты будут использованы в дальнейшем для оптимизации условий аппаратного выращивания культур.

Работы были проведены на базе «Научно-производственного биотехнологического комплекса для проведения работ по изучению, сохранению и практическому применению культивируемых клеток и органов высших растений и микроводорослей» (Мегагрант Правительства РФ, договор № 075-15-2019-1882) с использованием оборудования Уникальных научных установок «Опытный биотехнологический комплекс» и «Всероссийская коллекция культур клеток высших растений» ИФР РАН (УНУ ОБК ИФР РАН и УНУ ВРККК ВР ИФР РАН).

Экспериментальные лабораторные установки и полупромышленные фотобиореакторы закрытого типа для культивирования микроводорослей и цианобактерий

Габриелян Д.А., Бедбенев В.С., Габель Б.В., Габриелян А.К., Синетова М.А., Маркелова А.Г., Куприянова Е.В., Миронов К.С., Лось Д.А.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
gabrielyanda@ifr.moscow

Методы и технологии в области культивирования аксеничных штаммов цианобактерий и микроводорослей известны широко и применяются во всем мире. Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН обладает большим опытом по проведению научных работ в данной области и созданию культивационных систем. Доклад посвящен уникальной лабораторной установке и фотобиореакторам закрытого типа, разработанным и созданным в ИФР РАН за последние годы. Такие установки выполняют задачи фундаментальных и прикладных исследований и служат для отработки полупромышленной технологии культивирования микроводорослей. В работе представлены конструктивные особенности фотобиореакторов и лабораторной установки, а также показана организация технологической линии производства биомассы микроводорослей от пробирки с маточной культурой до полупромышленных объемов на примере *Chlorella sorokoniana* IPPAS C-1 и *Chlorella kessleri* IPPAS C-9 с выходом сухой массы до 5 г/л и концентрацией клеток выше 700 млн.кл/мл за неделю культивирования в случае *Chlorella sorokoniana* IPPAS C-1. Основным преимуществом лабораторной установки, представленной в настоящем докладе, является вариативность и мобильность в создании условий для культивирования микроводорослей и цианобактерий по заданным параметрам: температуре среды, интенсивности и спектрального состава светового потока, содержания CO₂ в газо-воздушной смеси. Кроме того, создание всех указанных трех систем в виде отдельных друг от друга блоков позволяет при необходимости проводить их модернизацию, не нарушая работоспособности остальных.

Часть работ, представленных в докладе, выполнена на базе «Научно-производственного биотехнологического комплекса для проведения работ по изучению, сохранению и практическому применению культивируемых клеток и органов высших растений и микроводорослей» при финансовой поддержке Мегагранта Правительства Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1882).

Эффект экзогенной индол-3-уксусной кислоты на окислительный статус регенерантов *Solanum tuberosum* L. сорта Луговской *in vitro* в условиях холодого стресса

Кадырбаев М.К. *, Сатканов М.Ж. **, Головацкая И.Ф. *

* Национальный исследовательский Томский государственный университет, пр. Ленина, 36, Томск, Россия.

** Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, г. Нур-Султан, Казахстан.

kadyrbaev.maks@mail.ru

Ауксины представляют собой класс фитогормонов, участвующих в многочисленных аспектах роста и развития растений, начиная с их молекулярного до организменного уровня. Эта группа гормонов регулирует дифференцировку клеток, образование сосудистых тканей, рост побегов, формирование органов цветка растений, фототропизм, гравитропизм, а также повышает устойчивость к негативным абиотическим и биотическим факторам. Многие из перечисленных процессов напрямую определяются локальными градиентами ауксинов, в реализации которых принимают участие белки семейства PIN, управляющие направлением гормональных потоков и общего распределения концентраций. Среди представителей семейства ауксинов наиболее сильнодействующим является индол-3-уксусная кислота (ИУК). Выявлено, что высокие уровни ИУК обнаруживаются в меристематических тканях побегов и корней, в семядолях, а также в молодых листьях, обладающих наибольшей биосинтетической активностью. Как известно действие экзогенных фитогормонов может быть обусловлено не только клеточным ответом или их усвоением на физиологическом уровне, но и взаимодействием их с эндогенными гормонами. Однако, сведения о влиянии ауксинов на окислительный статус растений-регенерантов картофеля в условиях холодого стресса недостаточны. В связи с этим целью исследования было изучение действия ИУК на окислительный статус листьев и корней регенерантов картофеля среднеспелого сорта Луговской *in vitro* в условиях слабого холодого стресса.

В качестве объекта исследований были выбраны оздоровленные растения-регенеранты *Solanum tuberosum* L. которые выращивали на 100% агаризованной питательной среде Мурасиге и Скуга (МС) в условиях *in vitro*. Культивацию проводили на белом свете при 16-ч фотопериоде и температуре $20\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 30 суток. В питательную среду добавляли 0.001 нМ и 10 нМ ИУК. Регенеранты подвергали холодовому воздействию $\sim 13\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 8 суток. У 39-дневных регенерантов определяли уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) модифицированным методом оценки интенсивности окислительного стресса растений и структурной целостности мембран по содержанию малонового диальдегида (МДА). Данные, полученные в ходе экспериментов, обрабатывали статистически. Обработка данных проводилась средствами электронных таблиц Excel. При сравнении независимых выборок растений, различающихся по условиям выращивания, выявили статистически значимые отличия изученных параметров, подчиняющихся закону нормального распределения. Использовали параметрический критерий Стьюдента, значения t-критерия находили для 95% уровня значимости ($p < 0,05$).

Результаты анализа интенсивности ПОЛ в корне – органе первичного воздействия экзогенного гормона – показали, что уровень МДА уменьшался на 39% при действии 0,001 нМ и на 45% при 10 нМ ИУК по сравнению с контролем. В то же время в листьях эти же концентрации ИУК снизили интенсивность ПОЛ соответственно на 52% и 21%. Атипичная корреляция между уровнем экзогенного гормона и его эффектом могла быть связана с транспортом ИУК и его метаболизмом вследствие чрезмерно высокой экзогенной концентрации. Подводя итоги, можно заключить, что экзогенная обработка корней ИУК положительно влияет на окислительный статус регенерантов *Solanum tuberosum* L. сорта Луговской в условиях холодого стресса.

РАЗДЕЛ 3

Сохранение биоразнообразия высших растений,
микроводорослей и цианобактерий

Биотехнологические методы сохранения генофонда растений в коллекциях *in vitro*

Молканова О.И., Ширнина И.В., Коновалова Т.Ю.

ФГБУН Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, Ботаническая ул., 4, Москва, Россия.
molkanova@mail.ru

Создание коллекций растений в ботанических садах – наиболее эффективный способ сохранения и рационального использования биологического разнообразия. В основе методических подходов формирования коллекций лежит принцип максимальной репрезентативности генетического разнообразия, включая дикорастущие виды, интродуцированные растения, а также растения, культивируемые *in vitro*. Поддержание генетических ресурсов в коллекциях *in vitro* становится важнейшим вкладом биотехнологии в стратегию сохранения *ex situ*.

Генетический банк растений *in vitro* в ГБС РАН формировался с 1996 г. и в настоящее время является уникальным и наиболее представительным в России. Он содержит 153 вида, 1157 сортов и отборных форм, относящихся к 183 родам и 61 семейству. Около 70% коллекции *in vitro* относится к фиторесурсным видам. Наиболее полно представлены семейства: Actinidiaceae, Asteraceae, Caprifoliaceae, Ericaceae, Hydrangeaceae, Liliaceae, Oleaceae, Orchedaceae, Rosaceae.

Разработка эффективных методов воспроизводства растений является основой работ по сохранению генофонда. Растения, относящиеся к разным таксонам, отличаются уровнем тотипотентности клеток и регенерационным потенциалом. Это обуславливает необходимость дифференцированного подхода к разработке методик клонального микроразмножения. При выборе стратегии сохранения *in vitro* каждого таксона необходимо учитывать его биологические особенности. Поскольку основной целью при длительном депонировании является сохранение гермоплазмы и поддержание ее в стабильном состоянии выбираются методы микроразмножения, минимизирующие риск самоклональных вариаций. К числу таких технологий относится прежде всего метод активации уже существующих меристем, который считается наиболее надежным в плане генетической стабильности.

Особое внимание уделяется изучению редких и исчезающих видов растений, коллекция *in vitro* которых представлена более 80 таксонами. В ГБС РАН впервые разработаны методики клонального микроразмножения *Gladiolus palustris* Gaudin., имеющего статус 0 (Ex), *Aristolochia manshuriensis* Kom., *Dioscorea caucasica* Lipsky, *Sanguisorba magnifica* I.Schischk. et Kom. – статус 1(E).

Изучена возможность асимбиотического проращивания семян методом *in vitro* 83 дикорастущих видов орхидей из 30 родов, 27 из которых входят в Красную книгу России, остальные включены в региональные списки охраняемых растений. Осуществлена успешная их интродукция в условиях Подмосквья. Наиболее представлены рода *Dactylorhiza* (10 видов) и *Cypripedium* (12 видов).

Исследованы процессы регенерации и выявлены закономерности при культивировании *in vitro* растений разных жизненных форм.

Одним из эффективных способов депонирования генофонда растений является культивирование регенерантов в условиях замедленного роста. Сроки и специфика условий хранения растительного материала определяются биологическими особенностями конкретных таксонов. В процессе исследований показано, что совместное использование оптимальной интенсивности освещения, состава питательной среды, концентрации осмотиков и ретардантов значительно увеличивает как период субкультивирования, так и жизнеспособность эксплантов в процессе хранения *in vitro*. Оптимальными условиями сохранения для большинства изученных таксонов являются ½ MS + 0,3 БАП, пониженная температура (5-7°C) и освещенность (500-1500 лк).

На основе комплекса показателей были определены оптимальные экспланты для длительного сохранения регенерантов в условиях *in vitro*. Для растений разных жизненных форм определены оптимальные типы эксплантов для длительного сохранения в условиях *in vitro*: для древесных и полудревесных растений – фрагменты побегов, содержащие один - два мемера, для травянистых – почки возобновления, для луковичных растений – микролуковички или их сегменты, для орхидей - протокормы. Подобраны условия для длительного депонирования. Показана определяющая роль модификаций питательных сред и факторов культивирования для замедленного роста эксплантов исследуемых культур и сохранения их жизнеспособности.

Разработана комплексная методология сохранения и устойчивого воспроизводства растений разных таксономических групп. Сформирована коллекция *in vitro* редких и ценных растений, которая насчитывает более 1300 наименований.

Работа выполнена в рамках ГЗ ГБС РАН (№118021490111-5).

Депонирование ценных генотипов эфиромасличных растений в культуре *in vitro*

Егорова Н.А., Ставцева И.В., Загорская М.С., Якимова О.В., Тевфик А.Ш.

ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»,
Киевская ул., 150, Симферополь, Республика Крым, Россия.
yegorova.na@mail.ru

Успешное проведение селекции эфиромасличных растений в значительной степени зависит от наличия широкого спектра разнообразного исходного материала, что обуславливает необходимость создания и поддержания коллекций различных образцов и сортов. В последние десятилетия, наряду с традиционными методами создания коллекций растений в полевых условиях, активно разрабатываются биотехнологические приемы, которые позволяют успешно сохранять ценные генотипы в условиях *in vitro*. Достаточно эффективным методом сохранения генетической плазмы является депонирование в условиях медленного роста, что достигается путем снижения температуры культивирования, добавления в питательную среду осмотически активных соединений или ингибиторов роста и другими способами.

Цель работы – изучение влияния длительности и условий депонирования *in vitro* на развитие эксплантов сортов и селекционных образцов некоторых эфиромасличных растений.

Для исследований использовали сорта и селекционные образцы лаванды (*Lavandula angustifolia* Mill.), мяты (*Mentha spp.*), розы эфиромасличной (*Rosa spp.*), душицы (*Origanum vulgare* L.), тимьяна (*Thymus vulgaris* L.) и тысячелистника (*Achillea millefolium* L.) из коллекции ФГБУН «НИИСХ Крыма». В качестве эксплантов использовали сегменты стебля с узлом, выделенные из побегов, полученных в процессе микроразмножения *in vitro*. Экспланты депонировали в пробирках или стеклянных банках на модификациях среды Мурасиге и Скуга при 4-6°C, освещении 1 клк или в темноте. В течение хранения *in vitro* каждые 3 месяца определяли количество жизнеспособных и развивающихся эксплантов, число и длину побегов, количество узлов на побеге, частоту каллусо- и ризогенеза, оценивали морфологию микропобегов. Через 9, 12, 18 месяцев депонирования побеги черенковали, переносили на свежие питательные среды и выращивали в культуральной комнате (при 26°C, освещении 2-3 клк с 16-часовым фотопериодом) для оценки эффективности их отрастания.

Необходимым этапом разработки методик хранения *in vitro* является оптимизация приемов клонального микроразмножения. Для всех изученных нами видов растений определены лимитирующие факторы, подобраны питательные среды, условия отбора и культивирования эксплантов, позволяющие получить высокие коэффициенты размножения. Этот показатель варьировал в зависимости от генотипа, происхождения экспланта, условий и длительности культивирования, и был максимальным у душицы (до 1:74,1), а минимальным – у тысячелистника (до 1:7,6).

При изучении влияния состава питательной среды на депонирование разных генотипов установлено, что хранение ряда эфиромасличных растений (мяты, розы, тысячелистника) можно успешно проводить с использованием питательных сред для микроразмножения, так как введение в состав среды маннита, сорбита или повышение концентрации сахарозы или глюкозы не оказало существенного влияния на жизнеспособность эксплантов. Для изученных видов, особенно мяты и розы, также показана возможность низкотемпературного депонирования эксплантов *in vitro* без освещения, что позволяет существенно упростить процесс.

У большинства сортов и образцов изученных видов растений при хранении в течение года выявлено достаточно высокое число жизнеспособных эксплантов. При этом почти у всех жизнеспособных эксплантов через 9-12 месяцев хранения отмечено медленное развитие – формировались пазушные и адвентивные почки и побеги, наблюдался их незначительный рост. Например, у душицы формировалось в среднем 2,1-3,2 побега на эксплант, тогда как у тимьяна – не более 1,4. Для многих образцов мяты было характерно формирование достаточно длинных побегов (в среднем до 25-37 мм) и активный ризогенез (с частотой до 73%). Количество жизнеспособных эксплантов очень зависело от генотипа. Так, у большинства сортов и образцов розы, мяты, тысячелистника отмечено 75-100% жизнеспособных эксплантов. В то же время у мяты сорта Удайчанка этот показатель составил 22,7%, а у многих генотипов лаванды и тимьяна – 35-40%. Установлено, что некоторые сорта и образцы мяты, розы эфиромасличной и душицы можно депонировать при испытанных режимах до 1,5-2 лет при сохранении не менее 55-78% жизнеспособных эксплантов.

После хранения при низкой положительной температуре в течение года и переноса эксплантов в обычные условия культивирования *in vitro* при 26°C для мяты, розы и тысячелистника уже в первом пассаже отмечено хорошее отрастание культур и высокие коэффициенты размножения (которые были сопоставимы с таковыми при клональном микроразмножении). Однако у лаванды и душицы для полного восстановления ростовой активности эксплантов и коэффициентов размножения необходимо было после депонирования проводить два пассажа в условиях культуральной комнаты. Для сортов мяты Ажурная и Бергамотная с помощью ISSR-анализа установлено генетическое соответствие исходных растений и микропобегов, полученных после года депонирования при низкой температуре.

Проведенные исследования явились основой для формирования коллекции *in vitro* изученных эфиромасличных растений, в которой поддерживаются более 50 сортов и перспективных селекционных образцов.

**Использование фонда коллекции микроводорослей и цианобактерий IPPAS
для развития инновационных биотехнологий**

*Мессинева Е.М., Козлова А.Ю., Маркелова А.Г., Миронов К.С., Куприянова Е.В.,
Зорина А.А., Синетова М.А., Лось Д.А.*

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
musculus@mail.ru

Коллекция микроводорослей и цианобактерий IPPAS была создана в институте физиологии растений в 1958 г. М. Г. Владимировой под руководством В.Е. Семеново с целью использования микроводорослей для фундаментальных и прикладных исследований. В настоящее время коллекция функционирует в составе лаборатории экофизиологии микроводорослей ИФР РАН, имеет международный статус (шифр IPPAS), входит в Европейскую ассоциацию коллекций культур ECCO, зарегистрирована во Всемирном центре данных о микроорганизмах (World Data Centre for Microorganisms, WDCM). В задачи коллекции IPPAS входит: формирование, пополнение и сохранение фонда непатогенных природных и генетически модифицированных штаммов цианобактерий и микроводорослей, которые могут стать производителями биотехнологически ценных метаболитов или модельными объектами фундаментальных исследований; идентификация коллекционных штаммов с использованием морфологических, ультраструктурных, биохимических и молекулярно-генетических методов; поиск оптимальных условий для хранения и роста имеющихся штаммов; систематизация информации о коллекционных штаммах, обновление каталога и обеспечение доступа пользователей к нему; разработка методов очистки поступивших штаммов от контаминантов; характеристика потенциальных штаммов-продуцентов ценных соединений методами геномики, протеомики и метаболомики.

На 2020 г. фонд коллекции включает в себя более 450 штаммов микроводорослей и цианобактерий. Эукариотические водоросли (около 300 штаммов) представлены главным образом различными зелеными микроводорослями, есть также представители отделов красных, эвгленовых, диатомовых, эустигамтофитовых и желто-зеленых водорослей. Среди штаммов цианобактерий (около 150 штаммов) есть как различные дикие формы, так и около 90 мутантов *Synechocystis* sp. PCC 6803 по регуляторным и метаболическим генам. В коллекции поддерживаются различные экстремофильные штаммы: термофилы из горячих источников, психрофилы – симбионты байкальских и беломорских губок, обитатели снежников, галофилы из соленых озер, ацидофилы из кальдер вулканов, алкалофилы из содовых озер. Представлены в коллекции также и штаммы, ставшие популярными модельными объектами в различных научных направлениях. Так, в настоящее время штаммы из коллекции IPPAS используются для изучения механизмов внутриклеточной регуляции (*Cyanothece*, штаммы дикого типа и мутанты *Synechocystis*, *Synechococcus*), CO₂-концентрирующего механизма (различные штаммы цианобактерий '*Microcoleus*', '*Rhabdoderma*' и зеленых микроводорослей *Chlorella*, *Chlamydomonas*). Были получены последовательности draft-геномов для семи штаммов цианобактерий из фонда коллекции, среди которых есть продуценты уникальных метаболитов. Штаммы коллекции используются также для разработки методов промышленного культивирования.

Коллекция микроводорослей IPPAS ИФР РАН по совокупности параметров является уникальной установкой для разработки биотехнологий получения биопрепаратов из микроводорослей и цианобактерий для нужд пищевой, фармацевтической, косметической промышленности. Имеющиеся и постоянно нарастающие объемы единиц хранения Коллекции позволяют сохранять генофонды видов и штаммов из разных сред обитания и климатических зон. Коллекция может предоставлять объекты исследования с заданными свойствами, гарантировать сохранение новых штаммов микроводорослей, полученных в результате работ по проекту в других организациях и имеющих биотехнологический потенциал. Коллекция имеет опыт сотрудничества с биотехнологическими и медицинскими компаниями с целью разработки технологии производства и получения конечных продуктов из охарактеризованных и отобранных штаммов.

Работа по разработке методов промышленного культивирования выполнялась на базе «Научно-производственного биотехнологического комплекса для проведения работ по изучению, сохранению и практическому применению культивируемых клеток и органов высших растений и микроводорослей» при финансовой поддержке Мегагранта Правительства Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1882).

К созданию коллекции каллусов дикорастущих растений Якутии

Охлопкова Ж.М.* , Кучарова Е.В.* , Антонова Е.Е.* , Иванова С.С.* , Попова А.К.* , Егоров Ю.А.* ,
Алексеева С.И.* , Сивцева С.В.* , Степанова М.А.* , Ноговицына П.А.* , Ишеев М.В.* , Ноговицын П.А.* ,
Слепцов Н.В.* , Андреева А.А.** , Григорьев Р.О.*** , Харитонов Т.Д.****

* Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова. Белинского ул., 58, Якутск, Россия.

** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. Ленинские горы, 1, Москва, Россия.

*** Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.

**** ООО ЭКОЖИЛСЕРВИС. Гурьянова ул., 2к3, Москва, Россия.

ZhannaOkh@yandex.ru

Культура клеток высших растений является уникальной экспериментально созданной биологической системой – популяцией дедифференцированных соматических клеток, имеющих возможность в определенных условиях регенерировать интактное растение, и служить модельным объектом для изучения многих биохимических и физиологических процессов в растительном организме. В связи с этим клеточные биотехнологии привносят неоценимый вклад по сохранению природных ресурсов редких, исчезающих, лекарственных видов растений. С другой стороны, технологии получения гомогенных каллусных биомасс дают перспективу к накоплению востребованных вторичных метаболитов растений, и предоставляют потенциальные субстанции для прикладных целей и разработок фармацевтической промышленности.

Объектом исследования и разработок являются дикорастущие растения, произрастающие на территории Якутии. Растительный материал (фитомасса) собирали в течение стационарно-маршрутных экспедиционных работ на территории Центральной, Южной и Северо-Восточной Якутии, включая богатое уникальными растениями Оймяконское нагорье в фазу полного цветения и плодоношения, с получением презентативного семенного материала (2011-2018гг.). Создана коллекция семенного материала видов растений, собранных к получению биотехнологически востребованных каллусных и суспензионных культур клеток. В число доминирующих представителей коллекции попали растения родов *Artemisia* L., *Dracocephalum* L. и *Phlojodicarpus* Turcz. ex Ledeb. Обоснованием к выбору объектов служили исследования по распространенности редких, исчезающих и лекарственных видов растений, и исследования их фитохимического потенциала. Так, например, из фитомассы *Dracocephalum palmatum* Steud. было выделено 23 соединения включая фенилпропаноиды, кумарины, флавоноиды и тритерпены, среди них восемь соединений (сальвианоловая кислота В, кафтаровая кислота, цихоровая кислота, умбеллиферон, эскулетин, апигенин-7-О-β-D-глюкуронопиранозид, изорхоифолин и лютеолин-4'-О-β-D-глюкопиранозид) были впервые обнаружены у представителей рода *Dracocephalum* L.

Все этапы исследования и разработки проводились на базе учебно-научной лаборатории «Молекулярно-генетические и клеточные технологии» Биологического отделения Института естественных наук СВФУ. Лаборатория располагает базовым и специальным профильным оборудованием для ведения культуральных, гистологических и фитохимических работ. Стерилизация сред, инструментов, посуды, растительного материала осуществлялись согласно опубликованным рекомендациям Р.Г. Бутенко. Способы получения каллусных культур по каждому виду растений апробированы с разным сочетанием фитогормонов и их концентрации. В качестве инициальных эксплантов были использованы листья, стебли и корни культивируемых в контролируемых условиях климатической камеры проростков из семян интактных растений. Порядок приготовления питательных сред осуществляли согласно методике Мурасиге-Скуга.

Созданы условия и разработаны протоколы к получению и сохранению коллекции каллусной культуры клеток дикорастущих растений Якутии. Наиболее приоритетными представлены каллусные культуры клеток дикорастущих растений родов *Dracocephalum*, *Artemisia*, *Phlojodicarpus*, аккумулярующие флавоноиды, сесквитерпеноидные лактоны, пиранокумарины и др. биотехнологически значимые вторичные метаболиты, востребованные для целей и прикладных разработок фармацевтической промышленности. Разработка способствует сохранению ресурсов редких и исчезающих видов северных и арктических растений благодаря биотехнологии создания коллекции каллусов, которые можно многократно размножать, культивировать в качестве носителей ценных субстанций – вторичных метаболитов, составляющих одну из главных основ при разработке новых перспективных лекарственных средств.

Выполнение работы поддержано: мероприятием 1.5. Программы развития СВФУ «Международная школа-экспедиция «Эколого-ресурсный и молекулярно-генетический мониторинг биологических ресурсов Севера» (2011, 2012, 2013); грантом РФФИ №12-04-06815/12 (2012); мероприятием 2.37.4 Программы развития СВФУ «Организация и проведение II-ой Международной конференции с элементами научной школы для молодежи «Перспективы фитобиотехнологии для улучшения качества жизни на Севере» (2014); проектным финансированием СВФУ на НИП №6 «Вторичные метаболиты видов полыней Якутии *in vivo* и *in vitro*: поиск, оптимизация и практическое приложение» (2017-2020).

Криобанк Института физиологии растений Российской академии наук и восстановление растительного материала после долговременного сохранения в жидком азоте

Высоцкая О.Н., Семенцова М.В., Осипова Е.С.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Ботаническая ул., 35, Москва, Россия.
styo@ippras.ru

Криобанк растений Института физиологии растений Российской академии наук был основан по инициативе Раисы Георгиевны Бутенко Александром Сергеевичем Поповым более трёх десятилетий тому назад. За прошедшие с тех пор годы сотрудники ИФР РАН разработали и запатентовали оригинальные методы криосохранения, которые в настоящее время эффективно используются в экспериментах по изучению криоустойчивости растительного материала и для пополнения шести специализированных коллекций криобанка ИФР РАН новыми образцами. В первой криоколлекции сохраняют штаммы культур клеток растений, во второй – меристематические апексы, изолированные из растений культивируемых *in vitro*. Образцы семян третьей криоколлекции принадлежат более 130 видам орхидей, произрастающих на разных континентах земного шара. Три других криоколлекций представлены многочисленными образцами семян редких и ценных растений, собранных сотрудниками ГБС РАН, ИФР РАН и «Аптекарского огорода» Ботанического сада МГУ. Многие растения, образцы которых сохраняют в криобанке ИФР РАН, имеют статус редких и исчезающих видов, занесенных в Красную Книгу Российской Федерации, Красную книгу СССР, списки СИТЕС и международные Красные Книги (The IUCN Red List of Threatened Species, The National Red List).

Важнейшей частью работы сотрудников, курирующих коллекции криобанка ИФР РАН, являются исследования влияния долговременного криосохранения на растительный материал различного происхождения. Первые образцы криобанка ИФР РАН были помещены в жидкий азот более трёх десятилетий тому назад под руководством Александра Сергеевича Попова и Раисы Георгиевны Бутенко. После долговременного криогенного сна из жизнеспособных клеток суспензионных культур были получены активно растущие каллусы моркови: *Daucus carota* L. (25 лет криосохранения), люцерны: *Medicago sativa* L. (27 лет) и пшеницы: *Triticum timopheevii* Zhuk. (24 года). После хранения в жидком азоте апексов, изолированных из размноженных *in vitro* растений, восстановлены культуры более 50 сортов земляники (*Fragaria* L.), малины, ежевики, княженики (*Rubus* L.), рябины (*Sorbus* L.) и жимолости (*Lonicera* L.). После высадки в грунт посткриогенные растения земляники, малины, ежевики и рябины цвели и плодоносили. Семена растений из криоколлекций ИФР РАН, ГБС РАН и «Аптекарского огорода» МГУ, принадлежащие семействам *Alliaceae*, *Campanulaceae*, *Ericaceae*, *Iridaceae*, *Fabaceae*, *Liliaceae*, *Melanthiaceae* и *Poaceae*, после длительного криогенного хранения (1-30 лет) прорастали как в асептических условиях, так и в почвенной смеси без соблюдения стерильных условий. Таким образом, доказано, что многочисленные образцы криоустойчивого растительного материала, принадлежащие к различным систематическим группам растений, сохраняли свою жизнеспособность после многолетнего хранения в криобанке ИФР РАН.

За десятилетия упорного труда сотрудники группы криосохранения растений и отдела биологии клетки и биотехнологии ИФР РАН, основанного Раисой Георгиевной Бутенко, разработали и запатентовали многочисленные методы долговременного хранения растительного материала (АС №№ 865245, 1097875, 114673, 1440137, 1522005, 1711735). В последние годы сотрудниками ИФР РАН были получены патенты РФ (№№ 2220563, 2248121, 2302107, 2564565) и Евразийский патент (ЕАПО 036602), которые представляют собой технологии сохранения коллекций сортов и клонов плодовых, ягодных и декоративных растений как при ингибированном росте *in vitro*, так и в состоянии криогенного сна. На основе опыта нескольких поколений научных сотрудников ИФР РАН создан и активно используется уникальный комплекс методов криосохранения, культивирования и депонирования *in vitro* растений, который позволяет эффективно и надёжно сохранять разнообразные коллекции устойчивых к замораживанию образцов растительного материала.

Работа по формированию криобанка ИФР РАН была поддержана Программами фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа», «Биологическое разнообразие», Программой ЕвразЭС: 2011-16-МЦП/03», ЕГИСУ НИОКТР: АААА-А19-119042390111-0 и Министерством науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания (тема №: 121041200194-7).

Культура *in vitro* как потенциальный метод восстановления древних растений из криосферы Земли

Крамина Т.Е.* , Коппель Л.А.* , Карпова Ю.А.** , Гахова Э.Н.** , Фесенко Е.Е.**

* Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. Ленинские горы, 1, Москва, Россия;

** Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН. Институтская ул., 3, Пущино, Россия.

koppellar@gmail.com

Вечномерзлотные плейстоценовые толщи Колымско-Индибирской низменности в Якутии содержат многочисленный и разнообразный палеоэкологический материал и представляют собой потенциальный источник генетического материала древних организмов с превосходной сохранностью древней ДНК. Восстановление древних растений может дать исключительный материал для понимания хода эволюционного процесса, для точных реконструкций условий плейстоценового периода. В нижнем течении реки Колымы в урочище Дуванный Яр из ископаемых норк берингийского суслика (*Urocitellus parryii*) с глубины 38 метров под слоем вечной мерзлоты сотрудники лаборатории криологии почв Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН извлекли семена более чем 60 видов растений (Gubin and Khasanov, 1996), возраст которых, согласно радиоуглеродному датированию, составляет более 30000 лет.

В лаборатории криобиологии и биофизики воды Института биофизики клетки РАН часть ископаемых семян, характеризовавшихся высокой сохранностью, была введена в культуру тканей *in vitro*. Удалось прорастить семена щавеля (*Rumex arcticus*) до стадии развития семядолей, затем индуцировать каллусогенез в эксплантах из семядолей, высаженных на агаровую среду. В 2012 году с использованием культуры тканей и микроклонального размножения впервые в мире удалось получить растения-регенеранты смолевки (*Silene sp.*), которые зацветали и давали семена с высокой всхожестью. Органогенез побегов был индуцирован *in vitro* непосредственно из фрагментов плацентарной ткани незрелых плодов возрастом 31800±300 лет. Для инициации органогенеза были использованы модифицированные питательные среды Мурасиге-Скуга и Андерсона (Yashina et al., 2012). Авторы определили растения как *Silene stenophylla*, однако, такая идентификация вида была подвергнута сомнению Oxelman et al. (2012) на основании ряда морфологических признаков. Было высказано предположение, что древнее растение относится к группе *S. linnaeana*, а по ареалу распространения – к *S. samojedora*.

Таким образом, особый интерес представляла задача уточнить видовую принадлежность регенерантов смолевки, полученных из ископаемого позднеплейстоценового и современного материала. Для этого нами был привлечен современный гербарный материал по секциям *Graminiformes* и *Physolychnis* рода *Silene* L. с территории Сибири и Дальнего Востока. Изучено 42 образца 8 видов: секция *Graminiformes*: *S. jensseensis* Willd. и *S. stenophylla* Ledeb.; секция *Physolychnis*: *S. ajanensis* (Regel et Tiling) Vorosch., *S. linnaeana* Vorosch., *S. samojedora* (Sambuk) V.Oxelman, *S. uralensis* (Rupr.) Vocquet., *S. villosula* (Trautv.) V.V.Petrovsky et Elven и *S. violascens* (Tolm.) V.V.Petrovsky et Elven. Проведен морфологический анализ образцов. Для установления филогенетического положения регенерантов внутри рода *Silene* проведен молекулярно-филогенетический анализ тех же образцов и регенерантов двух линий (древних и современных растений) по ITS 1-2 ядерной рДНК и интрону *rps16* пластидной ДНК с привлечением обширного материала из Генбанка, охватывающего основное таксономическое разнообразие рода. Анализ по ITS 1-2 включал 107 образцов, по *rps16* – 92 образца. Сделан вывод о том, что обе линии регенерантов относятся к видовому комплексу *Silene linnaeana sensu lato* секции *Physolychnis* подрода *Behenantha*, а не к виду *Silene stenophylla* из секции *Graminiformes* (секции *Siphonomorpha* s. l.) подрода *Silene*, как предполагалось ранее (Yashina et al., 2012).

В процессе работ по восстановлению древней смолевки отработаны ключевые подходы, основанные на методе культуры тканей растений *in vitro*, с помощью которых можно индуцировать прорастание ископаемых семян либо иницировать каллусообразование с последующей дифференциацией вплоть до полной регенерации растения. Таким образом, метод культуры *in vitro* предоставляет возможности получить новые древние регенеранты на основе биоматериала, извлеченного из ископаемых нор грызунов в ледниковых отложениях северо-востока Сибири. Молекулярно-генетические и филогенетические подходы позволяют получить качественную сборку древних геномов и определить точное таксономическое положение регенерантов. На основе сравнения геномов ископаемых и современных регенерантов можно оценивать скорость и характер эволюции видов растений в позднем плейстоцене и голоцене в условиях Арктики.

Подходы к сохранению генофонда рода *Syringa* L. в условиях *in vitro*

Королева О.В.

Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, Ботаническая ул., 4, Москва, Россия.
elaem@yandex.ru

Сохранение биоразнообразия растений – одна из основных задач ботанических садов. Использование биотехнологических методов, в частности создание коллекций *in vitro*, является наиболее эффективным методом сохранения генофонда растений *ex situ*.

Сирень является одним из наиболее распространенных декоративных древесных растений. Род *Syringa* L. относится к семейству маслиновые (Oleaceae) и согласно международному регистру насчитывает по последним данным 25 видов и 2600 сортов.

С целью сохранения достижений отечественной и зарубежной селекции создают многочисленные полевые коллекции, но иногда из-за неблагоприятного воздействия внешних факторов бывают утрачены уникальные сорта. Поэтому в последнее время все большее значение приобретают биотехнологические методы сохранения генофонда.

В Главном ботаническом саду им. Н.В. Цицина РАН находится наиболее представительный в России генетический банк растений *in vitro*, в частности рода *Syringa*. Коллекция сирени *in vitro* насчитывает более 150 сортов и отборных форм всех цветковых групп и как отечественной, так и зарубежной селекции. Генбанк постоянно пополняется новыми сортами и отборными формами, что имеет важное значение для сохранения генофонда мировой коллекции сирени.

В ходе исследований была усовершенствована методика клонального микроразмножения представителей рода *Syringa* на всех этапах культивирования.

Изучены различные факторы, оказывающие воздействие на развитие растений-регенерантов в условиях *in vitro*. Установлено преобладающее влияние генетических особенностей на морфогенетический потенциал представителей рода *Syringa*. Наибольшим регенерационным потенциалом отличаются сорта Ami Schott (коэффициент размножения – 9,2), Красавица Москвы (10,4), Лунный Свет (10,5), Жемчужина (9,1).

Сорта сирени были разделены на группы в зависимости от реализации их морфогенетического потенциала. Выявлена корреляция скорости и особенностей регенерации растений *in vitro* с их развитием в условиях *ex situ*.

Изучено влияние минеральных основ питательных сред (Murashige and Skoog, Quorin and Lepoivre), источников углеводного питания (сахароза, глюкоза), различных гормонов и их концентраций (6-бензиламинопурина (6-БАП), индолилуксусная кислота (ИУК)) на реализацию морфогенетического потенциала у разных сортов сирени. В результате были оптимизированы составы питательных сред для определенных групп сортов. Для культивирования большинства сортов *Syringa vulgaris* рекомендуется использовать питательную среду Quorin and Lepoivre, с использованием сахарозы в качестве источника углеводного питания и совместного применения 6-бензиламинопурина в концентрации 0,5-1,0 мг/л и индолилуксусной кислоты в концентрации 0,01 мг/л.

Было изучено влияние хелатных соединений (Fe(III)-EDDHA, Fe(III)-EDTA) в качестве источника железа в составе питательной среды на рост, развитие и корнеобразование разных сортов сирени в условиях *in vitro*. Использование Fe(III)-EDDHA в составе питательной среды было отмечено перспективным на этапе ризогенеза: было отмечено лучшее корнеобразование (92%) по сравнению со средой с Fe(III)-EDTA (70%) вне зависимости от используемого регулятора роста.

Одним из наиболее эффективных и простых способов средне- и долговременного сохранения генофонда растений является культивирование регенерантов в условиях замедленного роста. Установлено, что состав питательной среды оказывает существенное влияние на длительность периода субкультивирования, сохранение жизнеспособности растений и их регенерацию после депонирования. Было изучено влияние концентраций минеральных солей и осмотика (сахарозы) на жизнеспособность растений, находящихся на депонировании в условиях замедленного роста в течение 6, 12, 24 и более месяцев. Оптимальным для долговременного сохранения растений в условиях *in vitro* является использование питательной среды с уменьшенным содержанием минеральных солей (1/2 MS) и концентрацией сахарозы 40 г/л. Проводятся исследования по изучению воздействия хлорхолинхлорида на жизнеспособность растений-регенерантов при сохранении при низких положительных температурах (6-10°C) и пониженной освещенности (500-1500 лк) с целью выяснения целесообразности его использования для долговременного хранения.

В настоящее время разрабатываются подходы к криоконсервации представителей рода *Syringa*: проведена оценка жизнеспособности эксплантов после капсулирования и высушивания в потоках стерильного воздуха в течении 3 часов для последующего применения методов криосохранения, проводится подбор питательных сред для этапа прекультивирования. Начаты работы по молекулярно-генетическому маркированию коллекции сирени.

Работа выполнена в рамках ГЗ ГБС РАН (№18-118021490111-5).

Развитие Всероссийской Коллекции Культур Клеток Высших Растений (ВККК ВР) как основы для фундаментальных исследований и биотехнологического производства фитопрепаратов

Попова Е.В.^{*}, Куличенко И.Е.^{*}, Фоменков А.А.^{*}, Носов А.В.^{*}, Носов А.М.^{*,**}

^{*} Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, 127276.

^{**} Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234.
Elena_aygol@hotmail.com

Культуры клеток растений широко используются в качестве исходного сырья для биотехнологического получения различных биологически активных веществ (БАВ), а также в качестве модельных объектов в фундаментальных исследованиях в области физиологии и вторичного метаболизма растений, цитологии, биоинженерии. Преимуществом культур клеток в качестве основы для биотехнологических производств являются стабильность роста и биохимического состава, достигаемые благодаря выращиванию в стерильных контролируемых условиях, гораздо более быстрое, по сравнению с растениями в природе, накопление биомассы, а также доступность в течение всего календарного года вне зависимости от условий окружающей среды. При этом необходимым этапом как фундаментальных, так и прикладных работ является получение исходных штаммов культур клеток высших растений и длительное поддержание уникальных отселектированных штаммов в активном состоянии без снижения жизнеспособности и способности к синтезу БАВ. Таким образом, поддержание и развитие Всероссийской Коллекции Культур Клеток Высших Растений (ВККК ВР), ядро которой составляют специально отселектированные штаммы с повышенным или измененным по сравнению с интактными растениями содержанием БАВ и модельные культуры, является стратегически важным направлением. Созданная в 1985 г. при Отделе биологии клетки и биотехнологии ИФР РАН, ВККК ВР содержит как модельные штаммы – объекты для фундаментальных исследований по физиологии растений, так и продуценты биологически активных соединений (гинзенозиды и другие тритерпеновые гликозиды, фураностаноловые гликозиды, экистероиды, фенольные соединения, алкалоиды), а также штаммы редких и эндемичных видов растений. В том числе это штаммы-сверхпродуценты диоскореи дельтовидной (содержание фураностаноловых гликозидов до 12% к сухой биомассе клеток), различных видов аралиевых (продуцентов тритерпеновых гликозидов), нескольких видов тиса (продуцентов противоопухолевых таксоидов) и других. В 2015 г. Всероссийская коллекция культур клеток высших растений ИФР РАН была переведена в разряд уникальных научных установок (УНУ).

За длительный период существования (более 35 лет), а также благодаря большому (даже по сравнению с ведущими мировыми коллекциями) генетическому разнообразию сохраняемых штаммов, в Коллекции накоплен уникальный объем данных, потенциально позволяющих сделать вывод о стабильности культур клеток растений различных родов/семейств при длительном поддержании в процессе активного роста. Для проверки этой теории, сотрудниками коллекции продолжается сравнительный анализ данных о стабильности ростовых, цитологических и биосинтетических характеристик культур клеток-продуцентов. В качестве первого модельного объекта был взят штамм культур клеток женьшеня японского, *Panax japonicus var. repens*, продуцента тритерпеновых гликозидов.

Еще одной ключевой задачей является расширение коллекции путем получения новых штаммов культур редких лекарственных растений, их характеристика и депонирование в коллекцию с последующей оценкой перспектив их использования в биотехнологическом производстве и для научных исследований. Только за последний год были получены 16 новых линий культур клеток 9 видов высших растений, являющихся эндемиками, редкими или лекарственными. В том числе, это культуры видов *Dioscorea bulbifera*, *Polyscias filicifolia*, *Rubus arcticus*, *Rubus chamaemorus*, *Sutherlandia frutescens*, *Cladochaeta candidissima*, *Thuja occidentalis*, *Olea europaea*, *Alhagi persarum*, *Alcea kusjariensis*. Для видов *S. candidissima* и культуры клеток получены впервые в мире. Проведена работа по изучению ростовых характеристик полученных культур. В настоящее время проводится скрининг на наличие в этих культурах клеток ценных БАВ.

Работы были проведены при финансовой поддержке Мегагранта Министерства науки и высшего образования РФ, договор № 075-15-2019-1882, на базе «Научно-производственного биотехнологического комплекса для проведения работ по изучению, сохранению и практическому применению культивируемых клеток и органов высших растений и микроводорослей» с использованием оборудования Уникальной научной установки «Всероссийская коллекция культур клеток высших растений» ИФР РАН.

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ

Allagulova Ch.	25	Ахунов А.А.	199
Beckett R.P.	133	Ашихмин А.А.	31, 131
Brewin N.J.	222	Бабаева Д.Т.	199
Calugaru-Spataru T.	22	Бабак О.Г.	168
Caus M.	22	Бажина Е.В.	152
Садвакасова А.К.	324	Баик А.С.	189
Dascaliuc A.	22	Бакулина А.В.	269
Fedorova K.	25	Балабанов П.А.	188
Garipova S.	25	Балке Г.У.	215
Garshina D.	24, 25	Балнокин Ю.В.	236
Hafizova R.	24	Балтин С.М.	229, 295
Ivanov S.	24	Балуч Х.	324
Ivanov V.B.	28	Балясный И.В.	317
Lastochkina O.	24, 25	Баматов И.М.	177
Levin D.B.	272, 291	Баранова Г.Б.	92
Pusenkova L.	24, 25	Баранова Е.Н.	92, 129, 168, 228, 312
Pushin A.S.	179	Барашкова А.С.	217
Shcherbakov A.V.	28	Бассарская Е.М.	90
Usmanov I.Y.U.	28	Батова Ю.В.	72
Абильфазова Ю.С.	233	Батуева Е.Д.	279
Авальбаев А.М.	112, 173, 174	Батукаев А.А.	30
Аверчева О.В.	90	Баштовая С.И.	118
Авксентьева О.А.	279	Бедарев В.А.	175
Агеева М.Н.	99, 146	Бедбенов В.С.	313, 352
Адамчик Б.	121	Безрукова М.В.	138
Азарин К.В.	70	Белавин П.А.	218, 335
Азаркович М.И.	193, 305	Белимов А.А.	102
Аксенова М.А.	290	Белых Е.С.	195
Аксенова Р.С.	322	Беляева А.И.	60
Алвасел С.	206	Бенковская Г.В.	200
Алексеев В.Ю.	154	Бердников Р.В.	331
Алексеева С.И.	117, 358	Березина Е.В.	109, 328
Алексеева-Попова Н.В.	60	Берестова Е.В.	76
Алиева З.М.	183, 311	Бертова А.Д.	264
Аллагулова Ч.Р.	112, 173, 174	Бибикова Т.Н.	175
Аллахвердиев С.И.	206, 210, 224, 324, 350	Билова Т.Е.	103, 139, 198, 215
Алшихи А.	228	Биркемайер К.	343
Алыбаев С.Д.	235	Бисенбаев А.К.	235
Амикова Е.А.	333	Битаршвили С.В.	115
Анапиев Б.Б.	77	Битюцкий Н.П.	202, 252
Андреева А.А.	263, 358	Благова Д.К.	200
Андреева И.Н.	43	Блинков А.О.	73
Аникина Л.М.	202	Бобровникова Л.А.	348
Анисимов А.А.	156, 247, 349	Богданова Е.С.	124, 220
Антал Т.К.	88	Богоутдинова Л.Р.	92, 228, 312
Антонова Е.Е.	282, 358	Бойко Е.В.	66, 111
Арабова Л.И.	41	Бойцова Е.А.	343
Арбузова Г.А.	77	Болатхан К.	324
Арслангереева М.И.	183	Болондинский В.К.	196
Артюхин А.Е.	329	Бондарев Н.И.	306
Артюхов А.А.	121	Бондарева Т.А.	306
Архимандритова (Теплякова) С.Б.	341	Бондаренко В.Ю.	207
Архипов Д.В.	142	Борисова Г.Г.	47
Атамбире А.	47	Борисова-Мубаракшина М.М.	114
Ахтямова Г.А.	181	Бородина М.Н.	201

Боталова К.И.....	44	Галдина Т.Е.....	63
Брейгина М.А.....	244	Галибина Н.А.....	26, 56, 116, 157, 162, 201, 254, 276
Брилкина А.А.....	99, 109, 146, 328	Галиханова У.А.....	280
Будаговская Н.В.....	143	Галишев Б.А.....	296
Бужоряну Н.С.....	71	Ганчева М.С.....	100
Бургутин А.Б.....	292	Гарипова М.И.....	48
Бурляева М.О.....	52	Гаркуша С.В.....	317
Бурмистрова Н.А.....	228	Гармаш Е.В.....	195
Бурундукова О.Л.....	250	Гахова Э.Н.....	360
Бурханова Г.Ф.....	342	Генерозова И.П.....	226
Бурыгин Г.Л.....	277, 278, 302, 334	Гераськин С.А.....	115
Бухарина И.Л.....	58	Гетман И.А.....	57, 292
Буцанец П.А.....	189	Гилевская К.С.....	59
Быковская И.А.....	68, 234	Глаголева Е.С.....	298, 319, 351
Быстрова Е.И.....	130	Глазунов Г.П.....	118, 150
Бычков И.А.....	197	Глеба Ю.Ю.....	20
Вайнштейн А.М.....	180	Глоба Е.Б.....	307
Валеева Л.Р.....	167	Гоглев Ю.В.....	102
Ванкова Р.....	243	Гоголева Н.Е.....	102
Ванюшин Б.Ф.....	129	Голденкова-Павлова И.В.....	27, 185, 225
Вартапетян А.Б.....	34	Голиванов Я.Ю.....	304
Василев А.В.....	349	Голованова Т.И.....	54
Васильева И.В.....	104	Головацкая И.Ф.....	66, 111, 275, 353
Васко Видал А.....	113	Головко Т.К.....	33, 251
Вацерионова Е.О.....	214	Гончарова Э.А.....	136, 194, 242
Вебер Е.И.....	64	Гончарук Е.А.....	322
Велегжанинов И.О.....	195	Горбенко И.В.....	23
Венжик Ю.В.....	69	Горе А.И.....	81
Верещагина Ю.В.....	273	Горелова Е.И.....	212
Вертебный В.Е.....	202	Горелова С.В.....	79
Вершинина З.Р.....	227	Горина С.С.....	55, 182
Веселов А.П.....	36, 76, 146, 149, 245	Горисева О.А.....	301
Веселов Д.С.....	39, 187	Горпенченко Т.Ю.....	273
Вессйоханн Л.А.....	103, 215	Горшков В.Ю.....	102, 119
Вестерманн Б.....	113	Горшков О.В.....	108, 190
Ветошкина Д.В.....	114, 256	Горшкова Д.С.....	232
Ветрова Я.А.....	328	Горшкова Т.А.....	37, 108, 127, 190
Ветчинникова Л.В.....	314	Горьков А.А.....	45
Власова И.И.....	223	Горькова И.В.....	45
Власова Т.А.....	288	Грабельных О.И.....	49, 50
Воденеев В.А.....	99, 109	Гречаник В.И.....	337
Войников В.К.....	77, 294	Гречкин А.Н.....	55, 182
Волгушева А.А.....	88	Григориади А.С.....	163
Волкова П.Ю.....	110, 115, 219, 258	Григорович Л.М.....	203
Волошин Р.А.....	210	Григорчук В.П.....	273
Волошина Т.В.....	213	Григорьев Р.О.....	358
Воронин П.Ю.....	51, 231	Григорян М.А.....	302
Воронков А.С.....	141	Гринберг М.А.....	99
Воропаева О.В.....	47	Гришина Т.В.....	113, 215
Ву В.З.....	198	Грищенко Д.С.....	253
Высоцкая Л.Б.....	39, 187	Губанова Т.Б.....	246
Высоцкая О.Н.....	359	Гулевич А.А.....	228, 312
Вялков В.В.....	84	Гуляева Е.Н.....	254
Габель Б.В.....	352	Гумерова Г.Р.....	329
Габрелян А.К.....	313	Гуревич Ю.Л.....	281
Габрелян Д.А.....	313	Гусева Е.Д.....	132, 171
Габриелян А.К.....	352	Давыдова Д.К.....	47
Габриелян Д.А.....	352	Даминова А.И.....	274

Дамирова К.А.	311	Зальштедт Э.	121
Данилова Е.Д.	80, 338	Захарова Е.В.	205, 266
Дейграф С.В.	292	Здиорук Н.В.	81
Дейнеко Е.В.	218, 335	Здобнова Т.А.	99
Дейнеко И.В.	185	Зинц А.	103, 113
Демидова Е.В.	307	Злобин И.Е.	128, 243
Демидчик В.В.	207, 238	Злотников А.К.	46
Демченко К.Н.	103, 132, 171, 215	Злотников К.М.	46
Денисова А.Ю.	334	Зобова Н.В.	281
Дерябин А.Н.	69	Зорина А.А.	40, 283, 308, 357
Джиан-Рен Шен.	224	Ибрагимова С.М.	167
Династия Е.М.	113	Иванов Б.Н.	114, 256
Добрев П.	243	Иванов В.Б.	130
Додуева И.Е.	100	Иванов И.М.	323
Долгов С.В.	178, 179, 180, 209	Иванов Р.С.	39
Донская М.В.	336	Иванов Ю.В.	243
Дорн М.	215	Иванова А.Н.	54
Дрозденко Т.В.	88	Иванова Д.С.	56
Дроздова И.В.	60	Иванова С.С.	358
Дуарте Г.Т.	110	Иванова Т.В.	141
Дударева Л.В.	97	Ивлев А.А.	91, 120
Дуплий Н.Г.	70	Игнатенко А.А.	204
Дыкман Л.А.	69	Игнатенко Р.В.	260, 276
Дымова О.В.	195, 251	Игнатова Л.К.	114, 256
Евдокимова М.В.	150	Идрисова М.	177, 310
Евменьева А.А.	244	Икконен Е.Н.	89, 96, 268
Евсеева Н.В.	277, 278, 302, 334	Илинг К.	103, 215
Евсюков С.В.	228, 312	Иллинг К.	113
Егоров Ю.А.	358	Ильина Е.Л.	132, 171
Егорова А.М.	257	Ильинов А.А.	162
Егорова Н.А.	356	Имеев М.В.	358
Еилджи М.	228	Исламова Н.А.	58
Елацков Ю.	101	Ишембитова К.Р.	153
Елацкова А.	101	Йошитакэ Й.	167
Емельянов В.В.	264, 286, 345	Кабардаева К.В.	185, 225
Еремеева Е.А.	299, 351	Кадырбаев М.К.	66, 353
Еремченко О.З.	44	Казакова А.С.	94
Ермилова Е.В.	321	Казакова Е.А.	258
Ермошин А.А.	188, 241, 344	Казнина Н.М.	72
Ершова А.Н.	106	Калацкая Ж.Н.	59, 78
Ершова М.А.	276	Калашникова Е.А.	349
Ефимова М.В.	64, 80, 107, 166, 338	Калимова И.Б.	60
Жармухамедов С.К.	206, 210	Кальясова Е.А.	76
Живухина Е.А.	290	Камакина Е.С.	87
Жигалова Т.В.	90	Канаш Е.В.	151
Жигачева И.В.	226	Караваева А.В.	158
Жмурко В.В.	249	Караджан М.	206
Жуков В.А.	103, 215	Караджан Н.	206
Жуковская Н.В.	53, 130	Каргаполова К.Ю.	277
Журавлева А.С.	202	Карпец Ю.В.	122
Журавлева Д.Н.	79	Карпова Ю.А.	360
Журикова Е.М.	114	Карпычев И.В.	228, 236, 285, 312
Заядан Б.К.	324	Карташов А.В.	53, 128, 243
Загорская А.А.	218, 335	Карягин В.В.	105
Загорская М.С.	356	Касаткин М.Ю.	145
Загоскина Н.В.	347	Касьянова А.М.	70
Заднепровская Е.В.	350	Кикеева А.В.	67
Зайцева Ю.В.	95	Кильчевский А.В.	168

Ким А.	103, 215	Кременецкая И.П.	123
Киракосян Р.Н.	349	Креславский В.Д.	31, 85, 128, 206, 243
Кирдянов А.В.	121	Кривобок А.С.	175
Кириллова И.Г.	87	Крикунова Н.И.	226
Кириченко К.А.	77	Крицкий М.С.	98
Кирпичникова А.А.	286, 341	Крутова Е.К.	36, 149
Кирюшкин А.С.	132, 171	Крутова Н.Ю.	245
Киселев Е.Н.	248	Крылова Е.А.	52, 139
Киселева А.С.	280	Куделина Т.Н.	175
Киселева Г.К.	158	Кудоярова Г.Р.	187
Киселева И.С.	126, 188, 241, 250	Кудрякова Н.В.	197, 263
Кладова А.А.	296	Кудряшов А.А.	229, 284
Клементьева А.А.	178	Кузнецов В.В.	197, 263, 335
Клемешова К.В.	211	Кузнецов Вл.В.	17, 128, 243
Клименко Е.С.	244	Кузнецова А.В.	113
Клушевская Е.С.	184	Кузнецова Д.В.	109
Клычников О.И.	283, 308	Кузнецова Н.Ф.	184
Клюшин А.Г.	323	Кузнецова Т.Ю.	314
Ковалев В.С.	317	Кукарских Г.П.	88
Ковалева Л.В.	205, 266	Кулдошева К.	199
Коврижных В.В.	135	Куликовская В.И.	59
Коджи Като	224	Куличенко И.Е.	326, 362
Кожевникова А.Д.	53, 144	Кулуев Б.Р.	329
Козлова А.Ю.	357	Кульминская А.А.	108
Козлова Л.В.	37, 108	Кумахова Т.Х.	141
Козлова Т.А.	160, 291, 350	Куприянова Е.В.	271, 352, 357
Колачевская О.О.	292	Кураков А.В.	46
Колбанов Д.В.	207	Курамшина З.М.	74
Колесников О.В.	207	Курбатов А.А.	89
Колесникова Е.О.	331	Куркиев К.У.	183
Коломейчук Л.В.	64	Курносова Т.Л.	68, 234
Колупаев Ю.Е.	122, 212	Кучарова Е.В.	282, 358
Кольбаева Г.А.	235	Лавреха В.В.	29
Коннова Т.А.	102	Ладейнова М.М.	109
Коновалова И.О.	175	Ламан Н.А.	59, 78
Коновалова Т.Ю.	355	Ланцова Н.В.	182
Константинов Ю.М.	23	Лапина Т.В.	321
Константинова С.В.	298, 351	Лаптев Н.И.	66
Копанина А.В.	214, 223	Лапшин Н.К.	192
Коппель Л.А.	360	Ларикова Ю.С.	208
Корнацкий С.А.	330	Лебедев В.Г.	93
Корнейкова М.В.	123	Лексин И.Ю.	133
Коробко В.В.	145	Лелишенцев А.А.	315
Королева О.В.	361	Лемешева В.С.	343
Корытько Л.А.	83	Леонова Л.Е.	113
Косарева А.В.	146	Леусенко А.В.	283
Кособрюхов А.А.	85	Липский А.Х.	19
Косогова Т.М.	191, 262	Литвинский В.А.	91, 120
Костюкова Ю.А.	287	Лобачев Ю.В.	278
Котенкова Е.А.	299	Ломакин М.П.	120
Котлова Е.Р.	220	Ломин С.Н.	57, 142, 159, 292
Кочетова Г.В.	90	Лосев М.Р.	100
Кочи Т.	167	Лось Д.А.	324, 352, 357
Кочкин Д.В.	296, 298, 299, 307, 316, 319, 323, 326, 327, 351	Луговая А.А.	122
Крамина Т.Е.	360	Лукашева Е.М.	103, 215
Красковский А.Н.	59	Лукин С.М.	46
Красноперова Е.Ю.	229, 237	Лунькова М.К.	351
		Лунькова Н.Ф.	130, 228






Лутова Л.А.	100, 186, 229, 237, 284, 295	Мохамед Г.Р.	340
Луцкий Е.О.	84, 289	Мошков И.Е.	69
Лыкова Т.Ю.	198	Моценская Ю.Л.	26, 116, 157, 201
Любушкина И.В.	77, 294	Мудрилов М.А.	109
Люшкевич В.А.	78	Мурашов С.В.	242
Маевская С.Н.	231	Мурган О.К.	107
Мазина А.Б.	35	Мусабилова Ю.Р.	273
Макаренко Е.С.	219	Мусин Х.Г.	329
Макеева И.Ю.	230	Мустафаев О.Н.	27, 185
Максимов А.П.	216	Мухаматдинова Е.А.	338
Максимов И.В.	200, 342	Мшенская Н.С.	245
Максимов Т.Х.	216	Мясоедов Н.А.	236
Макурина О.Н.	124	Наврузов С.Б.	199
Малаева Е.В.	333	Надеева-Журикова Е.М.	256
Малева М.Г.	47	Назаренко Л.В.	155, 322
Малеева Ю.В.	98	Назарова Я.И.	269
Малиновский А.В.	51, 231	Назипова А.Р.	108
Малишевский М.Р.	149	Найдов И.А.	114, 131, 256
Малунова М.В.	315, 325	Наоюки Миязаки	224
Мальшев Р.В.	195	Наранова Т.В.	213
Мамаев А.В.	96, 147, 148	Настинова Г.Э.	333
Мамаева А.С.	167	Начева Л.Р.	349
Мамедова Д.С.	175	Неверов К.В.	98, 140
Мамедова К.К.	311	Недведь Е.Л.	59, 78
Мамонтова Т.В.	215	Ненько Н.И.	158
Манухина Я.А.	258	Нестеров В.Н.	124, 220
Маракаев О.А.	95, 221	Неугодникова Е.А.	344
Маренкова Т.В.	335	Нечаева М.В.	66, 111, 275
Маркелова А.Г.	313, 352, 357	Нечаева Т.Л.	290
Марковская Е.Ф.	123, 164, 253	Никерова К.М.	67, 116, 157, 201, 276
Масленникова Д.Р.	112, 138	Николаева М.А.	35
Масягина О.В.	121	Николаева М.К.	231
Матаморос М.А.	103, 215	Никоноров Ю.М.	154
Матора Л.Ю.	278, 334	Новикова Г.В.	40, 170, 283, 303, 308
Матулкин Д.К.	45	Новицкая Л.Л.	26, 116, 157, 201
Машкин И.А.	83	Новичонок Е.В.	67, 276
Медведев С.С.	139, 261	Ноговицын П.А.	358
Медведков М.С.	247	Ноговицына П.А.	125, 358
Мельникова А.А.	306	Носов А.В.	40, 170, 296, 303, 326, 351, 362
Мельникова Е.В.	83	Носов А.М.	18, 296, 299, 316, 319, 323, 326, 327, 351, 362
Меняйло О.В.	121	Нохсоров В.В.	97
Мессинева Е.М.	357	Нсенгиюмба Д.С.	188
Метелева М.К.	121	Нурматова М.И.	199
Метрофанов Е.П.	248	Нухманова П.Ш.	311
Микшина П.В.	127	Обручева Н.В.	169
Минибаева Ф.В.	35, 133	Обухов Ю.Н.	98
Миронов К.С.	40, 352, 357	Овчинников И.А.	59
Миронова В.В.	29	Огородникова А.В.	119
Мирошниченко Д.Н.	178, 179	Огородникова С.Ю.	269
Митсуда Н.	190	Омельянчук Н.А.	29
Митюшкина Т.Ю.	180, 209	Осипова Е.В.	102
Михайлова Е.В.	154, 329	Осипова Е.С.	359
Михалёв Е.В.	149	Осипова Л.В.	68, 234
Мишко А.Е.	84, 289	Осмоловская Н.Г.	198, 215
Мокшина Н.Е.	190	Охлопкова Ж.М.	117, 125, 282, 358
Молканова О.И.	355	Павличенко В.В.	239
Моршнева А.В.	273	Павловская Н.Е.	45
Мотылева С.М.	242		

Пак М.Э.....	297, 318	Пушин А.С.....	180
Палий А.Е.....	246	Пшеницына Т.С.....	248, 317
Палий И.Н.....	246	Пшибытко Н.Л.....	255
Панов Ю.М.....	315	Пыльцин Д.А.....	62
Панова Г.Г.....	202	Раева-Богословская Е.Н.....	300
Панфилова О.Ф.....	259	Раевский Б.В.....	260, 276
Парфирова О.И.....	119	Ракитин В.Ю.....	105, 170, 303
Парыгина А.Д.....	90	Ракитина Т.Я.....	105
Пастернак Т.П.....	29	Ралдугина Г.Н.....	228, 312
Пахолкова М.С.....	348	Раля Т.Х.....	81
Пахомова А.П.....	297	Рассабина А.Е.....	133
Пахомова В.М.....	274	Рассохина И.И.....	95, 267
Пашковский П.П.....	31, 128, 159, 243	Рахманкулова З.Ф.....	51
Перк А.А.....	104	Репкина Н.С.....	204
Пермякова Н.В.....	335	Решетник Г.В.....	172
Петров Д.В.....	293	Решетняк Н.В.....	262
Петров К.А.....	97	Ринне-Гармстон К.....	121
Петрова А.А.....	37, 108	Рио Нагао.....	224
Петрова А.Г.....	123	Рогожин Е.А.....	217
Петрова Н.Е.....	314	Родионова М.В.....	206
Петрова О.Е.....	119	Розенцвет О.А.....	124, 220
Петрушин А.Ф.....	248	Розина С.А.....	124
Петрушин И.С.....	23	Розов С.М.....	218, 335
Печёрина А.А.....	99	Романов Г.А.....	57, 142, 292
Пивоварова Н.С.....	293	Романовская Е.В.....	215
Пильщикова Н.В.....	259	Роньжина Е.С.....	203
Пиотровский М.С.....	192	Рубец В.С.....	73
Пишенин И.А.....	258	Рублев А.Н.....	121
Платовский Н.Н.....	81	Руденко Н.Н.....	114, 256
Платонов А.В.....	95, 267	Румянцева Н.И.....	287
Плюснин И.Н.....	66	Русаков Д.В.....	151
Подлущий М.С.....	110	Рухляда К.А.....	275
Подобед М.Ю.....	258	Рыбин Д.А.....	328
Подольский Н.Е.....	202	Рябова А.В.....	285
Пожванов Г.А.....	60, 261	Савельева Е.М.....	57
Пожидаева Е.С.....	232	Савина М.С.....	29
Позднякова Н.Н.....	334	Савченко Т.В.....	131
Позднякова-Филатова И.Ю.....	114	Садовская Н.С.....	27
Полякова Е.А.....	49, 50	Садькова В.С.....	217
Полякова М.С.....	77, 294	Садькова Л.Р.....	227
Полянская С.Н.....	83	Саламайкина С.А.....	325
Поморцев А.В.....	77, 294	Салина Е.А.....	178
Пономарев А.Г.....	104	Самодуров Д.Е.....	218
Попов В.Н.....	69	Сарварова Е.Р.....	165
Попова А.К.....	358	Сарвин Б.....	243
Попова Е.В.....	296, 326, 362	Сарвин Б.А.....	323
Попова Л.Г.....	285	Саркисян К.С.....	209
Попытченко Л.М.....	262	Сарсекеева Ф.К.....	324
Поценковская Э.А.....	186, 229	Сатканов М.Ж.....	353
Пржевальская Д.А.....	207	Сатгарова Л.Р.....	74
Прокопюк В.М.....	260	Сауткина О.В.....	127
Прокофьева М.Ю.....	51	Светлаков В.И.....	207
Прокушкин А.С.....	121	Селим К.....	321
Пронина Н.А.....	271	Семенов К.Н.....	202, 252
Протопопова М.В.....	239	Семенова Г.А.....	131
Прудникова О.Н.....	105	Семенова Л.И.....	56
Пузанский Р.К.....	286	Семенцова М.В.....	359
Пузина Т.И.....	230	Сеник С.В.....	220

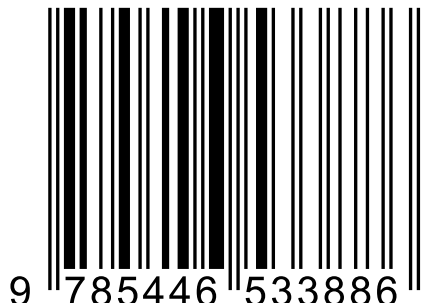
Сенченков С.А.....	121	Ступко В.Ю.....	281
Сергиенко О.В.....	236	Суворова Г.Н.....	336
Серебрякова О.С.....	314	Сундырева М.А.....	84, 131, 289
Серегин И.В.....	53, 144	Суслов М.А.....	43
Серкова А.А.....	56	Сухарева Л.В.....	267
Сечин Е.Н.....	221	Сухов В.С.....	265
Сивцева С.В.....	125, 358	Сухорукова А.В.....	225
Сигова К.М.....	48	Схаляхо Т.В.....	158
Сидоров А.В.....	95	Схат Х.....	53, 144
Сидоров Р.А.....	327, 348	Табаленкова Г.Н.....	33, 75
Сидорова Т.Н.....	179	Таланова В.В.....	204
Сидорчук Ю.В.....	218, 335	Тальских А.И.....	223
Силина А.К.....	79	Танг Ю.....	121
Силина Е.В.....	33, 75	Тараканов И.Г.....	62, 91, 120, 156, 349
Симонова О.А.....	65	Тарасов С.С.....	36, 149
Синенко О.С.....	250	Тараховская Е.Р.....	198, 343
Синетова М.А.....	324, 339, 348, 352, 357	Тарелкина Т.В.....	26, 56, 116, 157, 254
Синицына Ю.В.....	76, 245	Татарина Т.Д.....	104
Синькевич И.А.....	32	Татцуня Томо.....	224
Синькевич С.М.....	201	Творогова В.Е.....	186, 229, 237, 284, 295
Скаженник М.А.....	150, 248, 317	Тевфик А.Ш.....	356
Скорородова А.Н.....	208, 247	Теплова А.Д.....	34
Скурту Г.И.....	71	Терентьев В.В.....	61, 240, 346
Слепцов Н.В.....	358	Терешонкова Т.А.....	168
Слепцов Н.Н.....	120	Теханович Г.....	101
Слесарева Т.Н.....	46	Тимербаяев В.Р.....	178, 179
Словохотов И.Ю.....	168	Тимофеева Г.В.....	205, 266
Слуковская М.В.....	123	Тимофеева О.А.....	340
Смекенов И.Т.....	235	Титов А.Ф.....	72, 148, 204
Смирнова Е.О.....	55, 119, 182	Титова М.В.....	296, 299, 319, 323, 326, 327, 351
Смирнова Ю.В.....	153, 165	Титова Н.В.....	71
Смоликова Г.Н.....	139	Ткаченко О.В.....	277, 278, 302, 334
Смолова Т.Н.....	131	Товстыко Д.А.....	91
Соболева А.В.....	113	Толоконцев Д.В.....	137
Соболькова Г.И.....	327	Топоркова Я.Ю.....	55, 119, 182
Собралиева Э.А.....	30, 177, 310	Топунов А.Ф.....	41
Содикзода М.С.....	82	Тошиюки Шинода.....	224
Соколов А.В.....	196	Третьякова И.Н.....	318, 320
Соколова Н.А.....	77	Трифорова Н.А.....	134
Соловченко А.Е.....	42, 309	Трофимова М.С.....	192
Соловьева А.И.....	315, 325	Трусова С.В.....	34
Сорокань А.В.....	200, 342	Тугбаева А.С.....	241
Сотникова Ю.М.....	163	Тулупов А.Е.....	203
Софронова В.Е.....	86	Тюрин А.А.....	27, 185, 225
Софронова И.Н.....	67, 201	Тюрина И.В.....	106
Спивак С.Г.....	168	Тюрина Т.М.....	319
Ставрианиди А.Н.....	243	Уварова Е.А.....	335
Ставцева И.В.....	356	Удалова О.Р.....	202
Стадничук И.Н.....	161	Удалова Т.А.....	121
Стародубцева А.А.....	164	Ульянова А.А.....	306
Старчиков А.А.....	302	Ульяновская Е.В.....	158
Степанова А.И.....	314	Усатов А.В.....	70
Степанова А.Ю.....	315, 325	Усик А.В.....	78
Степанова М.А.....	125, 358	Успенская А.В.....	164
Строкина В.В.....	85, 128	Фархутдинов Р.Г.....	48, 163
Стручкова И.В.....	245	Федий С.Б.....	171
Стрыгина К.....	101	Федоненко Ю.П.....	278
Стрыгина К.В.....	139	Федореева Л.И.....	129

Федорова Е.Э.	134	Чмелёва С.И.	172
Федорова К.А.	112, 173, 174	Чуксин И.С.	91
Федорчук Т.П.	114	Чумикина Л.В.	41
Федотова О.А.	49, 50	Чэнь Т.	341
Федяев В.В.	48	Шаварда А.Л.	60, 220, 286
Фесенко Е.Е.	360	Шакирова Ф.М.	112, 138, 173, 174
Филатова И.И.	78	Шалойко Л.А.	180
Фирсов А.П.	180	Шапиро А.С.	341
Фоменков А.А.	40, 170, 296, 303, 326, 327, 351, 362	Шапошников А.И.	102
Форчхаммер К.	321	Шарипова Г.В.	39
Фридман В.А.	225	Шарипова М.Р.	167
Фролов А.А.	113	Шашкин А.В.	121
Фролов А.А.	103, 139, 198, 215	Шашко А.Ю.	207
Фролова А.А.	114	Швиденко Н.В.	122
Фузамичи Акита.	224	Шевелева И.С.	297
Хабиева Н.А.	183	Шеин М.А.	154
Хайруллин Р.М.	153, 165	Шелоухова Н.А.	38
Хакимова Л.Р.	227	Шематорова Е.К.	168
Халилова Л.	206	Шерудило Е.Г.	96, 147, 148
Халилова Л.А.	236	Шестакова М.В.	150
Халилуев М.Р.	92	Шестерикова Е.М.	258
Халилуев М.Р.	73, 168	Шестеркина И.А.	36, 149
Хаматдинова Г.И.	48	Шестибратов К.А.	93
Хамидуллина Л.А.	181	Шибаета Т.Г.	96, 147, 148
Хамрабаева З.М.	82	Шилович А.А.	175
Ханды М.Т.	273	Ширнина И.В.	355
Харитонов В.А.	67	Широких И.Г.	269
Харитонов Т.Д.	358	Ширшикова Г.Н.	85
Харчук О.А.	118	Шитов А.В.	240
Хачатуров Э.Г.	145	Шишова М.Ф.	286, 341, 345
Хашимова Н.Р.	199	Шкляревский М.А.	122
Хисматов Т.Р.	329	Шмаков А.С.	91
Хлесткина Е.К.	52	Шмарев А.Н.	91, 120
Хлесткина Е.	101	Шпаковский Г.В.	168
Хлесткина Е.К.	139	Шпаковский Д.Г.	168
Холопцева Е.С.	204	Шугаев А.Г.	189
Хомяков Ю.В.	202	Шугаева Н.А.	189
Хоробрых А.А.	131	Шуйская Е.В.	51
Храмов Д.Е.	285	Шукшина А.К.	61, 346
Христин М.С.	131	Шульга О.А.	178
Худякова А.Ю.	31, 85, 128	Шульгина А.А.	349
Хуснетдинова Л.З.	340	Шумилина Ю.С.	103, 113, 215
Царев А.А.	103, 113	Шумило Н.А.	323
Церс И.Д.	119	Шуплецова О.Н.	332
Цыганков А.А.	337	Щеголев С.Ю.	278, 334
Цыганов В.Е.	103, 176, 215, 222	Щелкунова Ю.В.	230
Цыганова А.В.	222	Энейская Е.В.	108
Чанцева В.В.	215	Юзихин О.В.	102
Чекина А.А.	215	Юлдашев Р.А.	173
Черевацкая М.А.	139	Юркевич М.Г.	89, 268
Чередниченко М.Ю.	301, 304	Якимова О.В.	356
Чернова Т.Е.	37	Якконен К.Л.	202, 252
Чернодод Г.К.	273	Яковлева О.С.	62, 156
Черныш М.А.	207	Якубова М.М.	82
Чижиков В.Н.	150, 248	Ямпольский И.В.	209
Чиков В.И.	181	Янькин Д.В.	131
Чирва О.В.	162, 276	Яньшин Н.А.	343
Чичкова Н.В.	34	Яровицкая В.В.	320



 127276, Москва, ул. Ботаническая, д. 35
 www.ipprgas.ru
 ifr@ipprgas.ru
 +7 (499) 678-54-00
 +7 (499) 678-54-20

ISBN 978-5-4465-3388-6



9 785446 533886 >