



Труды

КАРЕЛЬСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

№ 3, 2013

ISSN 1997-3217

transactions.krc.karelia.ru

Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

СОДЕРЖАНИЕ

Обзорные статьи

Е. В. Борвинская, Л. П. Смирнов, Н. Н. Немова. ГЛУТАТИОН S-ТРАНСФЕРАЗЫ У РЫБ	3
Э. А. Гончарова, Ю. В. Чесноков, М. Н. Ситников. РЕТРОСПЕКТИВА ИССЛЕДОВАНИЙ ВОДНОГО СТАТУСА КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ НА БАЗЕ КОЛЛЕКЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ ВИР	10
П. Н. Кравченко, Е. К. Олейник. СИСТЕМА РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК И АУТОИММУННЫЕ ПРОЦЕССЫ	18
Н. С. Репкина, В. В. Таланова, А. Ф. Титов. ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ У РАСТЕНИЙ	31
Экспериментальные статьи	
А. М. Андреева, Р. А. Федоров, И. П. Рябцева, Н. Е. Ламаш, А. Э. Филиппова. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИТЕЛЛОГЕНИНА В КРОВИ МЕЛКОЧЕШУЙНОЙ КРАСНОПЕРКИ-УГАЙ (<i>TRIBOLODON BRANDTII</i>)	46
Ю. В. Батова, Н. М. Казнина, Г. Ф. Лайдинен, А. Ф. Титов. ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ НА НЕКОТОРЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ У РАСТЕНИЙ ТИМОФЕЕВКИ ЛУГОВОЙ (<i>PHLEUM PRATENSE L.</i>)	52
Д. И. Башмаков, Л. П. Акамова, К. А. Сазанова. ВЛИЯНИЕ ИОНОВ Pb^{2+} И ЭДТА НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ <i>PELARGONIUM ZONALE L.</i>	59
Л. В. Ветчинникова, Т. Ю. Кузнецова, А. Ф. Титов. ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В ЛИСТЬЯХ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ НА УРБАНИЗИРОВАННЫХ ТЕРРИТОРИЯХ В УСЛОВИЯХ СЕВЕРА	68
Л. В. Ветчинникова, О. С. Серебрякова, М. К. Ильникова. ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ЛИПИДОВ И ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ОТДЕЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ В ЖЕНСКИХ СЕРЕЖКАХ БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ (<i>BETULA PENDULA ROTH</i>)	74
О. А. Гаврилова, О. А. Тихонова. РАЗНООБРАЗИЕ ФОРМ ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЕРЕН И ИХ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ И ГИБРИДОВ КРЫЖОВНИКОВЫХ	82

ТРУДЫ КАРЕЛЬСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РАН. № 3, 2013. Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

А. С. Горюнов, А. Г. Борисова, С. П. Рожков, Г. А. Суханова, Н. Н. Рожкова. ОКИСЛЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА В ВОДНЫХ НАНОДИСПЕРСИЯХ УГЛЕРОДА	93
К. Ю. Зуева, М. Ю. Озеров, А. Е. Веселов, К. Р. Приммер. ДЕЙСТВИЕ ЕСТЕСТВЕННОГО ОТБОРА НА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫЕ ЛОКУСЫ АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ (<i>SALMO SALAR L.</i>)	101
Н. М. Казнина, А. Ф. Титов, Г. Ф. Лайдинен, Ю. В. Батова. ВЛИЯНИЕ ВОЗРАСТА ЛИСТА НА УСТОЙЧИВОСТЬ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА РАСТЕНИЙ К КАДМИЮ ...	112
С. А. Курбатова, Н. А. Лаптева, И. Ю. Ершов, Е. В. Борисовская. СРЕДООБРАЗУЮЩАЯ РОЛЬ ГИДРОФИТОВ В РАЗВИТИИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ПЛАНКТОННЫХ СООБЩЕСТВ	119
А. С. Лукаткин, Н. Н. Каштанова. ВЛИЯНИЕ ТИДИАЗУРОНА НА ТЕРМОУСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ	129
О. В. Мещерякова, М. В. Чурова, Н. Н. Немова. МЕЖВИДОВЫЕ, ВОЗРАСТНЫЕ И ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ В АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМ С-ОКСИДАЗЫ БЕЛЫХ МЫШЦ РЫБ ИЗ ВОДОЕМОВ СЕВЕРО-ЗАПАДА РОССИИ	136
Е. В. Фатеева, Е. В. Мокшин, А. С. Лукаткин. ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ МИНЕРАЛЬНОЙ ОСНОВЫ СРЕДЫ И РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА ОРГАНОГЕНЕЗ ЦИМБИДИУМА ГИБРИДНОГО В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	143
Е. А. Хижкин, В. Д. Юнаш, Л. Б. Узенбаева, И. А. Виноградова, В. А. Илюха, Т. Н. Ильина, Ю. П. Баранова, А. В. Морозов. ОТСУТСТВИЕ ФОТОПЕРИОДИЗМА НАРУШАЕТ ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ КРЫС	149
Н. П. Чернобровкина, Е. В. Робонен, А. К. Морозов, Т. Н. Макарова. НАКОПЛЕНИЕ L-АРГИНИНА В ХВОЕ ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ ПРИ РЕГУЛЯЦИИ АЗОТНОГО И БОРНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ	159
Е. Г. Шерудило, М. И. Сысоева, В. А. Илюха. РЕАКЦИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА НА ПОСТОЯННОЕ И КРАТКОВРЕМЕННОЕ ПЕРИОДИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ	166
Краткие сообщения	
В. К. Болондинский, Е. С. Холопцева. ИССЛЕДОВАНИЯ ФОТОСИНТЕЗА И ТРАНСПИРАЦИИ У КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ И БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ	173
А. Е. Веселов, Д. С. Павлов, М. А. Скоробогатов, Д. А. Ефремов, Г. А. Нагирияк, М. А. Ручьев. РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ НОВОЙ КОНСТРУКЦИИ ГНЕЗДА-ИНКУБАТОРА ЛОСОСЕВОЙ ИКРЫ В РЕЧНЫХ УСЛОВИЯХ	179
Д. С. Капшай, В. К. Голованов. ВЕРХНЯЯ ЛЕТАЛЬНАЯ ТЕМПЕРАТУРА У МОЛОДИ ТЕПЛОЛЮБИВЫХ ВИДОВ РЫБ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ АККЛИМАЦИИ	185
И. М. Камшилов, Р. А. Запруднова. ЭФФЕКТ БОРА В ХАРАКТЕРИСТИКЕ БУФЕРНЫХ СВОЙСТВ ГЕМОГЛОБИНА РЫБ	190
М. И. Сысоева, В. В. Лаврова, Е. М. Матвеева. ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННЫХ ЕЖЕСУТОЧНЫХ СНИЖЕНИЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ ЗАРАЖЕННОГО НЕМАТОДОЙ КАРТОФЕЛЯ	194
В. В. Яковлев, А. Ю. Лукьянов, А. А. Когут, Д. А. Сысоев. АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ СИСТЕМА РЕГИСТРАЦИИ СУТОЧНОГО ХОДА ТЕМПЕРАТУРЫ И ВЛАЖНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕСПРОВОДНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	200
Юбилей и даты	
Н. Н. Немова, О. Н. Лебедева. Институту биологии КарНЦ РАН – 60 лет	204
К 60-летию ИБ КарНЦ РАН. Из воспоминаний профессора В. К. Курца	210
А. Ф. Титов, Н. М. Казнина. Вера Викторовна Таланова (к 60-летию со дня рождения)	216
Рецензии и библиография	222
Утраты	
Марина Ивановна Сысоева (1960–2013)	224
Правила для авторов	226

Карельский научный центр
Российской академии наук

ТРУДЫ

КАРЕЛЬСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

Петрозаводск
2013

Научный журнал
**Труды Карельского научного центра
Российской академии наук**
№ 3, 2013
Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

Scientific Journal
**Proceedings of the Karelian Research Centre
of the Russian Academy of Sciences**
No 3, 2013
EXPERIMENTAL BIOLOGY Series

Главный редактор
А. Ф. Титов

Редакционный совет

А. М. Асхабов, В. Т. Вдовицын, Т. Вихавайнен, А. В. Воронин, С. П. Гриппа, Э. В. Ивантер,
А. С. Исаев, В. Т. Калинин, В. И. Крутов, А. М. Крышень (зам. главного редактора),
Е. В. Кудряшова, В. В. Мазалов, Ф. П. Митрофанов, И. И. Муллонен, Н. Н. Немова,
В. В. Окрепилов, О. Н. Пугачев, Ю. В. Савельев, Н. Н. Филатов, А. И. Шишкин, В. В. Щипцов

Editor-in-Chief
A. F. Titov

Editorial Council

A. M. Askhabov, V. T. Vdovitsyn, T. Vihavainen, A. V. Voronin, S. P. Grippa, E. V. Ivanter, A. S. Isaev,
V. T. Kalinnikov, V. I. Krutov, A. M. Kryshen' (Deputy Editor), E. V. Kudryashova, V. V. Mazalov,
F. P. Mitrofanov, I. I. Mullonen, N. N. Nemova, V. V. Okrepilov, O. N. Pugachyov, Yu. V. Saveliev,
N. N. Filatov, A. I. Shishkin, V. V. Shchiptsov

Редакционная коллегия серии «Экспериментальная биология»

А. С. Горюнов, В. А. Илюха (зам. отв. редактора), Н. М. Калинин, О. Н. Лебедева, Е. М. Матвеева,
Н. Н. Немова (отв. редактор), Л. Л. Новицкая, Е. К. Олейник, Л. П. Смирнов,
М. И. Сысоева (отв. секретарь)

Editorial Board of the «Experimental Biology» Series

A. S. Goryunov, V. A. Ilyukha (Deputy Editor-in-Charge), N. M. Kalinkina, O. N. Lebedeva, E. M. Matveeva,
N. N. Nemova (Editor-in-Charge), L. L. Novitskaya, E. K. Olejnik, L. P. Smirnov, M. I. Sysoeva
(Executive Secretary)

ISSN 1997-3217

И. о. зав. редакцией А. И. Мокеева
Адрес редакции: 185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11
тел. (8142)762018; факс (8142)769600
E-mail: trudy@krc.karelia.ru
Электронная полнотекстовая версия: <http://transactions.krc.karelia.ru>

© Карельский научный центр РАН, 2013

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 597.2/5:577.151.64:575.852

ГЛУТАТИОН S-ТРАНСФЕРАЗЫ У РЫБ

Е. В. Борвинская, Л. П. Смирнов, Н. Н. Немова

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Глутатион S-трансферазы (GST) являются неотъемлемым и чрезвычайно важным компонентом системы биотрансформации ксенобиотиков, во многом определяя способность организмов выживать в условиях высокой изменчивости физико-химических параметров окружающей среды. Представители этого семейства ферментов обнаруживаются у всех обитающих на Земле видов, за исключением анаэробных бактерий и вирусов, и могут рассматриваться как модель эволюции белковых макромолекул. Однако значительные трудности возникают при попытке выяснения филогенетических отношений глутатион S-трансфераз у рыб (эволюционно более древних, чем млекопитающие) в связи с их недостаточной изученностью. В данном обзоре приводится имеющаяся в литературе информация о взаимосвязи структуры и функции глутатион S-трансфераз рыб. Сравнительный анализ имеющихся данных позволяет сделать вывод об отличиях GST рыб от GST млекопитающих.

Ключевые слова: глутатион S-трансферазы; энзимология; рыбы.

E. V. Borvinskaya, L. P. Smirnov, N. N. Nemova. GLUTATHIONE S-TRANSFERASES IN FISH (MINIREVIEW)

Glutathione S-transferases (GST) deactivate many toxins, and are thus largely responsible for the organism's capacity to adapt to the environment. Enzymes of this family can be found in all organisms, excluding anaerobic bacteria and viruses. These proteins can be regarded as a model of the molecular evolution of biopolymers. Some difficulties arise however in fish GST classification, because information about these ancient water organisms is insufficient. This minireview consolidates data about GST in fish and the relations between their molecular structure and function. A comparative analysis has revealed a significant difference between the biochemical properties of mammalian and fish GST.

Key words : glutathione S-transferases; enzymology; fish.

Водные организмы подвержены воздействию присутствующих в водоемах разнообразных чужеродных соединений. Одним из важнейших компонентов системы детоксикации (фазы II биотрансформации) в клетке являются глутатион S-трансферазы (E.C.2.5.1.18). Они представляют собой эволюционно древнее суперсемейство ферментов, многочисленные представители которого встречаются у всех без исключения эукариот, а также у аэробных бактерий [Angelucci et al., 2000; Nóvoa-Valiñas et al., 2002]. Значимость этих энзимов подтверждается и тем, что их доля составляет не менее 1 % от общего количества белка клетки [Salinas, Wong, 1999].

Главная задача, решаемая глутатион S-трансферазами (GST), – это защита клетки от химически индуцированного стресса, вызываемого гидрофобными ксенобиотиками, который влечет разного рода цито- и генотоксические эффекты. Ферменты катализируют дезактивацию чужеродных соединений, которая достигается путем атаки сульфгидрильной группой глутатиона (GSH) электрофильных субстратов [Armstrong, 1997]. Образовавшиеся GS-гидрофобные конъюгаты являются водорастворимыми и выводятся из животной клетки с помощью мембраносвязанного АТФ-зависимого насоса с последующим превращением в производные меркаптуровой кислоты, удаляемые из организма с желчью и мочой [Mathews, van Holde, 1990]. В клетке кроме чужеродных веществ субстратами GST также являются продукты перекисного окисления липидов и эндогенные соединения с мутагенными и тератогенными свойствами, такие, например, как производные стероидов (эстрадиол-17 β , этинилэстрадиол и др.).

Широчайшая субстратная специфичность, являющаяся важнейшим свойством GST, определяет их биохимическую значимость как универсальных перехватчиков экзогенных токсинов, в том числе всевозможных синтетических соединений (лекарств, гербицидов, пестицидов, антибиотиков и др.) [Jakoby, Ziegler, 1990; Sheehan et al., 2001]. Этим ферментам присущи такие функции, как удаление активных форм кислорода и регенерация серосодержащих белков (последствия окислительного стресса), а также реакции, не ассоциированные с детоксикацией. Кроме того, GST играют главную роль в осуществлении в животных клетках так называемых лигандиноподобных функций, то есть некаталитическом связывании и транспорте эндогенных гидрофобных субстратов, таких как стероиды, билирубин, гем, желчные соли [Salinas, Wong, 1999; Blanchette et al., 2007]. Но, возможно, наиболее важной лигандиноподобной функцией является

участие в локальном синтезе простагландинов и лейкотриенов [Salinas, Wong, 1999].

У большинства организмов обычно присутствует целый набор изоферментов GST с различными каталитическими свойствами, приспособленных к выполнению различных функций в клетке. Уже на ранних этапах изучения наиболее однородные группы GST стали объединять в так называемые «классы», обозначаемые буквами греческого алфавита. В настоящее время у млекопитающих выделены и охарактеризованы следующие классы GST – α , μ , π , θ , ζ , σ и ω , а также митохондриальный κ класс [Higgins, Hayes, 2011]. В дополнение к этому некоторые специфические классы GST были описаны у других таксонов, например, β класс у бактерий, λ , ϕ и τ классы у растений, δ , ϵ и \mathbf{U} класс у насекомых, а также ρ класс, специфичный для рыб [Sheehan et al., 2001; Konishi et al., 2005a]. Известно как минимум 16 генов, кодирующих цитозольные изоформы GST, и как минимум 6 генов – мембраносвязанные [Strange et al., 2001]. Возникновение такого разнообразия форм фермента отражает эволюцию защитных систем организмов в ходе формирования самых различных стратегий при адаптации к изменяющимся условиям среды.

Классификация глутатион S-трансфераз – это продолжающийся процесс. Она базируется на ряде критериев, таких как определение аминокислотной последовательности белка и нуклеотидной последовательности гена, субстратной специфичности, иммунологических свойств, характеристика третичной и четвертичной структур белка. Появляются новые данные о взаимосвязи между структурой фермента и его функцией, поэтому существовавшие ранее четкие границы между классами представляются более размытыми [Blanchette et al., 2007]. Ситуация, когда открывают новую GST со свойствами, по одной классификационной методике принадлежащими одному классу, а по другой методике – другому, не редкость. Прежде всего это связано с отсутствием четких стандартов для классификации GST. С одной стороны, попытки классифицировать глутатион трансферазы по критерию субстратной специфичности дают крайне противоречивые результаты из-за низкой селективности и перекрывающейся субстратной избирательности отдельных изоформ. С другой стороны, сравнение первичных аминокислотных последовательностей белка и структуры кодирующего гена позволяет судить о филогенетическом родстве отдельных трансфераз, однако не дает достаточной информации об эволюции биологической функции белка. Так, замена одной аминокислоты в активном центре может приводить

к возникновению изоформ фермента, метаболизирующих различные типы субстратов [Ketterman et al., 2001]. Поскольку давление естественного отбора направлено не на структуру, а на функцию белковой молекулы, то наблюдаемое разнообразие форм фермента и различные скорости образования этих форм у отдельных таксонов организмов не могут быть объяснены без анализа различий каталитических параметров отдельных классов GST.

Работы по всестороннему анализу, позволяющему выявить зависимость структуры и функции отдельных глутатион S-трансфераз, на данный момент выполнены в основном для GST млекопитающих и человека. В свою очередь, глутатион трансферазы водных организмов, в том числе рыб, стоящих на более низкой ступени эволюционной лестницы, чем наземные позвоночные, до сих пор остаются слабоизученными. Детальные характеристики были получены лишь для малой части GST рыб [Leaver et al., 1993; Martínez-Lara et al., 2002; Angelucci et al., 2000; Pérez-López et al., 2000; Pham et al., 2002; Konishi et al., 2005a,б; Lee et al., 2006; Trute et al., 2007; Carletti et al., 2008, Huang et al., 2008]. Гораздо шире список GST рыб, охарактеризованных лишь частично. Тем не менее по уже имеющимся данным можно сделать вывод о том, что GST рыб по многим биохимическим свойствам значительно отличаются от GST млекопитающих.

Одними из первых достаточно подробно были охарактеризованы GST из печени камбалы *Pleuronectes platessa* [George, Buchanan, 1990; George, Young, 1988; Leaver et al., 1993; Martínez-Lara et al., 2002]. Было показано, что большая часть активности GST в цитозоле гепатоцитов связана с гомодимерной изоформой GST A и в меньшей степени с гомодимерной GST B. Еще небольшая часть активности обусловлена гетеродимерным ферментом GST AM [George, Buchanan, 1990].

Антитела к основной глутатион S-трансферазе печени камбалы GST A перекрестно не реагируют с GST α , μ и π классов млекопитающих, также слабой является активность этой формы с большинством субстратов, за исключением CDNB и DCNB (субстрат GST μ класса млекопитающих). Молекулярное клонирование и экспрессия кДНК, кодирующей изофермент, с последующим анализом данных о первичной последовательности белка, полученных из этой кДНК, позволило отнести GST A к классу θ , который встречается у насекомых, растений и млекопитающих [Leaver et al., 1993].

Гомологи изоформы GST A камбалы были обнаружены не только у камбаловых (*Pleuronectes vetulus*, *Platichthys stellatus*, *Solea senegalensis*),

но и у других рыб, включая большеротого окуня *Micropterus salmoides*, пагра *Pagrus major*, угря *Anguilla anguilla*, тилапию *Oreochromis niloticus*, лаврака *Dicentrarchus labrax*, мраморного ривулуса *Rivulus marmoratus*, кефаль *Mugil cephalus* и лососевых рыб (*Oncorhynchus kisutch*, *Oncorhynchus tshawytscha*). Идентичность аминокислотных последовательностей во всех случаях составляет не менее 64 %, что свидетельствует о большой консервативности этого гена среди рыб. GST θ рыб более близки к некоторым GST растений (до 24 % сходства аминокислотных последовательностей белка), чем к GST θ млекопитающих (идентичность последовательностей не превышает 11–18 %) [Lee et al., 2006; Carletti et al., 2008].

Особенностью GST θ рыб является то, что они, в отличие от GST θ млекопитающих, удерживаются аффинным носителем с иммобилизованным глутатионом и метаболизируют субстрат CDNB. Кроме того, Кониши с коллегами [Konishi et al., 2005a] на примере изоформы GST R1-1 пагра *P. major* показали, что ген GST θ рыб состоит из шести экзонов, а не из пяти, как у млекопитающих. Поэтому, исходя из выявленных различий, ими было предложено выделить трансферазы, гомологичные изоформе GST A камбалы, в отдельный класс, обозначенный как класс ρ , филогенетически родственный классу θ млекопитающих, растений и насекомых, но пока обнаруженный только у рыб [Konishi et al., 2005a]. Следует уточнить, что буквой ρ также была обозначена GST, выделенная из эритроцитов млекопитающих и птиц, но она не имеет отношения к GST ρ рыб [Aydemir, Kavrayan, 2009].

Интересно, что аминокислотная последовательность GST у представителя семейства карповых *Danio rerio* на 45 % идентична GST θ млекопитающих и менее чем на 25 % – группе GST рыб, обозначенных как ρ . Подобная GST была также обнаружена у карпа *Cyprinus carpio*. Таким образом, похоже, что из изученных рыб только у этих видов обнаружена изоформа, которая может быть обозначена как истинная GST θ [Konishi et al., 2005a; Fu, Xie, 2006; Lee et al., 2006].

Большое количество работ посвящено изучению GST лососевых рыб [Ramage, Nimmo, 1984; Ramage et al., 1986; Dominey et al., 1991; Pérez-López et al., 2000; Nóvoa-Valiñas et al., 2002; Donham et al., 2005; Trute et al., 2007]. Сравнение полной аминокислотной последовательности основной GST печени кумжи *Salmo trutta* и радужной форели *Oncorhynchus mykiss* выявило, что этот фермент имеет очень большое сходство с GST класса π млекопитающих [Dominey et al., 1991]. В дальнейшем было показано, что GST π составляют основную часть пула глутатион

трансфераз и у других лососевых рыб: *O. kisutch*, *O. tshawytscha*, *S. salar*, *S. trutta* [Nóvoa-Valiñas et al., 2002; Donham et al., 2005; Trute et al., 2007]. Однако с этим не согласуются результаты изучения субстратной специфичности GST, полученные Рэмиджем с соавторами [Ramage et al., 1986]. Из двух групп изоформ, выделенных из печени лосося *S. salar*, у одной полностью отсутствовала активность GST в присутствии EtA (субстрат π класса млекопитающих) и наблюдалась высокая активность в присутствии DCNB, транс-4-фенил-3-бутен-2-она (μ класс) и *p*-нитробензил хлорида (α , μ классы). В группе, где наблюдалась активность в присутствии EtA, была выявлена небольшая активность в присутствии Δ^5 -андростен-3,17-диона (α класс) и бромосульфоталеина (μ класс), а также высокая активность в присутствии с 1,2-эпокси-3-(*p*-нитрофенокси) пропана (μ), DCNB (μ) и *p*-нитробензил хлорида (α , μ). При этом активность в присутствии DCNB во всех группах значительно превосходила таковую с EtA. Таким образом, обе группы изоферментов по каталитическим свойствам больше напоминали μ класс млекопитающих, чем π класс. В свою очередь в работе Новая-Валиньяса с соавторами [Nóvoa-Valiñas et al., 2002] показано, что активность в присутствии EtA смеси афинно очищенных GST из печени лосося *S. salar* и кумжи *S. trutta* в среднем в 7 раз превосходила активность в присутствии DCNB, а в почках – в 32 раза. Таким образом, данные о субстратной специфичности GST лососевых рыб требуют дальнейшего уточнения.

Помимо лососевых рыб GST π обнаружены у карповых (*C. carpio*, *D. rerio*, *Carassius auratus*, *Hypophthalmichthys molitrix*), канального сомика *I. punctatus* и угря *A. anguilla* [Suzuki et al., 2005; Fu, Xie, 2006; Liang et al., 2007; Carletti et al., 2008]. Эти ферменты также очень близки по структуре к GST π млекопитающих, с идентичностью аминокислотной последовательности не менее 57 % [Carletti et al., 2008], что позволяет говорить об эволюционной консервативности этого класса глутатион трансфераз.

Довольно много внимания было уделено изучению GST рыб семейства карповых, в связи с участием этих ферментов в обезвреживании микроцистинов (токсинов, продуцируемых сине-зелеными водорослями во время «цветения» водоемов) [Cazenave et al., 2006]. У обыкновенного карпа *C. carpio* были клонированы сразу девять генов глутатион трансфераз, включая α , μ , ρ , θ , π GST цитозоля, митохондриальную GST κ и микросомальные mGST1, mGST2 и mGST3 [Fu, Xie, 2006]. Было показано, что у устойчивого к микроцистину толстолобика *H. molitrix* после введения токсина увеличивается экспрессия

изоформы GST ρ и особенно GST α , тогда как у чувствительного к данному яду белого амура *Ctenopharyngodon idellus* экспрессия этих изоформ не изменяется [Liang et al., 2007].

Следует отметить, что в цитируемых работах по карповым рыбам в основном были использованы молекулярно-генетические методы анализа GST, а информация о физико-химических особенностях этих ферментов практически отсутствует.

Помимо карповых рыб (*C. auratus*, *Aristichthys nobilis*, *Cirrhinus molitorella*) GST α класса были обнаружены у лаврака *D. labrax* (DL-GST-8.2), пагра *P. major* (GST A1-1 и GST A2-2), канального сомика *Ictalurus punctatus*, тилапии *O. niloticus*, мраморного ривулуса *Rivulus marmoratus*, камбалы *P. platessa* и лососевых рыб (*O. kisutch*, *O. tshawytscha*, *O. mykiss*). При этом по структуре они довольно близки к GST α млекопитающих и птиц [George, Buchanan, 1990; Angelucci et al., 2000; Pérez-López et al., 2000; Donham et al., 2005; Lee et al., 2006; Liao et al., 2006; Trute et al., 2007].

Интересно отметить, что по уровню конституциональной экспрессии у лососеобразных рыб, а также у осетра и канального сомика преобладают GST класса π , у карпообразных и карпозубообразных (*Rivulus marmoratus*) – GST класса α , а у окунеобразных, камбалообразных, а также угря основная изоформа представлена GST класса ρ [Lee et al., 2006; Liang et al., 2007]. В свою очередь у всех рыб GST класса μ составляют пул минорных изоформ [George, Buchanan, 1990; Pérez-López et al., 2000; Donham et al., 2005; Fu, Xie, 2006; Trute et al., 2007]. Это может указывать на эволюционный отбор у различных групп рыб отдельных белков, которые могут обуславливать различные стратегии защиты от окислительного стресса и воздействия токсинов. Так как надотряд Перкоидные (Percomorpha), включающий окунеобразных и камбалообразных, является самой большой группой среди костистых рыб, можно предположить, что их успешное выживание и распространение может быть связано в том числе с преимущественной экспрессией GST ρ класса [Liang et al., 2007].

Особенно интересны глутатион трансферазы некоторых рыб, которые демонстрируют свойства нескольких классов. Например, GST кошачьего сома *I. punctatus* положительно реагирует одновременно с антисыворотками к GST α и π класса и ограничено с μ , а GST морского языка *P. vetulus* – с антисыворотками как μ , так и π класса [Gallagher et al., 1996]. У чавычи *O. tshawytscha* в одном из пиков, полученных при разделении с помощью высоко-

эффективной жидкостной хроматографии, содержался белок, аминокислотная последовательность одних фрагментов молекулы которого полностью совпадала с таковыми GST π нерки, а других – с фрагментами GST α класса мышей, курицы и камбалы. При этом белок проявил гомогенность при SDS-электрофорезе [Donham et al., 2005]. Подобные примеры могут свидетельствовать в пользу существования у эволюционно древних гидробионтов «промежуточных» классов фермента. Дело в том, что эволюционное древо GST до сих пор до конца не расшифровано. Не ясно, в каком порядке классы GST отщеплялись от общего архетипа. Например, Салинас, Вонг [Salinas, Wong, 1999] и Армстронг [Armstrong, 1997] предложили такой сценарий развития событий, при котором отщепление отдельных классов GST в ходе эволюции шло постепенно, через этапы промежуточных форм (например, $\sigma/\alpha/\mu/\pi$, $\alpha/\mu/\pi$, α/π или α/μ). Наличие таких GST может объяснять противоречивые свойства, которые демонстрируют трансферазы некоторых гидробионтов.

Следует подчеркнуть, что установленное родство исследуемой GST рыб с тем или иным хорошо охарактеризованным классом GST млекопитающих не означает сходства их биохимических свойств. Так, трансфераза лаврака DL-GST-6.7, отнесенная к классу ρ на основе сравнения аминокислотной последовательности белка, обладает слабой активностью в присутствии специфичного для этого класса субстрата – *p*-нитробензил хлорида, но проявляет значительно большую активность в присутствии *транс*-нон-2-енала (μ и α класс), Δ 5-адростен-3,17-диона (α класс) и EtA (α и π класс). В свою очередь другая GST этой рыбы – DL-GST-8.2, принадлежащая к GST класса α , хотя и проявляет специфическую активность в присутствии сульфобромфталеина, тем не менее не способна метаболизировать Δ 5-адростен-3,17-дион (α класс) и в пять раз активнее с *p*-нитробензил хлоридом по сравнению с DL-GST-6.7 [Angelucci et al., 2000].

Среди изоформ GST из печени кижуча *O. kisutch* преобладают GST класса π , на втором месте по содержанию – GST класса ρ [Trute et al., 2007]. Тем не менее активность GST при добавлении в инкубационную среду *p*-нитробензил хлорида (субстрат ρ класса) в 6 раз выше, чем при использовании EtA (субстрат для GST класса π). Кроме того, в гепатоцитах кижуча не осуществляется реакция связывания глутатиона с пестицидом атразином, который является субстратом для GST π человека и грызунов [Trute et al., 2007].

GST-B камбалы структурно сходна с GST α млекопитающих, так как перекрестно реагирует с антителами к GST α класса, найденной у крыс. При этом активность GST B с субстратами α класса довольно слабая (включая EtA и отсутствие GSH-пероксидазной активности) на фоне заметной активности с субстратом μ класса DCNB [George, Buchanan, 1990].

Таким образом, анализ информации о GST рыб позволяет сделать вывод о том, что эти позвоночные обладают достаточно разнородным в функциональном отношении набором ферментов. Немногие работы, посвященные подробному изучению GST рыб, указывают на наличие у них изоформ цитозольных GST, наиболее близких к классам α , μ , π и θ млекопитающих [Gallagher et al., 1996; Liao et al., 2006; Landi, 2000; Pérez-López et al., 2000; Dominey et al., 1991; Fu, Xie, 2006]. Кроме того, некоторые GST костистых рыб могут быть выделены в отдельный класс ρ , родственный классу θ млекопитающих [Konishi et al., 2005a; Fu, Xie, 2006]. Некоторые данные указывают на наличие у рыб эволюционно древних форм ферментов, обладающих свойствами «промежуточных» классов [Gallagher et al., 1996; Donham et al., 2005]. Это свидетельствует о том, что видообразование и освоение новых экологических ниш сопровождалось эволюцией ферментативной системы защиты от токсинов. Накопленные к настоящему моменту данные свидетельствуют о длительной и независимой эволюции различных классов GST, которые структурно мало отличаются в пределах крупных таксонов, таких как отряды, классы и даже царства. Тем не менее ряд биохимических свойств, например субстратная специфичность, внутри класса могут иметь значительные видоспецифические особенности, что, в частности, наблюдается при сравнении глутатион трансфераз рыб и млекопитающих.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ 1642.2012.4; программы ОБН РАН «Биологические ресурсы России: оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга» на 2012–2014 гг.; гранта РФФИ № 12-04-31663 мол_а; гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых-кандидатов наук МК 666.2011.4.

Литература

Angelucci S., Sacchetta P., Moio P., Melino S., Petruzzelli R., Gervasi P. G., Di Ilio C. Purification and characterization of glutathione transferases from the Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) liver // Archives of Biochemistry and Biophysics. 2000. Vol. 373, N 2. P. 435–441.

- Armstrong R. N. Structure, Catalytic Mechanism, and Evolution of the Glutathione Transferases // Chem. Res. Toxicol. 1997. Vol. 10. P. 2–18
- Aydemir T., Kavrayan D. Purification and Characterization of Glutathione-S-Transferase from Chicken Erythrocyte // Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology, 2009. Vol. 37. P. 92–100.
- Blanchette B., Feng X., Singh B. R. Marine Glutathione S-Transferases // Mar. Biotechnol. 2007. Vol. 9, N 5. P. 513–542.
- Carletti E., Sulpizio M., Bucciarelli T., Del Boccio P., Federici L., Di Ilio C. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: Identification, cloning and functional characterization // Aquatic Toxicology. 2008. Vol. 90. P. 48–57.
- Cazenave J., Bistoni M. A., Pesce S. F., Wunderlin D. A. Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR // Aquat. Toxicol. 2006. Vol. 76. P. 1–12.
- Dominey R. J., Nimmo I. A., Cronshaw A. D., Hays J. D. The major glutathione S-transferase in salmonid fish livers is homologous to the mammalian pi-class GST // Comp. Biochem. Physiol. 1991. Vol. 100B, N 1. P. 93–98.
- Donham R. T., Morin D., Jewell W. T., Lamé M. W., Segall H. J., Tjeerdema R. S. Characterization of cytosolic glutathione S-transferases in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) // Aquatic Toxicology. 2005. Vol. 73. P. 221–229.
- Fu J., Xie P. The acute effects of microcystin LR on the transcription of nine glutathione S-transferase genes in common carp *Cyprinus carpio* L. // Aquatic Toxicology. 2006. Vol. 80. P. 261–266.
- Gallagher E. P., Stapleton P. L., Slone D. H., Schlenk D., Eaton D. L. Channel catfish glutathione S-transferase isoenzyme activity toward \pm -anti-benzo[a]pyrene-trans-7,8-dihydrodiol 9,10 epoxide // Aquatic Toxicology. 1996. Vol. 34. P. 135–150.
- George S. G., Buchanan G. Isolation, properties and induction of plaice liver cytosolic glutathione-S-transferases // Fish Physiology and Biochemistry. 1990. Vol. 8, N 6. P. 437–449.
- George S. G., Young P. Purification and properties of plaice liver cytosolic glutathione-S-transferases // Marine Environmental Research. 1988. Vol. 24. P. 93–96.
- Higgins L. G., Hayes J. D. Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents // Drug Metabolism Reviews. 2011. Vol. 43, N 2. P. 92–137.
- Huang Q., Liang L., Wei T., Zhang D., Zeng Q.-Y. Purification and partial characterization of glutathione transferase from the teleost *Monopterus albus* // Comparative Biochemistry and Physiology. 2008. Part C. Vol. 147, N 1. P. 96–100.
- Jakoby W. B., Ziegler D. M. The enzymes of detoxication // Journal of Biological Chemistry. 1990. Vol. 265, N 34. P. 20715–20718.
- Ketterman A. J., Prommeenate P., Boonchaay C., Chanama U., Leetachewa S., Promtet N., Prapanthadara L. Single amino acid changes outside the active site significantly affect activity of glutathione S-transferases // Insect Biochemistry and Molecular Biology. 2001. Vol. 31. P. 65–74.
- Konishi T., Kato K., Araki T., Shiraki K., Takagi M., Tamaru Y. Molecular cloning and characterization of alpha-class glutathione S-transferase genes from the hepatopancreas of red sea bream *Pagrus major* // Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 2005b. Vol. 140, N 3–4. P. 309–320.
- Konishi T., Kato K., Araki T., Shiraki K., Takagi M., Tamaru Y. A new class of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the red sea bream *Pagrus major* // Biochem. J. 2005a. Vol. 388. P. 299–307.
- Landi S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review // Mutation Research. 2000. Vol. 463. P. 247–283.
- Leaver M. J., Scott K., George S. G. Cloning and characterization of the major hepatic glutathione S-transferase from a marine teleost flaffish, the plaice (*Pleuronectes platessa*), with structural similarities to plant, insect and mammalian Theta class isoenzymes // Biochem. J. 1993. Vol. 292. P. 189–195.
- Lee Y.-M., Seo J. S., Jung S.-O., Kim I.-C., Lee J.-S. Molecular cloning and characterization of θ -class glutathione S-transferase (GST-T) from the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus* and biochemical comparisons with α -class glutathione S-transferase (GST-A) // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2006. Vol. 346. P. 1053–1061.
- Liang X.-F., Li G.-G., He S., Huang Y. Transcriptional responses of alpha- and rho-class glutathione S-transferase genes in the liver of three freshwater fishes intraperitoneally injected with microcystin-LR: relationship of inducible expression and tolerance // J. Biochem. Molecular Toxicology. 2007. Vol. 21, N 5. P. 289–298.
- Liao W.-Q., Liang X.-F., Wang L., Lei L.-M., Han B.-P. Molecular Cloning and Characterization of Alpha-Class Glutathione S-Transferase Gene from the Liver of Silver Carp, Bighead Carp, and Other Major Chinese Freshwater Fishes // J. Biochem Molecular Toxicology. 2006. Vol. 20, N 3. P. 114–126.
- Martínez-Lara E., Leaver M., George S. Evidence from heterologous expression of glutathione S-transferases A and Al of the plaice (*Pleuronectes platessa*) that their endogenous role is in detoxification of lipid peroxidation products // Environmental Research. 2002. Vol. 54. P. 263–266.
- Mathews CK, van Holde KE (1990) Biochemistry. The Benjamin. Cummings Publishing Co. Inc., Redwood City. P. 442–444.
- Nóvoa-Valiñas M. C., Pérez-López M., Melgar M. J. Comparative study of the purification and characterization of the cytosolic glutathione S-transferases from two salmonid species: Atlantic salmon (*Salmo salar*) and brown trout (*Salmo trutta*) // Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 2002. Vol. 131, N 2. P. 207–213.
- Pérez-López M., Anglade P., Bec-Ferté M. P., Debrauwer L., Perdu E., Cravedi J. P., Rouimi P. Characterization of hepatic and extrahepatic glutathione S-transferases in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) and their induction by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl // Fish Physiology and Biochemistry. 2000. N 22. P. 21–32.

Pham R. T., Gardner J. L., Gallagher E. P. Conjugation of 4-hydroxynonenal by largemouth bass (*Micropterus salmoides*) glutathione S-transferases // Marine Environmental Research. 2002. Vol. 54. P. 291–295.

Ramage P. I. N., Nimmo I. A. The substrate specificities and subunit compositions of the hepatic glutathione S-transferases of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // Comp. Biochem. Physiol. 1984. Vol. 78B, N 1. P. 189–194.

Ramage P. I. N., Rae G. H. and Nimmo I. A. Purification and properties of the hepatic glutathione S-transferases of the atlantic salmon (*Salmo salar*) // Comp. Biochem. Physiol. 1986. Vol. 83B, N 1. P. 23–29.

Salinas A. E., Wong M. G. Glutathione S-transferases – A review // Current Medicinal Chemistry. 1999. Vol. 6. P. 279–309.

Sheehan D., Meade G., Foley V. M., Dowd C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily // Biochem. J. 2001. Vol. 360. P. 1–16.

Strange R. C., Spiteri M. A., Ramachandran S., Fryer A. A. Glutathione-S-transferase family of enzymes // Mutation Research. 2001. Vol. 482. P. 21–26.

Suzuki T., Takagi Y., Osanai H., Li L., Takeuchi M., Katoh Y., Kobayashi M., Yamamoto M. Pi class glutathione S-transferase genes are regulated by Nrf 2 through an evolutionarily conserved regulatory element in zebrafish // Biochem. J. 2005. Vol. 388. P. 65–73.

Trute M., Gallis B., Doneanu C., Shaffer S., Goodlett D., Gallagher E. Characterization of hepatic glutathione S-transferases in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) // Aquatic Toxicology. 2007. Vol. 81. P. 126–136.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Борвинская Екатерина Витальевна

младший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия 185910
E-mail: katsu@inbox.ru
тел.: (8142) 571879

Смирнов Лев Павлович

ведущий научный сотрудник, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
E-mail: levps@rambler.ru
тел.: (8142) 571879

Немова Нина Николаевна

директор, чл.-корр. РАН, д. б. н., проф.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
E-mail: nemova@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 783615

Borvinskaya, Ekaterina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: katsu@inbox.ru
tel.: (8142) 571879

Smirnov, Lev

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: levps@rambler.ru
tel.: (8142) 571879

Nemova, Nina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: nemova@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 783615

УДК 581.1:575.22:57.084:57.017.32

РЕТРОСПЕКТИВА ИССЛЕДОВАНИЙ ВОДНОГО СТАТУСА КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ НА БАЗЕ КОЛЛЕКЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ ВИР

Э. А. Гончарова, Ю. В. Чесноков, М. Н. Ситников

*Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства
им. Н. И. Вавилова Россельхозакадемии*

Приводится обзор исследований водного режима растений, включая физиологические классические и современные методы, а также современные данные по молекулярно-генетическому картированию QTL (Quantitative Trait Loci) физиологических признаков водообмена у культурных растений. Представлена ретроспектива развития физиолого-генетического изучения водного режима на базе коллекции генетических ресурсов растений Всероссийского НИИ растениеводства (ВИР). Показано, что использование современных и традиционных методических приемов может быть эффективным при выявлении генетических детерминант (QTL), определяющих проявление количественных физиологических хозяйственно ценных признаков. Выявленные QTL могут представлять интерес для углубленного изучения физиолого-генетических механизмов водообмена и осуществления маркер-вспомогательной селекции пшеницы на засухоустойчивость.

Ключевые слова : водообмен, количественные физиологические признаки, засухоустойчивость, картирование, QTL.

E. A. Goncharova, Yu. V. Chesnokov, M. N. Sitnikov. A RETROSPECTIVE REVIEW OF RESEARCH INTO THE WATER STATUS OF CULTIVATED PLANTS BASED ON THE GENETIC RESOURCES COLLECTION OF THE ALL-RUSSIAN RESEARCH INSTITUTE OF PLANT INDUSTRY

An overview of research into the water regime of plants carried out at the All-Russian Research Institute of Plant Industry (VIR), including classic and modern physiological techniques, as well as recent data on molecular genetic mapping of QTL (Quantitative Trait Loci) of the physiological traits of the water exchange in cultivated plants is provided. The evolution of physiological-genetic studies of the water regime is represented in retrospective relying on the VIR collection of plant genetic resources. We show that modern and traditional techniques can be effectively applied to find the genetic determinants (QTL) that control the manifestation of quantitative physiological commercially valuable traits. The QTL identified may be of interest for in-depth study of the physiological-genetic mechanisms that drive water exchange and for marker-aided selection of wheat for drought tolerance.

Key words : water exchange, quantitative physiological traits, drought tolerance, mapping, QTL.

Введение

Разностороннее изучение генетических растительных ресурсов в Государственном научном центре РФ ВНИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова (ВИР) обязывает разрабатывать новые подходы и усовершенствовать методологии физиолого-биохимических, эколого-генетических и молекулярных исследований. Их значительная часть использована для изучения стрессоустойчивости культурных растений к разным погодноклиматическим условиям.

Известно, что важнейшую регуляторную роль в жизнедеятельности растений играет их водный статус, оценка которого разными современными методами (физиологическими, биохимическими, биофизическими, радиоизотопными и молекулярными) позволяет определить его вклад в ростовые, продукционные, адаптационные процессы при разных взаимодействиях «генотип-среда».

Для понимания причинной обусловленности названных явлений необходимо выявить внутренне физиолого-генетические механизмы регуляции формирования элементов структуры урожая и проявления их в экстремальных условиях внешней среды.

Устойчивость сельскохозяйственных культур к неблагоприятным почвенно-климатическим условиям должна быть обеспечена на основе существенной перестройки физиологических и метаболических процессов в растениях, с тем чтобы свести к минимуму потери хозяйственно ценной части урожая за счет прекращения или замедления процессов синтеза и реутилизации органических веществ [Жученко, 2009].

Одним из наиболее разрушительных абиотических стрессовых факторов, которым подвергается растительный организм, является недостаточное обеспечение растений водой. Так, ущерб, наносимый засухой, порой превышает ущерб от любого другого стрессора. Засуха и борьба с ней сопровождают всю историю мирового земледелия. Около 70 % воды, используемой человечеством, потребляется в сельском хозяйстве. Сокращение ее запасов, а также глобальное изменение климата и увеличение численности населения все более остро ставят вопрос об эффективности пользования пресной водой. Для решения этого вопроса обычно применяют два связанных между собой пути – совершенствование агротехнологий и выведение сортов, устойчивых к недостаточной влагообеспеченности. В современных условиях эффективная селекционная работа в этом направлении возможна только на основе знаний о физиолого-генетических механизмах,

обеспечивающих растению устойчивость к неблагоприятным факторам внешней среды.

Водный дефицит в растениях приводит прежде всего к снижению содержания свободной воды, одновременно возрастает концентрация клеточного сока. Происходят глубокие изменения в цитоплазме, увеличивается ее вязкость. Возрастает проницаемость мембран. Клетки теряют способность к поглощению питательных веществ. Изменения связаны с нарушениями в структуре мембран, которые наблюдаются при снижении содержания воды ниже 20 % от массы. В результате нарушения гидратных оболочек меняется конфигурация белков-ферментов и, как следствие, их активность. Изменяется нуклеиновый обмен, при возрастании водного дефицита усиливается распад РНК, возрастает активность рибонуклеаз, приостанавливается синтез ДНК. Возможно, изменение в нуклеиновом обмене является одной из причин остановки синтеза белков. В условиях водного дефицита при закрытых устьицах в клетках тормозится поступление углекислого газа. Недостаток CO₂ вызывает ослабление фотосинтеза и, как следствие, некоторый избыток кислорода. В таких условиях возможно накопление супероксидных радикалов, что приводит к развитию перекисного окисления липидов и повреждению мембран. В этой связи важным моментом адаптации растений к условиям засухи является развитие антиоксидантной системы и образование соответствующих ферментов. Как и при других стрессорах, важное значение в обеспечении устойчивости при засухе имеет образование особых стрессовых белков. Это, например, большая группа белков-дегидринов (LEA-белки). Они обычно синтезируются в период позднего эмбриогенеза, когда происходит естественное обезвоживание семян. При обезвоживании LEA-белки предохраняют клеточные структуры от дегградации, связывая воду. Возрастает роль белков, участвующих в транспорте воды через мембраны, – аквапоринов. Защита ДНК при засухе осуществляется другими стрессовыми белками – шаперонами. Значение этих белков заключается в поддержании целостности ДНК при обезвоживании [Кузнецов, 2005]. Вместе с тем дальнейшее воздействие недостатка воды приводит к таким нарушениям, которые вызывают повреждение организма. Нарушения могут иметь обратимый и необратимый характер.

Следует отметить, что существует два определения засухоустойчивости, за которыми скрываются разные механизмы. Первое (экологическое) – способность растений выжить

в условиях засухи. При этом сохранение урожайности не так важно. Второе определение – агрономическое: под засухоустойчивостью понимают способность растений сохранить урожайность в условиях засухи. Здесь необходимо учитывать специфическую особенность физиологической адаптации растений, связанную с тем, что такая адаптация базируется на использовании свободно протекающих в растительных организмах, почве и агроэкосистеме биологических процессах. Весьма ограниченные способности культивируемых растений регулировать свою внутреннюю среду (особенно температурный и водный режим) обуславливают необычно высокую зависимость такой отрасли сельского хозяйства, как растениеводство, от почвенно-климатических и погодных условий, основные параметры которых (температура, освещенность, влагообеспечение и др.), как известно, нельзя оптимизировать только за счет агротехники [Жученко, 2009].

Выяснение физиологических особенностей, определяющих устойчивость растений к недостатку влаги, является одной из важнейших задач, решение которой имеет большое теоретическое и практическое сельскохозяйственное значение. И для этого решения необходимы всесторонние знания о водообмене растительного организма.

Исторический аспект изучения водного режима и устойчивости растений в ВИР

Проблема изучения водного режима растений в связи с условиями окружающей среды издавна привлекает внимание исследователей: начиная с работы К. А. Тимирязева «Борьба растений с засухой» [1922] и до 61-х Тимирязевских чтений «Транспорт воды в растении и его регуляция» [Жолкевич, 2001]. Н. И. Вавилов был одним из первых, кто понял всю важность изучения физиолого-экологических основ адаптации растений к окружающей среде. Он подчеркивал не только необходимость сбора и сохранения зародышевой плазмы диких видов и примитивных форм, но и целесообразность изучения и использования ее в селекции [Вавилов, 1967].

Исследования в области устойчивости растений к стрессам начались в ВИР с середины 20-х годов прошлого века, со времени организации отдела физиологии растений, который возглавляли известные ученые Н. А. Максимов (с 1924 по 1933) и И. И. Туманов (с 1933 по 1941). Под их руководством развернулись широкие исследования засухо- и морозоустойчивости растений (в основном зерновых злаков), результаты которых внесли принципиально но-

вый вклад в теорию познания и методологию диагностики устойчивости растений к стрессам, не утратившие своего значения и до настоящего времени. С самого зарождения отдела основное внимание его коллектива сосредоточилось на изучении вопросов зимостойкости и засухоустойчивости растений. Научные труды этих ученых, среди которых наиболее известны монографии «Физиологические основы засухоустойчивости растений» Н. А. Максимова [1926], удостоенная в 1930 г. Ленинской премии, и «Физиологические основы зимостойкости культурных растений» И. И. Туманова [1940], получили всемирное признание и оказали большое влияние на развитие советской и мировой науки. Они легли в основу интенсивно развивавшейся в СССР в довоенный период экологической физиологии растений, раскрыли узловые моменты повреждения растений засухой и морозами, дали толчок разработке методов количественного учета степени повреждения растений стрессами (метод учета повреждения протоплазмы по ее проницаемости, метод засушников и т. д.), а также массовой оценки сортовых различий устойчивости к стрессам у культурных растений. Все эти направления работ, особенно два последних (разработка методов оценки устойчивости растений, оценка сортовых различий устойчивости), имели существенное значение для интродукции и селекции растений, т. е. явились реализацией основополагающих заветов Н. И. Вавилова о целевых задачах физиологии в раскрытии потенциала растительных ресурсов мира.

Н. А. Максимов сформулировал основные теоретические концепции в этой области. Была доказана полная несостоятельность господствовавшей до этого теории засухоустойчивости А. Шимпера, построенной на морфологических признаках растения. Работа Максимова оказала огромное влияние на дальнейшее изучение проблемы засухоустойчивости не только в Советском Союзе, но и за рубежом. Начав с изучения почвенной засухи, Н. А. Максимов организует исследования и по атмосферной засухе. Первые физиологические данные о различном влиянии атмосферной и почвенной засухи получили Т. А. Красносельская и И. Н. Кондо, использовавшие для этого сконструированную в ВИР первую в стране сушвейную установку. Были выдвинуты такие понятия, как «захват», вызываемый нарушением водного баланса растений, и «запал», получающийся в результате действия высокой температуры. У растений, выращенных при пониженной влажности почвы, повышалась устойчивость (закаленность) к повторной засухе.

Основным итогом исследований Н. А. Максимова и его учеников стал вывод, что одним из важнейших свойств засухоустойчивых растений является их способность (с наименьшим для себя вредом) выдерживать большую потерю воды, способность их протоплазмы переносить глубокое обезвоживание, не подвергаясь необратимой коагуляции. На первое место выдвинулись физико-химические особенности составляющих протоплазму коллоидов. Этим проблему засухоустойчивости перевели из области морфолого-анатомических построений в разряд проблем коллоидно-химического характера.

Теория засухоустойчивости, разработанная Н. А. Максимовым в ВИР, послужила основой для развития частной (агроэкологической) физиологии растений. Это направление потребовало новых методов оценки засухоустойчивости растений. Разработанный в тот период И. И. Тумановым вегетационный метод завядания получил всеобщее признание и до настоящего времени является одним из основных способов лабораторной оценки устойчивости растений к почвенной засухе [Гончарова, 2005, 2011а, б].

С 1932 по 1941 гг. под руководством И. И. Туманова проведена большая комплексная работа по изучению коллекции яровой пшеницы на устойчивость к почвенной и атмосферной засухе в различных географических пунктах.

В послевоенный период исследования по физиологии устойчивости растений в ВИР осуществлялись под руководством В. И. Разумова (1947–1971 гг.). Тогда основное внимание сотрудников лаборатории было обращено на исследование устойчивости растений в связи с изучением их роста и развития. В 1961 г. В. И. Разумовым была опубликована монография «Среда и развитие растений», в которой он описал влияние света и температуры на развитие сельскохозяйственных растений. На большом числе образцов из коллекции ВИР была доказана зависимость фотопериодической реакции культурных растений от их происхождения, выявлена связь между температурными условиями прохождения этапов энтогенеза и климатическими условиями места происхождения растений. В эти годы лаборатория внесла большой вклад в развитие частной физиологии культурных растений. При этом установлено явление «фотопериодического последствия», выяснена роль интенсивности света в фотопериодической реакции и определены пределы изменчивости длины дня, благоприятные для генеративного развития или клубнеобразования растений.

С 1967 г. отделом физиологии устойчивости растений руководил профессор Г. В. Удовенко, организовавший и в течение 35 лет возглавляв-

ший систематические физиолого-генетические исследования стрессоустойчивости мирового генофонда культурных растений и их диких родичей к абиотическим факторам. Итогом этих исследований под руководством Г. В. Удовенко в ВИР явился целый ряд новых обобщений важного теоретического и практического значения. Г. В. Удовенко обнаружил значительную общность в характере реакций растений на разные типы стрессорных факторов. Анализ результатов показал качественно одинаковый характер изменения параметров у растений под влиянием разнотипных стрессоров, что позволило автору уже в эти годы сделать выводы об однотипной (неспецифической) адаптации растений к различным экстремальным воздействиям. Вывод о неспецифичности адаптации растений к разным неблагоприятным факторам имеет принципиально важное значение для более глубокого и детального выяснения общей природы устойчивости растений к различным стрессам, а также для разработки общих принципов диагностики приемов повышения устойчивости растений. Особо ценными явились разработанные теоретические представления об общности метаболических перестроек у растений при разных видах стрессов и концепция о механизмах отдельных фаз адаптации растений к стрессам, впервые сформулированная в обобщенном виде в монографии «Солеустойчивость культурных растений» [1977]. На основании этих исследований была разработана теория устойчивости и адаптации сельскохозяйственных растений к экстремальным воздействиям и предложены принципы их диагностики [Удовенко, 1977; Физиологические..., 1995].

Многолетние исследования мирового генофонда растений из коллекции ВИР позволили установить новые закономерности взаимодействия «генотип-среда», выявить существенные изменения проявления генотипических различий адаптивности сортов к стрессам в зависимости от этапа органогенеза, морфотипа растений и сопутствующих стрессу средовых факторов, составить рабочую модель оптимального средового комплекса для эффективного выявления ценных генетических источников [Драгавцев и др., 1995].

В разные годы для изучения механизмов адаптации растений к экстремальным условиям физиологи использовали различные методы (радиоизотопные, биофизические, биохимические и т. д.). Так, например, при изучении транспорта ассимилятов [Удовенко, 1977; Гончарова, 2005] использовалось введение радиоактивной ^{32}P -метки, при изучении передвижения воды между органами растения – три-

тивной метки. Для моделирования различных условий засухи – градиент осмотического потенциала [Кожушко, 1988, 1991].

Следует отметить, что в современной литературе имеется большое количество публикаций о влиянии экстремальных гидротермических условий среды на водный обмен различных видов и семейств растений. Анализируя хорошо согласованные между собой данные по этой проблеме, возможно заключить следующее. Как правило, в стрессовых условиях существенно снижается оводненность тканей растений и происходит перераспределение подфондов воды в клетке. При этом возрастает количество трудноизвлекаемой и резко снижается количество слабосвязанной воды. В результате снижается подвижность воды и активность метаболических процессов, но возрастает водоудерживающая способность тканей и устойчивость растений к экстремальным воздействиям.

В 1970–90-е гг. было обращено внимание на изучение водного статуса растений различных представителей ботанических семейств и видов с использованием физиологических, биофизических и радиоизотопных методов с целью определения роли воды в формировании продуктивности и устойчивости растений. В оптимальных и экстремальных условиях (засуха, засоление, высокие температуры) изучены донорно-акцепторные связи в системе вегетирующего растения между разными органами. Описана специфика аттракции и определен их вклад в адаптивный потенциал растения. Представлена топография транспорта воды, показаны особенности водных потоков и транспирации в зависимости от генотипа и условий окружающей среды у большой группы (плодово-ягодные, овощные, цитрусовые и др.) культивируемых растений [Гончарова, 1985, 2005, 2011а, б].

Полученные и накопленные к сегодняшнему дню результаты многоплановых исследований в ВИР легли в основу современных подходов для выявления генетических детерминант, определяющих проявление количественных физиологических признаков, обуславливающих водный статус растений и используемых в лаборатории молекулярной и экологической генетики ВИР.

QTL анализ и выявление генетических детерминант, определяющих эколого-физиологический контроль водного статуса растений

Отечественный и зарубежный опыт свидетельствует о крайне низких темпах измене-

ния продуктивности пшеницы в связи с засухоустойчивостью с помощью традиционной селекции. Среднегодовой вклад селекции в урожайность колеблется от 0,2 % в острозасушливых районах до 1 % в благополучных по водному режиму. Поэтому большие перспективы в этом направлении открывает маркерная селекция, т. е. выявление, идентификация, локализация и картирование хромосомных локусов и генов, с которыми ассоциируется толерантность к засухе и жаре. Идея использовать маркеры, сцепленные с хозяйственно ценными признаками, не нова. Так, например, у томата первый случай сцепления (гены *d* – карликовости и *o* – формы плода) установлен в 1917 г. [цит. по Жученко, 1973]. К 1934 г. был идентифицирован 21 ген, а в 1956 г. у томатов уже известно 118 генов, из которых 56 были картированы. Сейчас у томата построены молекулярно-генетические карты, на которых нанесено не только расположение целого ряда генов и хромосомных локусов, определяющих проявление хозяйственно ценных признаков, но и различного рода маркеры, которые можно использовать для ускорения селекционного процесса.

Начало исследованиям по построению и использованию генетических карт у растений было положено Н. И. Вавиловым, еще в 1935 г. опубликовавшим первую генетическую карту первой группы сцепления пшеницы, на которой были картированы гены скверхедности, безостости и спельтоидности [Вавилов, 1935]. В том же году опубликована первая генетическая карта кукурузы [Emerson et al., 1935]. Благодаря этим работам генетическое картирование у высших растений продвинулось намного вперед. Стали постоянно пополняться списки генов растений [Жученко, 1973; Захаров, 1979; Кобылянский, Фадеева, 1986; Дорофеев и др., 1988; Фадеева, Буренин, 1990]. Свой вклад в этом направлении внесли и продолжают вносить сотрудники Всероссийского НИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова. Так, ими были дополнены списки генов пшеницы, ржи, ячменя [Кобылянский, Фадеева, 1986], а также других злаков: кукурузы, риса, проса, овса [Дорофеев и др., 1988]. Не остались без внимания зернобобовые, овощные и бахчевые культуры [Фадеева, Буренин, 1990]. Кроме того, на основании собранных ими данных в середине второй половины XX в. сотрудниками ВИР были построены генетические карты групп сцепления мягкой пшеницы, которые были соотнесены с конкретными хромосомами [Кобылянский, Фадеева, 1986]. С развитием достижений молекулярной генети-

ки в этом направлении открылись дополнительные возможности. Начатое в 80–90-х годах прошлого столетия широкое использование молекулярных ДНК-маркеров, а также применение методологии идентификации и локализации на хромосомах, так называемых локусов количественных признаков, значительно расширили границы исследований.

В последние годы большое развитие получил метод QTL анализа (Quantitative Trait Loci), который основан на использовании молекулярных маркеров для локализации количественного признака на хромосомной карте [Чесноков, 2009]. На сегодняшний день это один из основных методов, позволяющих идентифицировать и осуществлять контролируемый перенос локусов хромосом, определяющих проявление хозяйственно ценных признаков. Для эффективного использования QTL в селекции растений необходимо знать, какие морфологические и физиологические признаки играют решающую роль в контроле урожая в тех условиях, для которых создается сорт, и также надежно идентифицировать QTL, с которыми тесно связан селекционируемый признак [Чесноков, 2009; Крупнов, 2011]. Для физиологических признаков установлены два типа локусов [Collins et al., 2008]: конститутивные, которые обнаруживаются в большинстве условий, и специфические (или адаптивные), проявляющиеся в зависимости от степени влияния стрессового фактора. Подобные результаты отмечались и в наших приоритетных для России эколого-генетических исследованиях как на пшенице [Чесноков и др., 2008; Mitrofanova et al., 2008], так и на капустных [Артемьева и др., 2008; Artemyeva et al., 2008] для целого ряда морфологических и фенологических признаков. П. А. Генкель [1982] показал, что засухо- и жаростойкость – динамические свойства, развивающиеся в процессе онтогенеза растений, и обезвоживание растений вызывает целый комплекс ответных защитно-приспособительных реакций, часть которых носит общий характер, а часть специфична. Имеются сообщения об идентификации QTL у пшеницы, контролирующей одновременно толерантность к жаре и к засухе [Olivares-Villegas et al., 2007]. У сои выявлено от 4 до 6 локусов, детерминирующих эффективность использования воды. Опыты с хлопчатником при разных уровнях водообеспеченности показали, что урожайность хлопка-сырца и качество волокна определяются разными и независимыми локусами, что принципиально позволяет совместить в одном генотипе адаптивные эффекты к дефициту почвенной влаги [Кошкин, 2010].

В наших экспериментах [Чесноков и др., 2008, 2012] по изучению азотного питания [Chesnokov et al., 2011] и водного обмена [Sitnikov et al., 2011] у растений яровой мягкой пшеницы были идентифицированы QTL, детерминирующие морфо-биологические признаки, определяющие урожайность, а также физиологические параметры водного режима растений, такие как водосберегающая способность и водный дефицит [Ситников и др., 2011].

При анализе полученных результатов было установлено, что почти все выявленные QTL превышали пороговое значение (LOD-оценка $\geq 2,5$). Процент изменчивости признаков, определяемый идентифицированными QTL, колебался от 12,5 % для признака «масса корней» до 31 % для признака «водоудерживающая способность листьев через 3 ч» (LOD-оценка $\geq 3,7$). Наибольшее количество QTL локализованы в А геноме, в то время как в D геноме были идентифицированы только три QTL.

В работах ряда авторов указывается, что наиболее засухоустойчивые сорта пшеницы отличаются большим числом корней всех типов и их суммарной массой [Крупнов, 2011]. В наших исследованиях масса корней определялась QTL, локализованными на хромосомах 5В, с изменчивостью 12,5 %, оводненность корней определялась QTL на хромосомах 5В и 6D с суммарной изменчивостью более 45 %. Необходимо также отметить совпадение локализации на хромосомах 1А и 4А QTL, детерминирующих оводненность, содержание сухого вещества и водоудерживающую способность через 24 ч. Также наблюдалось совпадение локализации QTL в контроле признаков «оводненность» и «содержание сухого вещества в корнях» на хромосоме 6D. Эти результаты подтверждают взаимосвязь физиологических механизмов, определяющих водный статус растения. Однако, как следует из полученных данных, выявленные блоки ко-адаптированных генов, определяющие водный статус надземной части и корневой системы, различаются по своему месторасположению в геноме яровой мягкой пшеницы. Это говорит об эволюционной приспособленности систем физиологической адаптации растительных организмов и необходимости комплексной оценки этих систем. Кроме того, существование ко-адаптированных блоков генов свидетельствует о явной взаимосвязи систем индивидуальной и популяционной приспособленности (*F* и *R* системы), как систем, призванных способствовать выживанию организмов в экстремальных условиях среды [Жученко, Король, 1985]. В целом идентифицированные QTL обуславливались

как доминантными, так и аддитивными эффектами, хотя большинство активных локусов было привнесено отцовской формой.

Ранее [Кожушко, 1991] при изучении коллекции пшениц было установлено, что наибольшая водоудерживающая способность листьев характерна для многих тетраплоидов – носителей геномов А и В, с присоединением генома D увеличивается водоудерживающая способность генеративных органов, что, по-видимому, способствовало распространению гексаплоидных пшениц. Так, если хромосомный набор генома А в диплоидной пшенице дегенерирует при воздействии температурного шока, то в гексаплоидной пшенице, где наблюдается взаимодействие с геномами В и D, он более устойчив. При общей слабой физиологической засухоустойчивости *Aegilops tauschii*, по сравнению с мягкой пшеницей, в наших исследованиях D геном играет существенную роль в обеспечении водного статуса растений. Полученные нами данные позволяют прояснить роль различных геномов в эволюционном формировании физиолого-генетических механизмов водообмена и засухоустойчивости у современных видов и могут быть использованы для создания высокопродуктивных засухоустойчивых сортов пшеницы.

Таким образом, накопленный на сегодняшний день огромный экспериментальный материал как теоретической, так и практической значимости и современная методология позволяют вплотную подойти к раскрытию физиолого-генетической природы водообмена в связи с засухоустойчивостью растений.

Литература

- Артемьева А. М., Калинина Е. Н., Чесноков Ю. В. Картирование QTL морфологических признаков и времени перехода к цветению вида *Brassica rapa* L. // Материалы докладов I Международной научно-практической конференции «Современные тенденции в селекции и семеноводстве овощных культур: традиции и перспективы». М.: ВНИИССОК, 2008. Т. 2. С. 56–58.
- Вавилов Н. И. Научные основы селекции пшеницы. М., Л.: Сельхозгис, 1935. 246 с.
- Вавилов Н. И. Избранные произведения в двух томах. Л.: Наука, 1967. 432 с.
- Генкель П. А. Жаро- и засухоустойчивость растений. М.: Наука, 1982. 280 с.
- Гончарова Э. А. Эндогенная регуляция плодоношения сочноплодных культур, адаптация их к экстремальным воздействиям и проблемы диагностики устойчивости. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Кишинев. 1985. 46 с.
- Гончарова Э. А. Водный статус культурных растений и его диагностика / Под ред. акад. В. А. Драгавцева. СПб.: ВИР, 2005. 112 с.
- Гончарова Э. А. Изучение устойчивости и адаптации культурных растений к абиотическим стрессам на базе мировой коллекции генетических ресурсов. СПб.: ВИР, 2011а. 353 с.
- Гончарова Э. А. Стратегия диагностики и прогноза устойчивости сельскохозяйственных растений к погодно-климатическим аномалиям // С.-х. биология, 2011б. № 1. С. 24–31.
- Дорофеев В. Ф., Фадеева Т. С., Шмараев Г. Е. (ред.). Генетика культурных растений: кукуруза, рис, просо, овес. Л.: Агропромиздат, 1988. 272 с.
- Драгавцев В. А., Гончарова Э. А., Удовенко Г. В., Выриков В. А., Туде Я. А. Взаимодействие генотип-среда при саморегуляции физиологических процессов // Докл. РАСХН. 1995. № 1. С. 5–9.
- Жолкевич В. Н. Транспорт воды в растении и его эндогенная регуляция // LXI Тимирязевские чтения. М.: Наука, 2001. 73 с.
- Жученко А. А. Генетика томатов. Кишинев: Штиинца, 1973. 420 с.
- Жученко А. А. Адаптивное растениеводство (эколого-генетические основы). Теория и практика: В трех томах. М.: изд-во «Агрорус», 2009. 2014 с.
- Жученко А. А., Король А. Б. Рекомбинация в эволюции и селекции. М.: Наука, 1985. 400 с.
- Захаров И. А. Генетические карты высших организмов. Л.: Наука, 1979. 157 с.
- Кобылянский В. Д., Фадеева Т. С. (ред.). Генетика культурных растений: зерновые культуры. Л.: Агропромиздат, 1986. 264 с.
- Кожушко Н. Н. Оценка засухоустойчивости полевых культур // В кн. «Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям» / Под ред. проф. Г. В. Удовенко. Л.: ВИР, 1988. С. 10–25.
- Кожушко Н. Н. Изучение засухоустойчивости мирового генофонда яровой пшеницы для селекционных целей: методические указания. ВИР, 1991. 92 с.
- Кошкин Е. И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур. М.: Дрофа, 2010. 640 с.
- Крупнов В. А. Засуха и селекция пшеницы: системный подход // С.-х. биология. 2011. № 1. С. 12–24.
- Кузнецов В. В., Дмитриева Г. А. Физиология растений. М.: Высшая школа, 2005. 736 с.
- Максимов Н. А. Физиологические основы засухоустойчивости растений. Л.: Госиздат, 1926. 308 с.
- Ситников М. Н., Гончарова Э. А., Чесноков Ю. В. Генетическая детерминация водного режима растений яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. // Мат-лы VII съезда Общества физиологов растений России. Нижний Новгород, 2011. Т. 2. С. 640–641.
- Тимирязев К. А. Борьба растений с засухой // Избр. соч. М. 1922. Т. 2. 209 с.
- Туманов И. И. Физиологические основы зимостойкости культурных растений. М.; Л.: Сельхозгиз. 1940. 365 с.
- Удовенко Г. В. Солеустойчивость культурных растений. Л.: 1977. 215 с.
- Фадеева Т. С., Буренин В. И. (ред.). Генетика культурных растений: зернобобовые, овощные, бахчевые. Л.: Агропромиздат, 1990. 287 с.
- Чесноков Ю. В. Картирование локусов количественных признаков у растений. СПб.: ВИР, 2009. 100 с.

Чесноков Ю. В., Гончарова Э. А., Почепня Н. В. и др. Идентификация и картирование QTL физиолого-агрономических признаков яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в градиенте азотного питания // С.-х. биология. 2012. № 3. С. 1–13.

Чесноков Ю. В., Почепня Н. В., Бернер А. и др. Эколого-генетическая организация количественных признаков растений и картирование локусов, определяющих агрономически важные признаки у мягкой пшеницы // ДАН. 2008. Т. 418. С. 693–696.

Физиологические основы селекции растений / Под ред. проф. Г. В. Удовенко и акад. РАСХН В. С. Шевелухи. СПб.: ВИР, 1995. 648 с.

Artemyeva A. M., Kalinina E. N., Zhao J. et al. Evaluation of QTL for Phenotypic Characters of *Brassica rapa* // 5th ISHS International Symposium on Brassicas and 16th Crucifer Genetic Workshop. Lillehammer, Norway. 8–12 September 2008. P. 127.

Börner A., Schumann E., Fürste A. et al. Mapping of quantitative trait loci determining agronomic important characters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 2002. Vol. 105. P. 921–936.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Гончарова Эльза Андреевна

главный научный сотрудник, д. б. н., проф.
ГНУ ВНИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова
Россельхозакадемии
ул. Большая Морская, 42, Санкт-Петербург,
Россия, 190000
эл. почта: e.goncharova@vir.nw.ru

Чесноков Юрий Валентинович

зав. лаб. молекулярной
и экологической генетики, д. б. н., проф.
ГНУ ВНИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова
Россельхозакадемии
ул. Большая Морская, 42, Санкт-Петербург,
Россия, 190000
эл. почта: yu.chesnokov@vir.nw.ru

Ситников Максим Николаевич

старший научный сотрудник
ГНУ ВНИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова
Россельхозакадемии
ул. Большая Морская, 42, Санкт-Петербург,
Россия, 190000
эл. почта: e.goncharova@vir.nw.ru

Chesnokov Yu. V., Goncharova E. A., Sitnikov M. N. et al. Mapping of agronomically important QTLs in soft spring wheat (*Triticum aestivum* L.) in gradient of nitrogen nutrition // The 15th International EWAC Conference. 2011. P. 49.

Collins N. C., Tardieu F., Tuberosa R. Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: Where do we stand? // Plant Physiology. 2008. Vol. 147. P. 469–486.

Emerson R. A., Beadle G. W., Fraser A. C. A summary of linkage studies in maize // Cornell Univ. Agr. Exp. Stn. Mem. 1935. P. 1–80.

Mitrofanova O. P., Velinda Chibomba, Kozlenko L. V. et al. Mapping of agronomic important QTL in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) // Studia Universitatis. Seria “Stiinta ale naturii”. Chisinau, CEP USM. 2008. Vol. 7 (17). P. 140–143.

Olivares-Villegas J. J., Reynold M. P., McDonald G. K. Drought-adaptive attributes in the Seri/Babax hexaploid wheat population // Func. Plant Biol. 2007. Vol. 34. P. 189–203.

Sitnikov M. N., Goncharova E. A., Chesnokov Yu. V. Genetic determination of plant water regime of bread spring wheat *Triticum aestivum* L. // The International conference «Wheat genetic resources and genomics». 2011. P. 74.

Goncharova, El'za

Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry of RAAS
42 Bol'shaya Morskaya St.,
190000 St. Petersburg, Russia
e-mail: e.goncharova@vir.nw.ru

Chesnokov, Yuri

Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry of RAAS
42 Bol'shaya Morskaya St.,
190000 St. Petersburg, Russia
e-mail: yu.chesnokov@vir.nw.ru

Sitnikov, Maxim

Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry of RAAS
42 Bol'shaya Morskaya St.,
190000 St. Petersburg, Russia
e-mail: e.goncharova@vir.nw.ru

УДК 612.112.94:57.016.4:616-002.2:615.37

СИСТЕМА РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК И АУТОИММУННЫЕ ПРОЦЕССЫ

П. Н. Кравченко, Е. К. Олейник

Институт биологии Карельского научного центра РАН

В обзоре представлены последние данные о роли основных субпопуляций регуляторных Т-клеток (Treg) в норме и при аутоиммунных заболеваниях. Рассмотрены механизмы функционирования регуляторных Т-клеток при диабете 1 типа, ревматоидном артрите, системной красной волчанке и рассеянном склерозе, также приведены результаты определения количества $CD4^+CD25^+$ Т-клеток при данных патологиях. Представлены сведения о новых молекулярных маркерах регуляторных Т-клеток. Обсуждены современные подходы к иммунотерапии больных аутоиммунными заболеваниями.

Ключевые слова: Трег клетки, аутоиммунитет, диабет 1 типа, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, рассеянный склероз.

P. N. Kravchenko, E. K. Oleinik. THE SYSTEM OF REGULATORY T CELLS AND AUTOIMMUNITY

We summarize the latest data on the role of the main subpopulations of regulatory T-cells (Treg cells) in the normal condition and in autoimmune diseases. The mechanisms of Treg cell functioning are considered for type 1 diabetes, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis; the results on the quantities of $CD4^+CD25^+$ T-cells at these pathologies are reported. Data on new molecular markers of Treg cells are presented. Current approaches to the immunotherapy for patients with autoimmune diseases are discussed.

Key words: Treg cells, autoimmunity, type 1 diabetes, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, multiple sclerosis.

Введение

Регуляторные Т-клетки (Treg) играют важную роль в поддержании иммунологической толерантности, и нарушения в их функционировании приводят к развитию различных патологий. В связи с этим в последние годы ведется активное изучение таких клеток с целью поиска эффективных способов влияния на их активность и численность. Известно, что в иммунной системе Трег клетки участвуют в контроле различных физиологических состояний организма и представ-

лены несколькими субпопуляциями [Ярилин, Донецкова, 2006]. Нарушения в системе регуляторных клеток (количественные или функциональные) могут способствовать развитию иммунологической недостаточности, снижению противоопухолевого иммунитета, развитию аутоиммунных заболеваний. Показано, что удаление $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ -клеток приводит к экспансии Т-эффекторных клеток с последующим развитием аутоиммунных расстройств [Sakaguchi et al., 2010]. Мутация гена FOXP3⁺ у человека ассоциирована с исчезновением клеток с фенотипом

CD4⁺CD25⁺ и снижением супрессорной активности. Это приводит к формированию тяжелого иммунодефицита, так называемого IPEX-синдрома (Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, and Enteropathy, X-Linked, X-ассоциированная иммунная дисрегуляция), при котором развиваются энтеропатия, тиреоидит, экзема, лимфо-пролиферативный синдром, гемолитическая анемия, тромбоцитопения, тяжелые инфекции [Sakaguchi et al., 2010].

Аутоиммунные заболевания характеризуются повреждением тканей и нарушением физиологических функций, вызванным иммунным ответом против собственных антигенов. В развитие аутоиммунных процессов могут вовлекаться аутоантигены, широко распространенные в организме, которые становятся причиной системных повреждений. В качестве аутоантигенов могут выступать любые ткани, клетки и компоненты плазмы. Например, при ревматоидном артрите антигеном является иммуноглобулин G (IgG), антиген клеточных ядер (RANA); при рассеянном склерозе – антигены мозговой ткани; при инсулинзависимом (ювенильном) диабете – цитоплазматические антигены островковых клеток поджелудочной железы. Спектр аутоиммунных заболеваний широк, а к наиболее известным из них относятся инсулинзависимый диабет, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, болезнь Крона, IPEX, тиреоидит Хасимото, псориаз, витилиго и др. Одной из причин аутоиммунизации могут быть инфекции, которые сами по себе не способны вызвать подобные заболевания. Однако инфекции могут провоцировать сбои иммунитета и приводить к аутоиммунизации. Известно, что ревматизм может развиваться вследствие перенесенной стрептококковой инфекции, а диабет – после попадания в организм вируса гепатита А.

Развитие аутоиммунных процессов в организме может быть связано с нарушениями в функциях регуляторных клеток. В тимусе в процессе дифференцировки лимфоцитов происходит селекция и гибель аутореактивных клонов, что обеспечивает толерантность к собственным тканям организма. В норме иммунная система сдерживает аутореактивность лимфоцитов с помощью регуляторных механизмов, а нарушения в этих механизмах могут привести к аутоиммунизации.

Разнообразие клинических проявлений аутоиммунных заболеваний объясняется различиями в локализации и механизмах повреждения собственных тканей и органов. Механизмы нарушения толерантности к аутоантигенам связывают с изменениями экспрессии собственных антигенов, вызванными воспалением

или повреждением тканей, воздействием вирусов и бактерий, свободных радикалов или ионизирующей радиации, некоторыми лекарственными препаратами. Аутоиммунные процессы могут быть также связаны с «молекулярной мимикрией» (сходством аутоантигенов с антигенами возбудителей инфекционных заболеваний). В настоящее время аутоиммунные заболевания входят в число самых распространенных видов патологий.

Краткая характеристика регуляторных клеток

Первоначально Treg человека были охарактеризованы S. Sakaguchi с соавт. [1995] как CD4⁺ T-клетки, которые конститутивно экспрессируют рецептор α -цепи IL-2 (CD25). Последующие исследования показали, что только CD4⁺ T-клетки, экспрессирующие высокий уровень CD25 (CD25^{high}), имеют *in vitro* супрессорную активность. Хотя CD25 используется для определения Treg, в последнее время было показано, что он также экспрессируется на активированных CD4⁺ T-клетках. Поэтому в настоящее время большинство исследователей для идентификации Treg стали использовать CD127 (α -цепь IL-7), к Treg относят CD127^{low}, а CD127^{high} – к активированным T-клеткам [Liu et al., 2006; Seddiki et al., 2006].

В настоящее время известно, что наивные CD4⁺ T-клетки после активации антигеном могут дифференцироваться в различные линии Th клеток, включающих в себя T-хелперы 1 (Th1), T-хелперы 2 (Th2), фолликулярные T-хелперы (Tfh), T-хелперы 9 (Th9), T-хелперы 17 (Th17). Treg представлены несколькими субпопуляциями T-клеток, состоящими из естественных CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (nTreg) и индуцированных регуляторных клеток (iTreg). iTreg включают в себя регуляторные клетки первого типа (Tr1), продуцирующие IL-10, T-хелперы 3 (Th3), продуцирующие TGF- β [Sakaguchi et al., 2010; Chen et al., 2011], CD8⁺ регуляторные T-клетки, такие как CD8⁺CD28⁻ клетки, CD8⁺CD122⁺, CD8⁺CD122⁺FOXP3⁺ и т. д. [Wang, 2008; Zheng et al., 2009]. Считается, что T-клетки CD4⁺CD8⁻, натуральные киллерные T-клетки (natural killers T-cells, NKT) и $\gamma\delta$ T-клетки также обладают регуляторной активностью, но пока эти клетки изучены в меньшей степени, чем CD4⁺ регуляторные клетки [McMurchy et al., 2011].

Впервые регуляторные клетки человека были выделены из периферической крови и охарактеризованы как CD4⁺CD25^{high} T-клетки несколькими группами исследователей в 2001 году [Cvetanovich, Hafler, 2010].

Транскрипционный фактор FOXP3 является каноническим специфическим маркером для Treg, так как он необходим для дифференцировки и функционирования этих клеток. По уровню экспрессии FOXP3 Treg могут быть разделены на несколько популяций: покоящиеся Treg с фенотипом CD25^{high}CD45RA⁺FOXP3^{low}, активированные Treg с фенотипом CD25^{high}CD45RA⁺FOXP3^{high}. Эти популяции обладают супрессорными свойствами *in vitro*. А третья, с фенотипом CD25^{high}CD45RA⁺FOXP3^{low} – цитокин-секретирующая, с потенциалом Th17, не проявляла супрессорных свойств [Miyara et al., 2009].

Недавно был идентифицирован транскрипционный фактор Helios (из семейства Ikaros), который экспрессируется только на nTreg и не обнаруживается на iTreg. Поэтому этот транскрипционный фактор может использоваться в качестве маркера для определения nTreg [Thornton et al., 2010].

Регуляторные клетки экспрессируют ряд функциональных молекул, которые могут использоваться как поверхностные маркеры, – GITR, CTLA-4 (CD152), galectin-1, CD38, CD62L, OX-40L, CD103, TNF-R2, TGF-βR1, CD5, I-selectin, CD45RO, CD45RA, LAG-3, neuropilin-1 (Nrp1) [Свиридова и др., 2007; Tran et al., 2009a; Shevach, 2009; Sakaguchi et al., 2010].

В последнее время стали появляться сообщения о регуляторных В-клетках [Yanaba et al., 2008; Gray and Gray, 2010; Noh et al., 2010; Noh, Lee, 2011]. В-клетки делятся на классические CD5⁺ В1 клетки и CD5⁻ – традиционные В2 клетки. В1 клетки секретируют несколько специфических аутоантител и могут участвовать в развитии аутоиммунных патологий. CD5⁺ клетки характеризуются экспрессией поверхностных маркеров B220^{lo}, IgM^{hi}, IgD⁺, CD9⁺, CD43⁺ и CD23^{lo}. В2 клетки определяются фенотипически как B220^{hi}, IgM^{hi/lo}, IgD⁺, CD9⁺, CD43⁻ и CD23^{hi}. В1 клетки секретируют IL-10, TGF-β и FoxP3, и они определены как Br1 (B10), Br3 и Breg соответственно [Noh, Lee, 2011].

Регуляторные клетки и аутоиммунные заболевания

В иммунной системе существует ряд механизмов для контроля аутоотолерантности, центральным из которых является клональная селекция и апоптоз аутореактивных Т-клеток в тимусе. Однако небольшое количество аутореактивных Т-клеток может быть обнаружено в периферической крови у здоровых доноров [Danke et al., 2004]. В норме иммунная система сдерживает аутореактивность лимфоцитов с

помощью регуляторных механизмов. Нарушение их может привести к аутоиммунизации. Аутоиммунные реакции могут возникать из-за снижения количества Treg, вследствие их недостаточного развития, пролиферации или выживания, возникновения дефектов в функциях самих Treg, резистентности эффекторных Т-клеток к действию Treg [Buckner, 2010].

Диабет 1 типа

Сахарный диабет 1 типа (Type 1 Diabetes, T1D) – заболевание эндокринной системы, характеризующееся абсолютной недостаточностью инсулина. Диабет 1 типа возникает, когда собственная иммунная система человека начинает атаковать и уничтожать инсулин-продуцирующие бета-клетки (β-клетки) островков поджелудочной железы. В результате утрачивается способность организма вырабатывать инсулин, и количество глюкозы достигает опасного уровня. Это заболевание может развиваться в любом возрасте, но чаще наблюдается в ранние периоды онтогенеза.

Ключевую роль в иммунопатогенезе этого заболевания играют цитокины: IL-1, IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-10 [Кравец и др., 2010]. IL-1β усиливает экспрессию NF-κB в β-клетках, что приводит к активации индуцибельной NO-синтазы (iNOS). Продукция NO снижает функцию митохондрий, в результате чего происходит уменьшение уровня аденозинтрифосфата (АТФ) и секреции инсулина. IL-1β в сочетании с IFN-γ проявляет цитотоксическое действие на β-клетки. IFN-γ усиливает экспрессию антигенов МНС I и II класса, а также экспрессию адгезивных молекул на β-клетках. TNF-α индуцирует апоптоз и некроз β-клеток. В то же время цитокины IL-4 и IL-10 проявляют защитное действие при T1D. Предварительная инкубация β-клеток человека с IL-4 предотвращает апоптоз, вызванный смесью IL-1, TNF-α и IFN-γ. Но у мышей трансгенная экспрессия IL-4 способствует развитию аутоиммунного сахарного диабета [Кравец и др., 2010].

Регуляторные Т-клетки могут влиять на различные стадии T1D. Как и при реакции «трансплантат против хозяина», вполне вероятно, что Treg сначала активируются в лимфоузлах поджелудочной железы. Затем CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg и Tr1 различными способами блокируют активацию и экспансию эффекторных Т-клеток. Экспрессия эффекторными клетками молекул адгезии и рецепторов хемокинов также подавляется Treg, в результате чего происходит снижение миграции эффекторных клеток в орган-мишень [Roncarolo, 2007].

В ряде исследований представлено количественное содержание CD4⁺CD25⁺ Treg в периферической крови больных T1D в сравнении со здоровыми донорами (табл. 1).

Таблица 1. Содержание регуляторных CD4⁺CD25⁺ Т-клеток в периферической крови больных диабетом 1 типа

Фенотип Treg	Количество Treg, %		Источник
	больные	здоровые	
CD4 ⁺ CD25 ⁺	4,7	5,2	Brusko et al., 2005; Jin et al., 2009
CD4 ⁺ CD25 ^{hi}	1,2	1,7	

С возрастом количество Treg у больных T1D снижается [Brusko et al., 2005; Jin et al., 2009]. В то же время Y. Jin с соавт. [2009] отмечают рост Treg в группе в возрасте до 14 лет.

По данным ряда исследователей, функциональная активность Treg у больных T1D снижается [Lindley et al., 2005; Lawson et al., 2008; Jin et al., 2009]. В исследованиях с NOD мышами (non-obese diabetic mice, экспериментальная модель диабета 1 типа) было показано, что снижение функциональной активности Treg в местах воспаления связано с понижением уровня IL-2 [Bettini, Vignali, 2009]. Также был обнаружен дефект в сигнальном пути IL-2R Treg больных. Это нарушение приводило к уменьшению восприимчивости Treg клеток к IL-2, вследствие чего снижалась его доступность Treg клеткам [Long et al., 2010].

Обнаружение способности iNKT-клеток продуцировать регуляторный цитокин IL-4 привлекло особое внимание к этим клеткам, и они стали рассматриваться как потенциальные регуляторы иммунных ответов. Были представлены данные о снижении количества (до 30 %) iNKT-клеток у NOD мышей в сравнении с неаутоиммунными штаммами, что было связано с дефектами в этих клетках [Novak, Lehuen, 2011]. Дальнейшие исследования показали, что исправление повреждений iNKT-клеток значительно снизило и частоту T1D у NOD мышей. Непосредственный анализ перенесенных диабетогенных Т-клеток в iNKT реципиентов показал, что присутствие iNKT-клеток ингибирует продукцию IL-2 и IFN-γ, а затем и пролиферацию популяции эффекторных CD4⁺ Т-клеток. Лечение NOD мышей синтетическими лигандами iNKT-клеток, такими как α-GalCer, OCH и α-GalCer (C20:2), значительно снижает тяжесть заболевания T1D в NOD колонии. α-GalCer (α-Galactosylceramide) – гликолипид, полученный от морской губки *Agelas Mauritanus*, – специфично и эффективно стимулирует iNKT-клетки, связываясь с высокой чувствительностью с тетрамерами CD1d молекулы.

Это объясняется тем, что CD1d молекула, в отличие от классической MHC молекулы, презентует антигены гликолипидной и липидной структуры. Оптимальные результаты были достигнуты только в случаях, когда лечение начиналось на очень ранней стадии при ежедневном приеме α-GalCer. Эффекторные CD4⁺ Т-клетки не способны к пролиферации в присутствии α-GalCer-активированных клеток iNKT. Введение α-GalCer приводит к привлечению CD11c⁺CD8a⁻ миелоидных дендритных клеток, вызывающих иммунологическую толерантность в лимфатических узлах поджелудочной железы, и увеличивает экспрессию CD86. Эти изменения необходимы для индукции анергии эффекторных Т-клеток [Novak, Lehuen, 2011]. У NOD мышей дефект iNKT-клеток по сравнению с неаутоиммунными штаммами обнаруживается в периферической лимфоидной ткани, но не в периферической крови. Эти данные показывают, что исследование iNKT-клеток в периферической крови не отражает состояние iNKT-клетки в органе-мишени – поджелудочной железе в случае T1D. Данные, касающиеся взаимодействия между iNKT-клетками и регуляторными Т-клетками при T1D, малочисленны. Тем не менее в лабораторных условиях стимулирование iNKT-клеток α-GalCer не меняет ни фенотип, ни количество, ни функции регуляторных CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Т-клеток [Novak, Lehuen, 2011]. Таким образом, действительную значимость взаимодействия iNKT с CD4⁺CD25⁺ Т-клетками в защите от T1D предстоит еще установить.

В последнее время особое внимание привлекают двойные негативные регуляторные Т-клетки (Double negative T cells, DN Treg). У грызунов CD3⁺CD4⁺CD8⁻ регуляторные Т-клетки составляют 1–3 % периферических Т-клеток [Shalev et al., 2011]. Эти DN Treg экспрессируют уникальный набор маркеров на поверхности клеток, включающий TCRαβ, CD25, LFA-1, CD69, CD45, CD30, CD62L и CTLA-4. Активированные DN Treg клетки могут синтезировать своеобразный профиль цитокинов, характеризующийся увеличенной продукцией IFN-γ, TNF-α и низким уровнем TGF-β. В то же время секретирование IL-2, IL-4, IL-13 или IL-10 не было обнаружено в этих клетках. DN Treg клетки могут подавлять иммунные реакции с участием CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток *in vitro* и *in vivo*. Было показано, что лечение с активированными антиген-специфическими DN Treg клетками может предотвратить развитие реакции «трансплантат против хозяина» (GVHD) и развитие аутоиммунного диабета 1 типа, индуцированного патогенными CD8⁺ Т-клетками NOD мышей. DN Treg клетки были также идентифицированы и у человека. Эти

клетки составляют 1–2 % от общего числа CD3⁺ Т-клеток в крови и лимфоузлах у здоровых доноров. Подобно DN Treg клеткам мышей, активированные DN Treg клетки человека секретируют высокие уровни IFN- γ , но не IL-2, и очень низкие уровни IL-10 и IL-4. DN Treg клетки были способны распознавать МНС-пептидные комплексы APCs, тем самым приобретая способность к индукции апоптоза и подавлению пролиферации антиген-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов (cytotoxic T lymphocyte (CTL)) [Shalev et al., 2011].

Ревматоидный артрит

По современным представлениям, ревматоидный артрит (Rheumatoid Arthritis, RA) – это хроническое заболевание неизвестной этиологии, со сложным аутоиммунным патогенезом, характеризующееся хроническим воспалением синовиальной оболочки суставов и прогрессирующей деструкцией хрящевой и костной ткани. С риском развития RA связывают гены STAT4, PTPN22, HLA-DRB1 [Core, 2008].

Развитие RA вызывается проникновением в полость сустава экзогенного или эндогенного антигена. Он поглощается макрофагами и дендритными клетками, где подвергается процессингу и затем презентуется CD4⁺ Т-лимфоцитам. Сенсибилизированные Т-клетки путем прямых межклеточных взаимодействий и выработки цитокинов активируют макрофаги и фибробласты, которые в свою очередь продуцируют провоспалительные цитокины, стимулирующие рост и пролиферацию Т-лимфоцитов, а также моноцитов, синовиоцитов, хондроцитов, эндотелиальных клеток.

Провоспалительный IL-1, продукции которого способствует TNF- α , повышает выработку NO-синтетазы и содержание оксида азота, что в дальнейшем способствует гибели хондроцитов. При RA обнаружен повышенный уровень IL-17 и его рецепторов (IL-17A и IL-17C) в синовиальной ткани, синовиальной жидкости и супернатантах культур мононуклеарных клеток синовиальной оболочки [Lubberts et al., 2004]. IL-17 индуцирует синтез провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-6, IL-1 β , гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) и хемокина CCL20; оказывает синергическое действие на продукцию медиаторов воспаления совместно с TNF- α и IL-1 β ; непосредственно стимулирует стромальные клетки, макрофаги, хондроциты, вызывая разрушение хрящевой и костной ткани [Miossec, 2007; Core, 2008].

Пролиферация эффекторных Т-лимфоцитов может подавляться Treg клетками экспрессией CTLA-4 и иммуносупрессорных цитокинов TGF- β -1, IL-10 и IL-35 [Steward-Tharp et al., 2010].

В ряде исследований представлено количественное содержание CD4⁺CD25⁺ Treg в периферической крови больных RA в сравнении со здоровыми донорами (табл. 2).

Таблица 2. Содержание регуляторных CD4⁺CD25⁺ Т-клеток в периферической крови больных ревматоидным артритом

Фенотип Treg	Количество Treg, %		Источник
	больные	здоровые	
CD4 ⁺ CD25 ⁺	↓ 5,5	11,1	Mottonen et al., 2005; Liu et al., 2005; Aerts et al., 2008
CD4 ⁺ CD25 ^{bright}	↓ 2,1	5,1	Liu et al., 2005; Lee et al., 2008; Aerts et al., 2008
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺	5,0	5,4	Venken et al., 2007
CD4 ⁺ CD25 ^{low}	↑ 19	14	Aerts et al., 2008
CD4 ⁺ CD25 ^{low}	↓ 5,6	5,9	
CD4 ⁺ CD25 ^{low} FOXP3 ⁺	↓ 4,8	5,6	

Примечание. ↓ – уменьшение количества Treg клеток в периферической крови больных;

↑ – увеличение количества Treg клеток в периферической крови больных.

У больных RA снижена супрессорная функция Treg клеток в периферической крови, Treg клетки подавляют пролиферацию эффекторных Т-лимфоцитов, но не их способность синтезировать провоспалительные цитокины [Ehrenstein et al., 2004]. Более высокое содержание Treg клеток обнаружено в синовиальной жидкости, чем в периферической крови у больных RA [Mottonen et al., 2005; Liu et al., 2005].

Было показано также снижение числа iNKT-клеток в периферической крови больных RA. Исследования показали, что нарушения в этих клетках вызывают воспаление синовиальной оболочки сустава, что свидетельствует о возможном участии iNKT-клеток в аутоиммунизации [Novak, Lehen, 2011]. Дефекты iNKT-клеток у CD1d^{-/-} или Ja18^{-/-} мышей весьма благоприятно влияют на течение заболевания. При коллаген-индуцированном артрите, а также антитело-опосредованной модели RA блокада iNKT-CD1d привела к снижению тяжести заболевания. Противоречивые результаты были получены в экспериментах, анализирующих терапевтический эффект синтетических лигандов iNKT-клеток. α -GalCer и OCH защищают мышей от CIA (collagen induced arthritis mice, экспериментальная модель коллаген-индуцированного

артрита), индуцируя сдвиг иммунного ответа в сторону Th2. Однако в антитело-опосредованной модели RA α -GalCer усиливал воспалительные суставы [Novak, Lehen, 2011].

Notley с соавторами [2010] показали, что у мышей CIA, которым однократно вводили анти-CD3 антитела, снижалась тяжесть течения заболевания, что проявлялось в уменьшении степени воспаления и повреждения сустава. Это сопровождалось экспансией двух субпопуляций Treg: CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ и CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺. Авторы отмечают, что CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg у этих мышей не проявляли иммунной супрессии в отличие от популяции индуцированных CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg, которая была способна подавлять эффекторные Т-клетки и продукцию IFN- γ и IL-17.

Системная красная волчанка

Системная красная волчанка (Systemic Lupus Erythematosus, SLE) является аутоиммунным заболеванием, затрагивающим многие органы, включая кожу, суставы, почки и центральную нервную систему. Это заболевание характеризуется В- и Т-клеточными нарушениями, связанными с отсутствием толерантности и последующей активацией и экспансией аутореактивных лимфоцитов, секретированием воспалительных цитокинов и продукцией широкого спектра аутоантител. При системной красной волчанке аутоантитела направлены против внутриядерных нуклеиновых кислот, белков и нуклеопротеиновых комплексов.

Причина появления этого заболевания до конца не ясна. Предполагается, что патогенез SLE может быть связан не только с дефектами в Treg, но и обусловлен генетической предрасположенностью [Moser et al., 2009]. Комбинации аллелей риска и механизмы, которые приводят к предрасположенности к аутоиммунизации, изучены мало. В последнее время анализ генома значительно увеличил количество генов, связанных с SLE [Crispin et al., 2010]. Функция этих генов изменчива. Некоторые, такие как IRF5, STAT4, IRAK1, TREX1 и TLR8, участвуют в считывании НК и продукции интерферона, в то время как другие контролируют Т-(PTPN22, TNFSF4, PDCD1) или В-(BANK1, BLK, LYN) клеточные сигнальные пути (например, PTPN22 регулирует активацию лимфоцитов) [Crispin et al., 2010]. Гены IRF5 и STAT4 дополнительно увеличивают риск SLE [Abelson et al., 2009], а гены TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 и IL-10 определены как локусы риска для SLE [Gateva et al., 2009].

В ряде исследований представлено количественное содержание CD4⁺CD25⁺ Treg в периферической крови больных SLE в сравнении со здоровыми донорами (табл. 3).

Таблица 3. Содержание регуляторных CD4⁺CD25⁺ Т-клеток в периферической крови больных системной красной волчанкой

Фенотип Treg	Количество Treg, %		Источник
	больные	здоровые	
CD4 ⁺ CD25 ⁺	↓ 6,1	22,1	Lin et al., 2007; Lyssuk et al., 2007; Lee et al., 2008; Zhang et al., 2008; Azab et al., 2008; Showdary Venigala et al., 2008; Barreto et al., 2009
CD4 ⁺ CD25 ^{high}	↓ 2,2	3,8	Lee et al., 2008; Zhang et al., 2008; Habibagahi et al., 2010
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺	↓ 1,8	5,4	Lyssuk et al., 2007; Venken et al., 2007; Yan et al., 2008
CD4 ⁺ CD25 ^{high} FOXP3 ⁺	↑ 2,6	1,7	Showdary Venigala et al., 2008; Suen et al., 2008
CD4 ⁺ CD45 ^{lo} FOXP3 ^{lo}	↑ 4,2	3,0	Miyara et al., 2009
CD4 ⁺ CD45 ^{lo} FOXP3 ^{hi}	↑ 10,4	3,0	
CD4 ⁺ CD45 ^{hi} FOXP3 ^{hi}	↓ 1,2	3,0	
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁺	↓ 4,5	9,4	Yang et al., 2009
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ⁺	↓ 0,4	0,9	Henriques et al., 2010
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺	↑ 7,5	1,4	Bonelli et al., 2011

Примечание. ↓ – уменьшение количества Treg клеток в периферической крови больных;
↑ – увеличение количества Treg клеток в периферической крови больных.

Большинство исследований показали значительное снижение супрессорной способности CD4⁺CD25⁺ Treg у пациентов с активной SLE по сравнению со здоровыми донорами [Lyssuk et al., 2007; Bonelli et al., 2008]. Тем не менее есть данные о таком же снижении супрессорной активности CD4⁺CD25⁺ Treg у пациентов с неактивной SLE [Lyssuk et al., 2007]. В то же время ряд авторов отмечают нормальный уровень супрессии Treg у больных как с активной, так и с неактивной формой заболевания [Yan et al., 2008; Vargas-Rojas et al., 2008]. Предполагается, что эффекторные клетки у больных с SLE становятся резистентными к действию CD4⁺CD25⁺ Treg [Vargas-Rojas et al., 2008].

М. Bonelli с соавт. [2011] исследовали CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Т-клетки, уровень которых в крови больных был очень высок. Эти клетки фенотипически и в определенной степени функционально походили на регуляторные клетки.

Обработка мононуклеаров периферической крови (PBMCs) SLE пациентов анти-DNA Ig G-пептидом показала увеличение количества CD4⁺CD25^{high} Tregs *in vitro* и усиление их супрессорной функции [Dinesh et al., 2010].

Сыворотка крови больных SLE характеризуется высокой концентрацией IL-6, который может оказывать влияние на иммунные клетки [Scheinecker et al., 2010]. Было показано, что повышенное количество IL-6 приводит к увеличению резистентности эффекторных Т-клеток к Treg опосредованной супрессии. Также IL-6 может оказать влияние на функции Treg и перенаправить дифференцировку Treg в IL-17 продуцирующие Th17-клетки [Scheinecker et al., 2010]. Это может быть причиной увеличения уровня IL-17 у SLE пациентов [Ouyang et al., 2008].

Изучение CD8⁺Treg у SLE больных показало, что количество этих регуляторных клеток в периферической крови может быть несколько ниже или не отличаться от показателей у здоровых доноров [Dinesh et al., 2010]. Filaci с соавт. [Dinesh et al., 2010] в своем исследовании обнаружили, что CD8⁺ Treg клетки больных секретируют небольшое количество IL-6 и значительное количество IL-12 по сравнению со здоровыми донорами. Регуляторная функция зависела от IFN-γ и IL-6. Авторы предположили, что дисфункция CD8⁺ Treg клеток у больных скорее всего связана с дисбалансом между ингибиторным (IL-6) и стимулирующим (IL-12) цитокинами.

L. Zhang с соавт. [2009] показали, что трансплантация аутологичных гематопоэтических стволовых клеток может вызвать длительную ремиссию у больных волчанкой. При этом было обнаружено увеличение количества CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺, CD8⁺FOXP3⁺ и CD8⁺CD103⁺ Т-клеток. Причем CD8⁺FOXP3⁺ Т-клетки экспрессировали высокий уровень LAP (latency-associated peptide), CD103, PD-1, PD-L1 и CTLA-4. Супрессорную функцию CD8⁺ Treg проявляли секрецией TGF-β [Zhang et al., 2009].

Рассеянный склероз

Рассеянный склероз (Multiple Sclerosis, MS) – аутоиммунное заболевание центральной нервной системы, которое почти неизбежно приводит на определенной стадии своего развития к инвалидизации. Риск заболевания повышается у носителей генов MHC II класса, DRB1*1501, DRB5*0101 и DQB1*0602 [Barcellos et al., 2002].

В основе патогенеза лежит аутоиммунный процесс, выражающийся в дифференцировке

и активации миелин-реактивных Т-клеток, индуцирующих развитие демиелинизирующего процесса. Причем ведущая роль в развитии иммунопатологического процесса при рассеянном склерозе принадлежит популяции CD4⁺ Т-клеток. Считается, что CD4⁺Т-лимфоциты первыми встречаются с антигеном и приобретают свойства эффекторных миелинспецифических клеток [Delgado, Sheremata, 2006].

На следующем этапе происходит проникновение активированных Т-лимфоцитов через гематоэнцефалический барьер в ЦНС и их взаимодействие с антигенами миелина. В результате развивается воспалительный процесс, который приводит к повреждению головного и спинного мозга.

Важную роль в развитии MS отводят Т-хелперным клеткам 17 (Th17). Эти клетки, секретируя IL-17 и IL-22, увеличивают проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), что способствует попаданию нейроантигенов на периферию, активации и пролиферации миелин-реактивных Т- и В-клеток и последующему проникновению этих клеток в ЦНС [Селедцов и др., 2010]. Проникать через ГЭБ способны только активированные лимфоциты, которые вызывают нейротоксический эффект не только опосредованно, но и непосредственно – через контактное межклеточное взаимодействие. Значимая роль в нем может принадлежать Fas-лиганду.

Количество Treg в периферической крови больных рассеянным склерозом практически не отличается от количества у здоровых доноров. Однако некоторые авторы отмечают снижение CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg у больных по сравнению со здоровыми (табл. 4).

Таблица 4. Содержание регуляторных CD4⁺CD25⁺ Т-клеток в периферической крови больных рассеянным склерозом

Фенотип Treg	Количество Treg, %		Источник
	больные	здоровые	
CD4 ⁺ CD25 ⁺	7	6	Putheti et al., 2004
CD4 ⁺ CD25 ^{high}	↓ 1,2	2,3	Viglietta et al., 2004; Putheti et al., 2004; Feger et al., 2007
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺	↓ 3,5	5,7	Haas et al., 2007; Venken et al., 2007
CD4 ⁺ CD25 ^{bright} FOXP3 ⁺ PD1 ⁺	↑ 2,5	1,1	Saresella et al., 2008
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low}	4,6	4,7	Mikulkova et al., 2010

Примечание. ↓ – уменьшение количества Treg клеток в периферической крови больных;

↑ – увеличение количества Treg клеток в периферической крови больных.

У больных MS выявлен дисбаланс CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток за счет повышения количества CD8⁺ Т-клеток [Mikulkova et al., 2010]. Также установлено снижение функциональной активности Treg больных, как в стадии ремиссии, так и в стадии обострения заболевания [Viglietta et al., 2004; Venken et al., 2007]. Выявлено увеличение количества Treg в спинномозговой жидкости по сравнению с количеством Treg в периферической крови [Fritzsching et al., 2011]. Fritzsching с соавт. [2011] обнаружили в цереброспинальной жидкости больных субпопуляцию CD45RO^{hi}CD49^{hi} Treg, которая была чувствительна к CD95-опосредованному апоптозу. В другом исследовании была обнаружена субпопуляция регуляторных клеток, экспрессирующая CD39, которая была способна подавлять не только пролиферацию эффекторных клеток, но и продукцию IFN- γ , а также продукцию провоспалительного цитокина IL-17. Однако CD4⁺FOXP3⁺CD39⁺ Treg, выделенные из крови больных, не проявляли способности к супрессии Th17 иммунного ответа [Fletcher et al., 2009].

Предполагается, что Tr1 клетки, возможно, играют защитную роль у больных рассеянным склерозом. Генерация продуцирующих IL-10 Т-клеток была ослаблена у больных в сравнении со здоровыми. У EAE мышей (experimental autoimmune encephalomyelitis – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, модель рассеянного склероза) перенесенные *in vitro* генерированные Tr1 клетки, специфичные к яичному альбумину, могут предотвратить развитие неврологических симптомов при интракраниальном введении белка [Pot et al., 2011]. Клетки Tr1, индуцированные *in vivo* растворимым основным белком миелина (MBP) p87-99, могут снизить тяжесть заболевания EAE у крыс, иммунизированных MBP. Кроме того, Meiron с соавт. [Pot et al., 2011] сообщили, что стромальный клеточно-зависимый фактор 1 α (stromal cell-derived factor 1 α (CXCL12)) перенаправляет поляризацию эффекторных Th1 клеток в CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺IL-10^{high} антиген-специфические регуляторные Т-клетки, которые подавляют аутоиммунное воспаление у EAE мышей.

CD8⁺CD122⁺ Т-клетки определяют как естественно образованные IL-10 продуцирующие регуляторные Т-клетки. Они непосредственно подавляют продукцию IFN- γ и пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток *in vitro*. CD8⁺CD122⁺ Т-клетки также играют важную регуляторную функцию *in vivo*, на что указывает их способность подавлять EAE и предотвращать развитие аномальных Т-клеток у

CD122-дефицитных мышей. Эта субпопуляция проявляет свои функции в основном за счет секретирования IL-10. Удаление гена IL-10 или использование анти-IL-10 моноклональных антител (mAb) отменяет супрессорную активность CD8⁺CD122⁺ Т-клеток *in vitro* [Shalev et al., 2011].

В настоящее время определена еще одна субпопуляция регуляторных клеток, экспрессирующая TCR $\alpha\beta$ и CD8 $\alpha\alpha$ [Trevor et al., 2008]. Высокая концентрация таких клеток была обнаружена в популяции внутриэпителиальных лимфоцитов кишки (40 %), в то время как в селезенке и лимфатических узлах их число было значительно ниже (< 1 %). Предполагается, что эти клетки могут играть важную роль в регуляции иммунитета слизистых оболочек. В поддержку данной концепции исследователи продемонстрировали, что TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ Treg клетки предотвращают колит, индуцированный CD4⁺CD45RB^{high} Т-клетками, у SCID мышей (severe combined immunodeficiency, модель тяжелого комбинированного иммунодефицита). Эта ингибирующая активность зависела от продукции IL-10, так как TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ Treg клетки от IL-10-дефицитных мышей не могли эффективно предотвратить болезнь [Shalev et al., 2011]. В дополнительных экспериментах было показано, что TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ Treg клетки могут подавлять развитие EAE [Trevor et al., 2008].

Иммунотерапия при аутоиммунных заболеваниях

В настоящее время основным направлением в иммунотерапии больных аутоиммунными заболеваниями является подавление чрезмерной активации Т-лимфоцитов. Наиболее часто используется метод, который связан с блокадой ко-стимуляции Т-клеток с помощью препарата абатацепт [Davis et al., 2008]. Абатацепт (CTLA-4Ig) – это димерный белок человека, который способен избирательно угнетать активацию Т-клеток, подобно CTLA-4. Это вещество связывается с CD80/86 на APCs, блокируя взаимодействие CD80/86 с CD28 на Т-клетках. При этом не затрагиваются другие пути ко-стимуляции Т-лимфоцитов, а в результате происходит угнетение активации и пролиферации Т-клеток, что в свою очередь приводит к уменьшению продукции провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-6, IL-1) и аутоантител [Davis et al., 2008; Goronzy et al., 2008; Folgarone et al., 2009].

Как терапевтическая мишень при аутоиммунных заболеваниях привлекает внимание PD-1. С молекулами PD-1/PD-L1 связывают ингибирующие сигналы, которые регулируют централь-

ный и периферический механизмы толерантности. Rajasalu и соавт. [2010] продемонстрировали, что селективный дефицит PD-L1 на β -клетках или отсутствие PD-1 на $CD8^+$ Т-клетках вызывает начало T1D у мышей. Установлено, что PD-L1 может способствовать развитию и функционированию Treg. Исследования показали, что PD-L1-Ig-опосредованная блокада способствует TGF- β -индуцированной генерации *de novo* $CD4^+$ FoxP3 $^+$ iTreg [Kornete, Piccirillo, 2011].

Одним из перспективных подходов к иммуно-терапии аутоиммунных заболеваний считается связывание рецепторов семейства TNF. Рецепторы этого семейства необходимы для включения сигнальных путей NF- κ B- и MAP-киназ, участвуя в усилении пролиферации Т-клеток на разных этапах иммунного ответа. В снижении пролиферации Т-эффекторов важным является блокирование специфических для этих клеток молекул OX40, 4-1BB, 4DR3. Как потенциальная терапевтическая мишень рассматривается молекула CD154 (CD40L), которая характерна для активированных клеток [Steward-Tharp et al., 2010]. Показано, что блокада ко-стимуляторов анти-CD4, анти-CD154(CD40L) мАТ не изменяет уровень пролиферации антиген-стимулированных Treg клеток *in vivo* и *in vitro*. Однако использование этих молекул значительно снижает количество антиген-специфических эффекторных клеток, приводя к доминированию Treg клеток над эффекторными [Miyara et al., 2009a].

В настоящее время установлено, что Tr1 клетки играют важную роль в контроле аутоиммунных заболеваний, влияют на активность наивных клеток и Т-клеток памяти, а также на функции дендритных клеток. Они способны подавлять функции Th1 и Th2 [Fehervari, Sakaguchi, 2005; Beissert et al., 2006]. Регулирование их функций и количества с помощью IL-27-содержащих препаратов или различных лигандов арил-углеводородного рецептора AhR (aryl hydrocarbon receptor) могут подавить иммунное воспаление через индукцию Tr1 клеток [Pot et al., 2011].

В качестве терапевтических мишеней можно рассматривать iNKT-клетки. Они секретируют ингибиторный цитокин IL-4 и способны предотвратить развитие некоторых аутоиммунных заболеваний в экспериментальных моделях [Novak, Lehen, 2011].

В последнее время внимание исследователей привлекают Th-17, которые секретируют провоспалительный цитокин IL-17, способствуя развитию аутоиммунных процессов. Ведутся поиски молекулярных мишеней для ингибирования этих клеток. Как наиболее подходящая мишень в настоящее время изучается лиганд

рецептора CCR6 – CCL20, который способствует миграции Th-17 в орган-мишень [Steward-Tharp et al., 2010].

В качестве терапевтических мишеней в последнее время рассматриваются $CD8^+$ и DN Treg, которые могут предотвратить развитие аутоиммунных заболеваний. Известно, что $CD8^+$ Treg способны подавлять эффекторные Т-клетки, продукцию IFN- γ и IL-17 [Dinesh et al., 2010], а DN Treg клетки могут ингибировать иммунные реакции с участием $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток *in vitro* и *in vivo* [Shalev et al., 2011].

В качестве биологических агентов для создания новых препаратов в лечении аутоиммунных заболеваний предлагается использовать рапамицин, анти-CD4, анти-CD40L (CD154) мАТ, которые способны индуцировать экспансию антиген-специфических Treg клеток *in vitro* и снижать количество эффекторных Т-клеток [Miyara et al., 2009a]. По данным Ohkura et al. [2011], введение рапамицина может предупредить развитие диабета 1 типа у NOD мышей.

К перспективным направлениям развития иммунотерапевтических стратегий следует отнести исследования по трансплантации стволовых клеток у больных аутоиммунными заболеваниями. Уже есть положительный опыт трансплантации аутологичных гематопозитических стволовых клеток у больных системной красной волчанкой, которая приводила к длительной ремиссии [Zhang et al., 2009].

Таким образом, наиболее перспективными направлениями изучения аутоиммунных заболеваний с целью повышения эффективности иммунотерапии являются поиск новых способов усиления экспансии Treg клеток, использование молекул-мишеней для индукции иммунной модуляции и трансплантация стволовых клеток.

Заключение

Развитие аутоиммунных заболеваний приводит к разрушению тканей и нарушению физиологических функций организма. До недавнего времени развитие органоспецифических аутоиммунных заболеваний связывали со смещением баланса провоспалительных Th1 клеток, характеризующихся продукцией IL-2, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, с противовоспалительными Th2, секретирующими IL-4, IL-10 и IL-13, в сторону первых. Исследования последних лет показали, что немаловажную роль в развитии аутоиммунных заболеваний играют Th17, которые способны индуцировать воспаление.

Изучение механизмов взаимодействия между Th17 и Treg показало, что транскрипционные факторы – ROR γ t/ROR α и FOXP3 – подавляют функции друг друга. IL-2, являющийся фактором роста для Treg, ингибирует дифференцировку Th17, в то время как IL-21, ингибирующий экспансию Treg, способствует дифференцировке Th17. Арил-углеводородный рецептор AhR, экспрессирующийся как в Treg, так и в Th17, может оказывать разное действие на дифференцировку этих клеток в зависимости от лиганда. С одной стороны, связывание AhR с одним из естественных лигандов FICZ (6-formylindolo [3,2-b] carbazole) способствует дифференцировке Th17 и увеличению продукции IL-22. С другой стороны – связывание AhR с другим синтетическим лигандом, TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin), в первую очередь увеличивает экспансию Treg за счет повышения экспрессии FOXP3 [Pot et al., 2011; Jäger, Kuchroo, 2010]. Таким образом, иммунологические механизмы поддержания толерантности и развитие аутоиммунных процессов во многом зависят от баланса между Treg и Th17, а также от активации других регуляторных клеток.

Литература

- Кравец Е. Б., Саприна Т. В., Лазаренко Ф. Э., Прохоренко Т. С., Рязанцева Н. В. Роль цитокинов в патогенезе аутоиммунного диабета, вопросы иммуноинтервенции // Бюллетень сибирской медицины. 2010. № 1. С. 76–83.
- Свиридова В. С., Кологривова Е. Н., Пронина Н. А., Елисеева Л. В., Читалкина А. А. Т-лимфоциты – ключевые иммунорегуляторные клетки // Бюллетень сибирской медицины. 2007. № 1. С. 83–88.
- Селедцов Д. В., Селедцов В. И., Иванова И. П., Литвинова Л. С. Антиген-специфическая иммунотерапия рассеянного склероза // Цитокины и воспаление. 2010. Т. 9, № 1. С. 3–12.
- Ярилин А. А., Донецкова А. Д. Естественные регуляторные Т-клетки и фактор FOXP3 // Иммунология. 2006. № 3. С. 176–188.
- Abelson A. K., Delag-Vega A. M., Kozyrev S. V. et al. STAT4 associates with SLE through two independent effects that correlate with gene expression and act additively with IRF5 to increase risk // *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2009. Vol. 68. P. 1746–1753.
- Aerts N. E., Dombrecht E. J., Ebo D. G., Bridts C. H., Stevens W. J., De Clerck L. S. Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis // *Cell Immunol*. 2008. Vol. 251. P. 109–115.
- Azab N. A., Bassyouni I. H., Emad Y., Abd El-Wahab G. A., Hamdy G., Mashahit M. A. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (TREG) in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: the possible influence of treatment with corticosteroids // *Clin. Immunol*. 2008. Vol. 127. P. 151–157.
- Barcellos L., Oksenberg J., Bucher P. et al. Genetic basis for clinical expression in multiple sclerosis // *Brain*. 2002. Vol. 125, N 1. P. 150–158.
- Barreto M., Ferreira R. C., Lourenco L. et al. Low frequency of CD4⁺CD25⁺ Treg in SLE patients: a heritable trait associated with CTLA4 and TGFbeta gene variants // *BMC Immunology*. 2009. 10:5. doi:10.1186/1471-2172-10-5.
- Beissert S., Schwarz A., Schwarz T. Regulatory T cells // *J. Invest. Dermatol*. 2006. Vol. 126. P. 15–24.
- Bettini M., Vignali D. A. A. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity // *Curr. Opin. Immunol*. 2009. Vol. 21, N 6. P. 612–618.
- Bonelli M., Savitskaya A., von Dalwigk K. et al. Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) // *Int. Immunol*. 2008. Vol. 20. P. 861–868. doi:10.1093/intimm/dxn044.
- Bonelli M., Savitskaya A., Steiner C.-W., Rath E., Smolen J. S., Scheinecker C. Phenotypic and functional analysis of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells in patients with systemic lupus erythematosus // *J. Immunol*. 2011. Vol. 182. P. 1689–1695.
- Brusko T. M., Wasserfall C. H., Clare-Salzler M. J., Schatz D. A., Atkinson M. A. Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4⁺CD25⁺ T-cells in type 1 diabetes // *Diabetes*. 2005. Vol. 54. P. 1407–1414.
- Buckner J. H. Mechanisms of impaired regulation by CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells in human autoimmune diseases // *Immunology*. 2010. Vol. 10. P. 849–859.
- Chen Z., Lin F., Gao Y. et al. FoxP3 and ROR γ t: transcriptional regulation of Treg and Th17 // *International Immunopharmacology*. 2011. Vol. 11. P. 536–542.
- Cope A. P. T cells in rheumatoid arthritis // *Arthritis Research & Therapy*. 2008. Vol. 10 (Suppl 1) : S1.
- Crispin J. C., Lioussis S.-N. C., Kis-Toth K. et al. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances // *Trends in Molecular Medicine*. 2010. Vol. 16, N 2. P. 47–57.
- Cvetanovich G. L., Hafler D. A. Human regulatory T cells in autoimmune diseases // *Curr. Opin. Immunol*. 2010. Vol. 22. P. 753–760.
- Danke N. A., Koelle D. M., Yee C., Beheray S., Kwok W. W. Autoreactive T cells in healthy individuals // *J. Immunol*. 2004. Vol. 172. P. 5967–5972.
- Davis P. M., Nadler S. G., Stetsko D. K., Suchard S. J. Abatacept modulates human dendritic cell-stimulated T-cell proliferation and effector function independent of IDO induction // *Clin. Immunol*. 2008. Vol. 126. P. 38–47.
- Delgado S., Sheremata W. A. The role of CD4⁺ T-cells in the development of MS // *Neurological Research*. 2006. Vol. 28, N 3. P. 245–249.
- Dinesh R. K., Skaggs B. J., Cava A. L., Hahn B. H., Singh R. P. CD8⁺ Tregs in lupus, autoimmunity, and beyond // *Autoimmunity Reviews*. 2010. Vol. 9. P. 560–568.
- Ehrenstein M. R., Evans J. G., Singh A. et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy // *J. Exp. Med*. 2004. Vol. 200. P. 277–285.
- Falgarone G., Semerano L., Rulle S., Boisseier M.-C. Targeting Lymphocyte activation to treat rheumatoid arthritis // *Joint Bone Spine*. 2009. Vol. 76. P. 327–332.

- Feger U., Luther C., Poeschel S., Melms A., Tolosa E., Wiendl H. Increased frequency of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients // *Clin. Exp. Immunol.* 2007. Vol. 147. P. 412–418.
- Fehervari Z., Sakaguchi S. CD4⁺ regulatory cells as a potential immunotherapy // *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2005. Vol. 360. P. 1647–1661.
- Fletcher J. M., Lonergan R., Costelloe L. et al. CD39⁺Foxp3⁺ regulatory T cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis // *J. Immunol.* 2009. Vol. 183, N 11. P. 7602–7610.
- Fritzsching B., Haas J., Konig F., Kunz P. et al. Intracerebral human regulatory T cells: analysis of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T cells in brain lesions and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients // *PLoS ONE.* 2011. Vol. 6, N 3. e17988. doi:10.1371/journal.pone.0017988.
- Gateva V., Sandling J. K., Hom G. et al. A large – scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL-10 as risk loci for systemic lupus erythematosus // *Nature Genetics.* 2009. Vol. 50. P. 1228–1233.
- Goronzy J. J., Weyand C. M. T-cell co-stimulatory pathways in autoimmunity // *Arthritis Research & Therapy.* 2008. Vol. 10. (Suppl 1) : S3.
- Gray D. and Gray M. What are regulatory B cells? // *Eur. J. Immunol.* 2010. Vol. 40. P. 2677–2679.
- Haas J., Fritsching B., Trubswetter P. et al. Prevalence of newly generated naïve regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis // *J. Immunol.* 2007. Vol. 179. P. 1322–1330.
- Habibagahi M., Habibagahi Z., Jaberipour M., Aghdashi A. Quantification of regulatory T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus // *Rheumatol Int.* 2010. Vol. 31, N 9. P. 1219–1225.
- Henriques A., Ines L., Couto M. et al. Frequency and functional activity of Th17, Tc17 and other T-cell subsets in Systemic Lupus Erythematosus. // *Cell Immunol.* 2010. Vol. 264. P. 97–103.
- Jäger A., Kuchroo V. K. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation // *Scandinavian Journal of Immunology.* 2010. Vol. 72. P. 173–184.
- Jin Y., Chen X., Podolsky R., Hopkins D., Makala Levi H. C., Muir A., She J.-X. APC dysfunction is correlated with defective suppression of T cell proliferation in human type 1 diabetes // *Clinical Immunology.* 2009. Vol. 130. P. 272–279.
- Kornete M., Piccirillo C. A. Critical co-stimulatory pathways in the stability of Foxp3⁺ Treg cell homeostasis in Type I Diabetes // *Autoimmunity Reviews.* 2011. Vol. 11. P. 104–111.
- Lawson J. M., Tremble J., Dayan C., Beyan H., Leslie R. D. G., Peakman M., Tree T. I. M. Increased resistance to CD4⁺CD25^{hi} regulatory T cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes // *British Society for Immunology. Clin. Exp. Immunol.* 2008. Vol. 154. P. 353–359.
- Lee H. Y., Hong Y. K., Yun H. J., Kim Y. M., Kim J. R., Yoo W. H. Altered frequency and migration capacity of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in systemic lupus erythematosus // *Rheumatology (Oxford).* 2008. Vol. 47. P. 789–794.
- Lin S. C., Chen K. H., Lin C. H., Kuo C. C., Ling Q. D., Chan C. H. The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients // *Eur. J. Clin. Investig.* 2007. Vol. 37. P. 987–996.
- Lindley S., Dayan C. M., Bishop A., Roep B. O., Peakman M., Tree T. I. M. Defective Suppressor Function in CD4⁺CD25⁺ T-Cells From Patients With Type 1 Diabetes // *Diabetes.* 2005. Vol. 54. P. 92–99.
- Liu M. F., Wang C. R., Fung L. L., Lin L. H., Tsai C. N. The presence of cytokine-suppressive CD4⁺CD25⁺ T cells in the peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis // *Scand. J. Immunol.* 2005. Vol. 62. P. 312–317.
- Liu W., Putnam A. L., Xu-Yu Z. et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ Treg cells // *J. Exp. Med.* 2006. Vol. 203, N 7. P. 1701–1711.
- Long S. A., Cerosaletti K., Bollyky P. L. et al. Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects // *Diabetes.* 2010. Vol. 59, N 2. P. 407–415.
- Lubberts E., Koenders M. I., van den Berg W. B. The role of T cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models // *Arthritis Research & Therapy.* 2004. Vol. 7, N 1. P. 29–37.
- Lyssuk E. Y., Torgashina A. V., Soloviev S. K., Nassonov E. L., Bykovskaia S. N. Reduced number and function of CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007. Vol. 601. P. 113–119.
- McMurchy A. N., Bushell A., Levings M. K., Wood K. J. Moving to tolerance: Clinical application of T regulatory cells // *Seminars in Immunology.* 2011. Vol. 23. P. 304–313.
- Mikulkova Z., Praksova P., Stourac P., Bednarik J., Michalek J. Imbalance in T-cell and cytokine profiles in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis // *Journal of the Neurological Sciences.* 2010. Vol. 300. P. 135–141.
- Miossec P. Interleukin-17 in fashion, at last: ten years after its description, its cellular source has been identified // *Arthritis & Rheumatism.* 2007. Vol. 56. P. 2111–2115.
- Miyara M., Wing K., Sakaguchi S. Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FOXP3⁺ regulatory T-cell activation and expansion // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009a. Vol. 123, N 4. P. 749–755.
- Miyara M., Yoshioka Y., Kitoh A. et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor // *Immunity.* 2009. Vol. 30. P. 899–911.
- Moser K. L., Kelly J. A., Lessard C. J., Harley J. B. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus // *Genes Immunity.* 2009. Vol. 10. P. 373–379.

- Mottonen M., Heikkinen J., Mustonen L., Isomaki P., Luukkainen R., Lassila O. CD4⁺CD25⁺ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis // *Clin. Exp. Immunol.* 2005. Vol. 140. P. 360–367.
- Noh G., Lee J. H. Regulatory B cells and allergic diseases // *Allergy Asthma Immunology Research.* 2011. Vol. 3, N 3. P. 168–177.
- Noh J., Choi W. S., Noh G., Lee J. H. Presence of Foxp3-expressing CD19(+)CD5(+) B cells in human peripheral blood mononuclear cells: human CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) regulatory B cell (Breg) // *Immune Network.* 2010. Vol. 10. P. 247–249.
- Notley C. A., McCann F. E., Inglis J. J. and Williams R. O. ANTI-CD3 therapy expands the numbers of CD4⁺ and CD8⁺ treg cells and induces sustained amelioration of collagen-induced arthritis // *Arthritis Rheum.* 2010. Vol. 62. P. 171–178.
- Novak J., Lehen A. Mechanism of regulation of autoimmunity by iNKT cells // *Cytokine.* 2011. Vol. 53. P. 263–270.
- Ohkura N., Hamaguchi M., Sakaguchi S. FOXP3⁺ regulatory T cells: control of FOXP3 expression by pharmacological agents // *Trends in Pharmacological Sciences.* 2011. Vol. 32, N 3. P. 158–166.
- Ouyang W., Kolls J. K., Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation // *Immunity.* 2008. Vol. 28. P. 454–467.
- Pot C., Apetoh L., Kuchroo V. K. Type 1 regulatory T cells (Tr1) in autoimmunity // *Seminars in immunology.* 2011. Vol. 23. P. 202–208.
- Putheti P., Pettersson A., Soderstrom M., Link H., Huang Y. U. Circulating CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells are not altered in multiple sclerosis and unaffected by disease-modulating drugs // *Journal of Clinical Immunology.* 2004. Vol. 24. P. 155–161.
- Rajasalu T., Brosi H., Schuster C. et al. Deficiency in B7-H1 (PD-L1)/PD-1 coinhibition triggers pancreatic β -cell destruction by insulin-specific, murine CD8 T-cells // *Diabetes.* 2010. Vol. 59. P. 1966–1973.
- Roncarolo M.-G., Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans // *immunology.* 2007. Vol. 7. P. 585–598.
- Sakaguchi S., Miyara M., Costantino C. M., Hafler D. A. FoxP3⁺ regulatory T cells in the human immune system // *Nat. Rev. Immunol.* 2010. Vol. 10. P. 490–500.
- Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M. et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases // *J. Immunol.* 1995. Vol. 155. P. 1151–1164.
- Saresella M., Marventano I., Longhi R., Lissoni F. et al. CD4⁺CD25^{bright} FoxP3⁺PD1⁻ regulatory T cells in acute and stable relapsing-remitting multiple sclerosis and their modulation by therapy // *The FASEB Journal.* 2008. Vol. 22. P. 3500–3508.
- Scheinecker C., Bonelli M., Smolen J. S. Pathogenetic aspects of systemic lupus erythematosus with an emphasis on regulatory T cells // *Journal of Autoimmunity.* 2010. Vol. 35. P. 269–275.
- Seddiki N., Santner-Nanan B., Martinson J. et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells // *J. Exp. Med.* 2006. Vol. 203, N 7. P. 1693–1700.
- Shalev I., Schmelzle M., Robson S. C., Levy G. Making sense of regulatory T cell suppressive function // *Seminars in Immunology.* 2011. Vol. 23. P. 282–292.
- Shevach E. M. Mechanisms of Foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression // *Immunity.* 2009. Vol. 30. P. 636–645.
- Showday Venigala R. K., Tretter T., Krienke S. et al. Reduced CD4⁺, CD25⁻ T cell sensitivity to the suppressive function of CD4⁺, CD25^{high}, CD127^{low} regulatory T cells in patients with active systemic lupus erythematosus // *Arthritis Rheum.* 2008. Vol. 58. P. 2120–2130.
- Steward-Tharpa S. M., Songc Y.-J., Siegelc R. M., O'Sheab J. J. New insights into T cell biology and T cell-directed therapy for autoimmunity, inflammation, and immunosuppression // *Ann N. Y. Acad. Sci.* 2010. Vol. 1183. P. 123–148.
- Suen J. L., Li H. T., Jong Y. J., Chiang B. L., Yen J. H. Altered homeostasis of CD4 FoxP3 regulatory T-cell subpopulations in systemic lupus erythematosus // *Immunology.* 2008. Vol. 127. P. 196–205.
- Thornton A. M., Korty P. E., Tran D. Q. et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic derived from peripherally induced FoxP3⁺ T regulatory cells // *J. Immunol.* 2010. Vol. 184. P. 3433–3441.
- Tran D. Q., Andersson J., Hardwick D. et al. Selective expression of latency-associated peptide (LAP) and IL-1 receptor type I/II (CD121a/CD121b) on activated human FOXP3⁺ regulatory T cells allows for their purification from expansion cultures // *Blood.* 2009a. Vol. 113. P. 5125–5133.
- Trevor R. F., Smith and Vipin Kumar. Revival of CD8⁺ Treg-mediated suppression // *Trends in Immunology.* 2008. Vol. 29, N 7. P. 337–342.
- Vargas-Rojas M. I., Crispin J. C., Richaud-Patin Y., Alcocer-Varela J. Quantitative and qualitative normal regulatory T cells are not capable of inducing suppression in SLE patients due to T-cell resistance // *Lupus.* 2008. Vol. 17. P. 289–294. doi:10.1177/0961203307088307.
- Venken K., Hellings N., Thewissen M. et al. Compromised CD4⁺CD25^{high} regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level // *Immunology.* 2007. Vol. 123. P. 79–89.
- Viglietta V., Baecher-Allan C., Weiner H. L., Hafler D. A. Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis // *J. Exp. Med.* 2004. Vol. 7. P. 971–979.
- Wang R. F. CD8⁺ regulatory T cells, their suppressive mechanisms and regulation in cancer // *Hum. Immunol.* 2008. Vol. 69, N 11. P. 811–814.
- Yan B., Ye S., Chen G., Kuang M., Shen N., Chen S. Dysfunctional CD4⁺, CD25⁺ regulatory T cells in untreated active systemic lupus erythematosus secondary to interferon-alpha-producing antigen-presenting cells // *Arthritis Rheum.* 2008. Vol. 58. P. 801–812.

Yanaba K., Bouaziz J. D., Haas K. M., Poe J. C., Fujimoto M., Tedder T. F. A regulatory B cell subset with a unique CD1d^{hi}CD5⁺ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses // *Immunity*. 2008. Vol. 28. P. 639–650.

Yang J., Chu Y., Yang X. et al. Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus // *Arthritis Rheum*. 2009. Vol. 60. P. 1472–1483.

Zhang L., Bertucci A. M., Ramsey-Goldman R. et al. Regulatory T cell (Treg) subsets return in patients with refractory lrus following stem cell transplantation and TGF-beta-producing CD8⁺ Treg cells are associated

with immunological remission of lupus // *J. Immunol*. 2009. Vol. 183. P. 6346–6358.

Zhang B., Zhang X., Tang F., Zhu L., Liu Y. Reduction of forkhead box P3 levels in CD4⁺CD25^{high} T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus // *Clin. Exp. Immunol*. 2008. Vol. 153. P. 182–187.

Zheng J., Liu Y., Qin G., Chan P. L., Mao H., Lam K. T., Lewis D. B., Lau Y. L., Tu W. Efficient induction and expansion of human alloantigen-specific CD8 regulatory T cells from naive precursors by CD40-activated B cells // *J. Immunol*. 2009. Vol. 183. P. 3742–3750.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кравченко Полина Николаевна

аспирантка
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: k-polina13@mail.ru
тел.: (8142) 769810

Олейник Евгения Константиновна

руководитель группы иммунологии, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: ole@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769810

Kravchenko, Polina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: k-polina13@mail.ru
tel.: (8142) 769810

Oleinik, Evgenia

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: ole@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769810

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ У РАСТЕНИЙ

Н. С. Репкина, В. В. Таланова, А. Ф. Титов

Институт биологии Карельского научного центра РАН

В обзоре обобщены литературные данные по влиянию тяжелых металлов на экспрессию регуляторных и структурных генов, связанных с металлоустойчивостью растений. Рассмотрена регуляция синтеза белков, непосредственно участвующих в механизмах адаптации растений к действию тяжелых металлов, на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях. Обсуждаются новейшие данные по сигналингу и экспрессии генов белков-транспортеров, белков и пептидов, участвующих в механизмах детоксикации тяжелых металлов, а также в неспецифических адаптивных реакциях растений.

Ключевые слова: тяжелые металлы, сигналинг, экспрессия генов, механизмы металлоустойчивости.

N. S. Repkina, V. V. Talanova, A. F. Titov. EFFECTS OF HEAVY METALS ON GENE EXPRESSION IN PLANTS

The review summarizes data from the literature on the effect of heavy metals on the expression of regulatory and structural genes related to the metal resistance of plants. We consider the regulation of the synthesis of proteins directly involved in the mechanisms of plant adaptation to heavy metal impact at the transcription and post-transcription levels. Latest data on the gene signaling and expression of transporter proteins, proteins and peptides involved in the mechanisms of heavy metal detoxification, as well as in nonspecific adaptive responses of plants are discussed.

Key words: heavy metals, signaling, gene expression, mechanisms of metal resistance.

Введение

Тяжелые металлы представляют собой группу химических элементов с атомной массой свыше 40 Да, обладающих свойствами металлов [Кузнецов, Дмитриева, 2011]. Растения довольно активно поглощают из почвы ионы некоторых тяжелых металлов (Zn, Ni, Cu и др.), которые в небольших количествах необходимы им для нормальной жизнедеятельности, но становятся токсичными и опасными при значительном повышении их концентрации в почве и в

растении [Алексеева-Попова, 1991; Титов и др., 2007; Pal, Rai, 2010]. Кроме того, наряду с физиологически необходимыми элементами растения также поглощают тяжелые металлы, не участвующие в метаболизме растений (Pb, Cd, Hg, V) и токсичные даже в очень незначительных концентрациях [Алексеева-Попова, 1991]. Поступая в растения и накапливаясь в них, тяжелые металлы оказывают отрицательное влияние на многие молекулярно-генетические (в том числе ингибирование экспрессии большого числа генов), биохимические (нарушение функ-

ционирования ферментов, синтеза белков и др.) и физиологические процессы (фотосинтез, дыхание, водный обмен, минеральное питание и др.), что прямо или опосредованно приводит к торможению или прекращению их роста и развития, а в определенных случаях – и к гибели [Алексеева-Попова, 1991; Титов и др., 2007; Gallego et al., 2012]. Вместе с тем следует учитывать, что растения обладают достаточно широким спектром защитно-приспособительных механизмов, сформировавшихся в процессе длительной эволюции и действующих на разных уровнях организации – от молекулярного до организменного, благодаря которым они способны адаптироваться и выживать в условиях загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами [Титов и др., 2007; Blaby-Hass, Merchant, 2012; Gallego et al., 2012].

Как показывают исследования, в основе механизмов металлоустойчивости растений, так же как и в отношении устойчивости к другим стресс-факторам, во многих случаях лежит индуцированный синтез белков, связанный с экспрессией определенных генов (или групп генов) и синтезом *de novo* стрессовых белков [Vinocur, Altman, 2005]. При этом передача сигнала в растениях о действии стресс-фактора включает в себя на уровне клеток три основных этапа – восприятие (рецепцию) сигнала, передачу (трансдукцию) и усиление сигнала, изменения в экспрессии генов [Лутова и др., 2010] и осуществляется с участием сложной сети сигнальных систем [Bohnert et al., 2006; Fujita et al., 2006; Maksymiec, 2007; DalCorso et al., 2010].

Рецепция и трансдукция сигнала, вызванного действием на растения тяжелых металлов

К настоящему времени установлено, что тяжелые металлы связываются с рецепторами плазмалеммы растений, тем самым генерируя стрессовый сигнал [Thévenod, 2009; DalCorso et al., 2010]. В дальнейшем в передаче сигнала, вызванного действием на растения тяжелых металлов, принимают участие сигнальные молекулы (активные формы кислорода и фитогормоны), система Ca^{2+} -кальмодулин, каскад фосфорилирования митоген-активируемых протеинкиназ (mitogen-activated protein kinase) (МАРК) [DalCorso et al., 2010].

При этом показано, что в реакцию растения на тяжелые металлы могут быть вовлечены различные сигнальные молекулы [Maksymiec, 2007; Mazzucotelli et al., 2008; Thévenod, 2009; Gallego et al., 2012]. Например, одним из ранних ответов растения на воздействие тяжелых металлов яв-

ляется усиление генерации активных форм кислорода (АФК), в первую очередь перекиси водорода, которые могут выступать в качестве ключевых сигнальных молекул и запускать цепочку последующих защитных реакций [Maksymiec, 2007]. Так, увеличение содержания H_2O_2 отмечено при воздействии меди и кадмия на растения *Arabidopsis thaliana* L. [Maksymiec, Krupa, 2006; Gallego et al., 2012]. Перекись водорода активирует специфические MAP-каскады, которые, в свою очередь, регулируют экспрессию генов, участвующих в защитных реакциях растений [Gallego et al., 2012]. Наряду с АФК в передаче сигнала о воздействии на растения тяжелых металлов, в частности кадмия, участвуют фитогормоны – этилен, салициловая и жасмоновая кислоты [DalCorso et al., 2010].

Важную роль в клеточном сигналинге играет также универсальный вторичный мессенджер Ca^{2+} и сигнальная система Ca^{2+} -кальмодулин, которая может активироваться и под влиянием тяжелых металлов [DalCorso et al., 2010]. В частности, в ответ на действие тяжелых металлов происходит резкое повышение концентрации кальция в цитозоле. Ионы кальция связываются с низкомолекулярным регуляторным белком кальмодулином, что позволяет комплексу Ca^{2+} -кальмодулин активировать протеинкиназы, фосфорилирующие белки. Это, в свою очередь, приводит к изменению функциональной активности и к последующей активации экспрессии генов, продукты которых вовлечены в формирование металлоустойчивости. Например, трансгенные растения табака с повышенной экспрессией гена *NtCBP4* (*Nicotiana tabacum calmodulin-binding protein*) характеризуются высокой устойчивостью к никелю [Arazi et al., 1999].

Помимо этого установлено, что в ответ на действие тяжелых металлов может активироваться каскад реакций фосфорилирования митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) [Jonak et al., 2002; Šamajová et al., 2013]. В этом случае происходит последовательное фосфорилирование трех протеинкиназ: МАРККК (МАР-киназа-киназа киназы) передает фосфорный остаток киназе МАРКК (МАР-киназа киназы), которая затем фосфорилирует МАРК (МАР-киназу) [DalCorso et al., 2010; Gallego et al., 2012]. МАР-киназа перемещается в ядро, где активирует другие протеинкиназы и транскрипционные факторы [DalCorso et al., 2010]. Таким образом, МАР-киназный каскад является важным способом трансдукции сигнала о воздействии тяжелых металлов у растений. Показано, что воздействие кадмия приводит к активации генов, кодирующих МАРК у проростков риса [Yeh et al., 2004] и люцерны [Jonak et al., 2004]. Ана-

логичный эффект отмечен у проростков люцерны под влиянием меди [Jonak et al., 2004].

Таким образом, процесс трансдукции сигнала о действии тяжелых металлов на растение по сигнальным путям в конечном итоге обеспечивает регуляцию синтеза транскрипционных факторов, которые, в свою очередь, активируют экспрессию генов, кодирующих белки, участвующие в процессах адаптации растений к тяжелым металлам и их детоксикации.

Экспрессия генов транскрипционных факторов при действии тяжелых металлов на растения

Транскрипционные факторы – это белки, контролирующие процесс синтеза мРНК на матрице ДНК путем связывания со специфическими участками ДНК [Патрушев, 2000], благодаря чему они играют важную роль в инициации программы повышения или снижения уровня транскрипции генов. Характерная особенность факторов транскрипции – наличие в их составе одного или более ДНК-связывающих доменов, которые, в свою очередь, связываются со специфическими участками ДНК, расположенными в регуляторных областях генов [Vaahtera, Brosche, 2011]. В настоящее время выделено и описано несколько сотен транскрипционных факторов у растений арабидопсиса и риса [Weber et al., 2006]. В последние годы появляются сведения о роли транскрипционных факторов в регуляции транскрипции генов, индуцируемых действием тяжелых металлов, однако эти данные неоднозначны, а иногда и противоречивы. Одна из возможных причин сложности изучения роли транскрипционных факторов в защитно-приспособительных реакциях растений на действие тяжелых металлов связана с их включением в сигнальные пути, индуцируемые действием и других абиотических факторов [Singh et al., 2002].

Для ряда транскрипционных факторов показана индукция их экспрессии под влиянием кадмия. Так, например, установлена активация генов, кодирующих семейство транскрипционных факторов AP2/ERF (APETALA2 / ethylene-responsive-element binding factor). Представители этого семейства содержат консервативный ДНК-связывающий домен AP2/EREBP (APETALA2 / ethylene-responsive-element binding factor) [Weber et al., 2006]. К данному семейству относятся DREB (DRE-binding factor) и CBF (CRT/DRE binding factor), способные активировать ряд индуцируемых стрессом генов-мишеней, повышая уровень их транскрипции за счет связывания с DRE/CRT элементом (dehydration-

responsive element / C-repeat), расположенным в промоторном участке. В экспериментах с проростками пшеницы наблюдалось увеличение содержания транскриптов генов *DREB1* и *CBF1* в листьях уже через 15 мин от начала действия сульфата кадмия (100 мкМ), которое сохранялось на повышенном уровне на протяжении 7 сут [Репкина и др., 2012]. Отметим, что в корнях риса гены транскрипционных факторов *OsDREB1A* и *OsDREB1B* активировались через 3 ч от начала действия Cd (10 мкМ) [Ogawa et al., 2009]. В отличие от этого у растений галофита *Limonium bicolor* под влиянием CdCl₂ и CuSO₄ в более высокой концентрации (150 мкМ) происходило снижение содержания транскриптов гена *LbDREB* в листьях и корнях [Van et al., 2011].

Помимо этого установлено, что кадмий, а также цинк повышают экспрессию генов, кодирующих факторы транскрипции семейства MYB (MYeloBlastosis protein) – *MYB4*, *MYB10*, *MYB72* у растений *A. thaliana* [Van de Mortel et al., 2008]. При этом увеличение содержания транскриптов гена *MYB72* под влиянием кадмия и цинка отмечено в листьях, но не в корнях арабидопсиса [Van de Mortel et al., 2008]. При действии кадмия значительно повышалась экспрессия гена *MYB28* у *Thlaspi caerulescens* [Van de Mortel et al., 2008]. Кадмий также усиливал экспрессию генов *MYB43*, *MYB48* и *MYB124* в корнях *A. thaliana*, а медь не вызывала активации их экспрессии [Weber et al., 2006].

Наконец, показано, что под влиянием кадмия и цинка в корнях и листьях *A. thaliana* происходит накопление транскриптов гена *bHLH100*, относящегося к семейству генов, кодирующих транскрипционные факторы bHLH (basic helix-loop-helix) [Van de Mortel et al., 2008]. В отличие от этого у *T. caerulescens* повышение экспрессии данного гена наблюдалось только под влиянием кадмия [Van de Mortel et al., 2008].

Интересно, что кадмий также индуцировал у *T. caerulescens* экспрессию гена транскрипционного фактора *WRKY53*, кодирующего белок, относящийся к семейству транскрипционных факторов WRKY [Wei et al., 2008]. Транскрипционные факторы данного семейства способны связываться с последовательностью W-box в промоторной области многих генов, например, *PR*-генов (pathogen related), кодирующих защитные белки, которые принимают участие в механизмах устойчивости как к биотическим, так и к абиотическим факторам, включая тяжелые металлы [Wei et al., 2008].

Представителями еще одного семейства факторов транскрипции, экспрессия которых также активировалась кадмием, являются *bZIP*

(basic leucine zipper proteins). Этот транскрипционный фактор содержит высококонсервативный bZIP домен, состоящий из основного домена, ответственного за связывание с ДНК-специфической последовательностью, и домена «лейциновая застежка» [Liao et al., 2008]. Транскрипционные факторы bZIP обнаружены у многих видов растений и участвуют в различных физиологических процессах, в том числе в ответных реакциях растений на действие стресс-факторов [Zou et al., 2008]. Отметим, что экспрессия генов факторов транскрипции bZIP повышается уже через 6 часов от начала воздействия $CdCl_2$ в корнях, листьях и стебле трансгенных растений табака, инфицированных *Agrobacterium*, содержащей ген *ThbZIP1*, выделенный из галофита *Tamarix hispida* [Wang et al., 2010].

Как отмечалось выше, транскрипционные факторы способны активировать экспрессию структурных генов. Так, при действии тяжелых металлов происходит активация экспрессии генов, кодирующих белки, участвующие как во внутриклеточном, так и в дальнем транспорте тяжелых металлов по растению. Наряду с этим активизируются процессы образования хелатных комплексов. В основе этих процессов также лежит активация экспрессии генов, продукты которых участвуют в детоксикации тяжелых металлов.

Однако следует указать, что в настоящее время исследования, посвященные сигналингу, вызванному действием тяжелых металлов, пока еще единичны и поэтому представления о путях передачи стрессорного сигнала и особенностях их функционирования в условиях действия того или иного тяжелого металла довольно фрагментарны.

Влияние тяжелых металлов на экспрессию генов белков-транспортеров у растений

ZIP семейство белков-транспортеров. Транспортные белки ZIP семейства (Zinc related transporter / Iron related transporter – like Protein) локализованы на плазмалемме. Они были обнаружены у большинства видов растений, а также у бактерий, грибов и животных [Colangelo, Guerinot, 2006]. Механизм действия белков данного семейства полностью не изучен, однако недавними исследованиями было показано, что транспорт ионов с помощью ZIP транспортеров осуществляется пассивно по концентрационному градиенту [Lin et al., 2010], в частности, они участвуют в переносе двухвалентных катионов через плазмалемму. У *A. thaliana* выделено несколько генов, кодирующих ZIP транспортеры, – *AtZIP1–AtZIP5*,

AtZIP9–AtZIP12 и *AtIRT3*. Установлено, что содержание транскриптов этих генов у *A. thaliana* возрастает при недостатке Zn [Hanikenne, Nouet, 2011], тогда как у гипераккумуляторов *Arabidopsis halleri* и *T. caerulea* экспрессия генов *ZIP4*, *ZIP10*, *IRT3* по мере поступления цинка в растения снижается [Krämer et al., 2007]. Накопление мРНК *ZIP1* и *ZIP3* происходит преимущественно в корнях *A. thaliana* и активируется при низких концентрациях Zn [Grotz, Guerinot, 2006], в то время как ген *AtZIP4* экспрессируется как в корнях, так и в побегах арабидопсиса, что позволяет предполагать участие продуктов генов семейства ZIP в поглощении и транспорте Zn [Cohen et al., 1998]. В клетках *Clamydomonas* при недостатке цинка активизировалась экспрессия гена *IRT1*, а накопление транскриптов гена *IRT2* отмечено при дефиците меди [Blaby-Naas, Mercham, 2012]. В корнях арабидопсиса ген *IRT1* экспрессировался также при недостатке железа, что может свидетельствовать об участии ZIP белков-транспортеров в поглощении из почвы Fe^{2+} [Verret et al., 2004].

Для многих белков-транспортеров характерна низкая избирательность по отношению к ионам металлов, поэтому они могут принимать участие в поглощении и транспорте разных двухвалентных катионов. Например, в корнях арабидопсиса и гороха при дефиците железа экспрессия гена *IRT1* и соответственно синтез транспортных белков IRT1 способствует поглощению катионов кадмия и цинка [Cohen et al., 1998]. У арабидопсиса экспрессия гена *AtIRT1* активировалась при воздействии никеля, что говорит о возможном участии транспортера IRT1 в аккумуляции и транспорте этого металла [Zhao, Eide, 1996]. У *T. caerulea* экспрессия гена *ZTP1* транспортера цинка способствует поглощению никеля [Assunção et al., 2001].

Кроме того, предполагается возможность участия ряда ZIP транспортеров (*ZIP6*, *ZIP4*, *IRT*) в загрузке тяжелых металлов в ксилему и в дальнем транспорте по растению [Krämer et al., 2007].

NRAMP семейство белков-транспортеров. Белки транспортеры NRAMP (natural resistance associated macrophage protein) обнаружены у всех живых организмов. Белки этого семейства локализованы на тонопласте и плазмалемме и переносят двухвалентные катионы [Krämer et al., 2007]. Предполагается, что основная функция белков NRAMP заключается в транспорте ионов железа из вакуоли в цитозоль и поддержании их гомеостаза у арабидопсиса [Thomine et al., 2000]. Кроме того, транспортеры NRAMP3 и NRAMP4 участвуют в переносе кадмия из вакуоли в цито-

золь [Verbruggen et al., 2009]. Показано, что у *A. halleri* и *T. caerulescens* ген *NRAMP3* экспрессировался преимущественно в корнях, но у *A. halleri* экспрессия данного гена наблюдалась и в побегах. Кроме того, в корнях *T. caerulescens* экспрессировались гены *NRAMP1* и *NRAMP5* [Becher et al., 2004; Talke et al., 2006; Van de Mortel et al., 2006]. Установлено, что у трансгенных растений арабидопсиса сверхэкспрессия гена *AtNRAMP1* увеличивает устойчивость к высоким концентрациям железа [Curie et al., 2000].

CTR семейство белков-транспортеров.

Представители CTR (The Copper Transporter Family) семейства белков-транспортеров впервые были обнаружены у дрожжей и млекопитающих, а затем и у растений. Показано, что у *A. thaliana* экспрессия гена *COPT1*, кодирующего белок COPT, локализованный на плазмалемме, играет ключевую роль в поглощении меди [Sancenón et al., 2004].

CDF семейство белков-транспортеров.

Белки-транспортеры семейства CDF (CATION DIFFUSION FACILITATOR) имеют также второе название MTP (Metal Tolerance Protein). Представители данного семейства способны переносить ионы двухвалентных металлов, таких как Zn, Cd, Co, Ni и Mn, из цитозоля: или в вакуоль через тонопласт, или из клетки через плазмалемму [Blaudez et al., 2003; DalCorso et al., 2010]. Экспрессия гена *AhMTP1* у растений *A. halleri* повышалась в присутствии цинка преимущественно в листьях [Krämer et al., 2007]. Даже незначительное увеличение экспрессии гена *AhMTP1* у *A. thaliana* способствовало возрастанию устойчивости растений к повышенным концентрациям цинка [Krämer et al., 2007]. Однако ген *MTP8* не экспрессировался у гипераккумуляторов *A. halleri* и *T. caerulescens* под влиянием цинка, но повышение содержания его транскриптов у *A. halleri* происходило в корнях в присутствии кадмия и меди, а также в побегах при действии меди [Talke et al., 2006; Becher et al., 2004]. Эти данные свидетельствуют об участии транспортера MTP8 в гомеостазе нескольких тяжелых металлов.

Семейство белков-транспортеров АТФаз Р1В-типа.

Белки-транспортеры АТФаз Р1В-типа принадлежат к суперсемейству АТ-Фаз Р-типа. Представители данного семейства способны переносить катионы металлов через биологические мембраны из цитоплазмы в вакуоль или апопласт против электрохимического градиента за счет энергии гидролиза АТФ [Colangelo, Guerinot, 2006]. 8 АТФаз Р1В-типа у *A. thaliana* и *Oryza sativa* были переименованы в НМА (heavy-metal ATPases). Белки-транспортеры НМА подразделяются на два класса.

Представители первого участвуют в транспорте одновалентных ионов (Cu^+/Ag), в то время как белки второго – способны транспортировать двухвалентные ионы ($\text{Zn}/\text{Co}/\text{Cd}/\text{Pb}$) [Verret et al., 2004; Gallego et al., 2012]. Например, при действии высоких концентраций Zn и Cd повышалась экспрессия гена *AtHMA4* у арабидопсиса и *T. caerulescens* [Verret et al., 2004], а также трех генов НМAs (*OsHMA5*, *OsHMA6*, *OsHMA9*) у риса [Verkleij et al., 2009]. НМА белки отличаются большей селективностью, чем белки-транспортеры других классов. В частности, белки HMA2, HMA3 и HMA4 способны транспортировать только катионы Zn и Cd [Krämer et al., 2007]. При этом HMA3 переносит Zn и Cd из цитоплазмы в вакуоль через тонопласт, а локализованные в плазмалемме HMA2 и HMA4 участвуют в загрузке этих металлов в ксилему и транспорте из корней в побег растения [Vong, Cobett, 2009; Rascio, Navarilizzo, 2011]. Отметим, что ген риса *OsHMA9* может участвовать в транспорте не только цинка и кадмия, но и свинца [Verkleij et al., 2009].

Семейство белков-транспортеров АТФаз V-типа.

Белки АТФаз V-типа способны обеспечивать работу $\text{Cd}^{2+} / \text{H}^+$ -антипортера. В недавних исследованиях было показано, что кадмий и медь способствуют активации экспрессии генов, кодирующих АТФазы V-типа в корнях растения ячменя и огурца соответственно [Kabała et al., 2010; Казнина и др., 2013]. В частности, у проростков ячменя под влиянием кадмия наблюдалось усиление экспрессии генов двух субъединиц вакуолярной H^+ -АТФазы *HvVHA c* и *HvVHA E*, что свидетельствует об их участии в механизмах металлоустойчивости [Казнина и др., 2013].

ABC семейство белков-транспортеров.

Белки-транспортеры ABC (ATP-binding cassette) обнаружены у разных видов растений, в том числе у арабидопсиса и риса [Uraguchi, Fujiwara, 2012]. Известно, что белки ABC-типа принимают участие в транспорте ионов металлов в форме хелатов в вакуоль через тонопласт [Krämer et al., 2007]. В данном семействе выделяют подсемейство MRP (multidrug resistance associated proteins), характерное для млекопитающих, однако гены, кодирующие MRP белки, обнаружены и у растений, в частности арабидопсиса и риса [Klein et al., 2006]. Увеличение содержания транскриптов гена *AtPDR8*, кодирующего белок *AtPDR8* ABC-типа, локализованный в плазмалемме арабидопсиса, происходило в присутствии кадмия и свинца, а трансгенные растения со сверхэкспрессией гена *AtPDR8* и повышенной металлоустойчивостью не аккумулировали ионы этих металлов. Это

можно рассматривать как свидетельство участия белков-транспортёров AtPDR8 ABC-семейства в выведении ионов металлов из клетки через плазмалемму [Kim et al., 2007].

FRD семейство белков-транспортёров.

Белки-транспортёры AtFRD3 (Ferric Reductase Defective) вовлечены в гомеостаз ионов Fe. Показано, что экспрессия гена, кодирующего белок-транспортёр FRD3, участвующий в загрузке ионов металлов в ксилему и их дальнейшем транспорте, возрастает в корнях гипераккумуляторов *A. halleri* и *T. caerulescens* [Krämer et al., 2007]. Кроме того, отмечено, что уровень транскриптов гена *FRD3* также возрастает в листьях *A. halleri* в отличие от *A. thaliana* [Becher et al., 2004; Talke et al., 2006]. Ген *AtFRD3*, кодирующий белок FRD3, экспрессируется в клетках перицикла корня, поэтому предполагается, что данный белок необходим для дальнего транспорта железа, поскольку участвует в загрузке ионов металлов в ксилему [Green et al., 2004]. Отметим, что участие белка FRD3 в гомеостазе железа и в его транспорте по ксилеме в присутствии цинка у гипераккумуляторов *A. halleri* и *T. caerulescens* значительно, чем у не гипераккумулятора *A. thaliana*. Повышенная экспрессия гена *AtFRD3* у гипераккумуляторов может быть связана с их высокой способностью к образованию хелатных комплексов в ксилеме. Кроме того, присутствие цинка может косвенно свидетельствовать о том, что белок FRD3 способен транспортировать ионы не только железа, но и других металлов, в частности цинка [Lasat et al., 1998].

OPT семейство белков-транспортёров.

Суперсемейство OPT (The Oligopeptide Transporters Family) включает подсемейство YSL (Yellow Stripe-Like), характерное для растений. Показано, что белки-транспортёры YSL способны транспортировать ионы таких металлов, как Fe, Zn, Cu, Ni, и в меньшей степени Mn и Cd в комплексе с никотианаминном через плазмалемму [Schaaf et al., 2004; Krämer et al., 2007]. У *A. thaliana* было выделено 8 YSL белков-транспортёров [Colangelo, Guerinot, 2006]. Показано, что ген *AtYSL1* экспрессируется в листьях и пыльце арабидопсиса [Le Jean et al., 2005; Krämer et al., 2007], а ген *AtYSL2* – в тканях ксилемы и флоэмы побега и корня. Белки AtYSL2 регулируют транспорт железа, меди [DiDonato et al., 2004] и цинка [Schaaf et al., 2004], при этом транспортируют ионы железа и меди в виде комплексов с никотианаминном [DiDonato et al., 2004].

В целом белки-транспортёры играют важную роль в поглощении ионов металлов и их транс-

порте как внутри клетки, так и по растению. Однако наряду с необходимыми для нормальной жизнедеятельности растений металлами растения способны поглощать и ионы токсичных тяжелых металлов. В этом случае запускаются внутриклеточные механизмы детоксикации, к которым прежде всего относится хелатирование металлов (образование хелатных комплексов за счет связывания ионов металлов с различными лигандами). В частности, активное участие в механизмах детоксикации принимают такие низкомолекулярные белки, как металлотионеины [Rauser, 1999].

Влияние тяжелых металлов на экспрессию генов металлотионеинов у растений

Металлотионеины (МТ) относятся к семейству низкомолекулярных металлсвязывающих белков с высоким содержанием цистеина [Robinson et al., 1993; Capdevila et al., 2012]. Они обнаружены у животных, растений и грибов [Kumar et al., 2012; Ryvolova et al., 2012]. На основании распределения цистеиновых остатков и количества ароматических аминокислот металлотионеины у растений подразделяются на 4 типа (МТ 1–4) [Kumar et al., 2012].

Несмотря на то что экспрессия металлотионеинов у растений происходит в различных органах (корнях, стебле, листьях, цветках, плодах и семенах) [Guo et al., 2003], она носит тканеспецифичный характер. В частности, было показано, что гены *MT1a* и *MT2b* экспрессируются во флоэме, тогда как большее содержание транскриптов генов *MT2a* и *MT3* обнаруживалось в клетках мезофилла под влиянием меди у трансгенных растений арабидопсиса [Guo et al., 2003, 2008; Kohler et al., 2004].

Известно, что у животных металлотионеины участвуют в детоксикации таких металлов, как свинец, кадмий, ртуть, и метаболизме металлов, необходимых для физиологических процессов (медь и цинк) [Capdevila et al., 2012], однако у растений их роль полностью не ясна [Foley et al., 1997; Gallego et al., 2012]. Так, при исследовании древесных растений *Avicennia marina* и *Bruguiera gymnorhiza* отмечено усиление экспрессии генов, кодирующих металлотионеины 2-го типа при действии кадмия, цинка, меди и свинца [Huang, Wang, 2010; Huang et al., 2011]. В частности, CdCl₂ (2–40 мкМ) активировал транскрипцию гена *BgMT2* в листьях проростков *B. gymnorhiza* при всех изученных концентрациях [Huang et al., 2011]. В то же время экспрессия гена *AmMT2* в листьях *A. marina* под влиянием ZnSO₄ (80–1200 мкМ), CuSO₄ (50–750 мкМ) и Pb(NO₃)₂ (5–100 мкМ) зависела от концентрации металла и продолжительности его действия.

Например, содержание транскриптов гена *AmMT2* увеличивалось при более высоких концентрациях металлов [Huang, Wang, 2010]. Более того, сверхэкспрессия генов *BgMT2* и *AmMT2* растений (*B. gymnorrhiza* и *A. marina*) в трансгенной *E. coli* способствовала повышению ее устойчивости к Zn, Cd, Cu и Pb. Полученные данные рассматриваются как свидетельство возможного участия генов *BgMT2* и *AmMT2* в механизмах металлоустойчивости растений. Отметим, что под влиянием цинка происходит индукция экспрессии гена *MT1* в листьях тополя, тогда как повышения экспрессии гена *MT2* не обнаружено [Castiglione et al., 2007].

Вместе с тем необходимо отметить, что уровень экспрессии генов металлотионеинов не всегда зависит от концентрации тяжелых металлов в корнеобитаемой среде и продолжительности их действия на растения. Так, если у *Helianthus tuberosus* выявлена зависимость между концентрацией Cu в стебле и уровнем экспрессии *MT2* гена, то для цинка такой зависимости не обнаружено. В листьях тополя (*Populus alba*) также не выявлена зависимость между содержанием транскриптов гена *PaMT* и концентрацией цинка, а также продолжительностью его действия [Castiglione et al., 2007].

Как указывалось выше, роль металлотионеинов в детоксикации тяжелых металлов все еще изучена недостаточно. Однако имеются сведения о том, что экспрессия гена *MT2 Brassica juncea* в трансгенных растениях арабидопсиса вызывала повышение их устойчивости к кадмию и меди [Zhigang et al., 2006]. Предполагается, что металлотионеины могут также принимать участие не только в процессах детоксикации, но и в других защитных механизмах, например антиоксидантных [Kotrba et al., 2009].

Влияние тяжелых металлов на экспрессию генов фитохелатинсинтазы у растений

Фитохелатины, относящиеся к металлсвязывающим пептидам, впервые были выделены из клеточной суспензии *Rauvolfia serpentina* [Grill et al., 1987]. В настоящее время первичная структура фитохелатинов изучена для многих видов растений, относящихся к разным семействам, и некоторых грибов [Cobbett, 2000; Серегин, 2001; Ogawa et al., 2009; Pal, Rai, 2010]. Они представляют собой небольшие богатые цистеином пептиды с основной структурой $(\gamma\text{-Глу-Цис})_n\text{-Гли}$, где $n = 2\text{--}11$ (обычно не более 6) [Grill et al., 1987; Rauser, 1995; Cobbett, 2000; Серегин, 2001; Pal, Rai, 2010].

Наличие тиоловых (SH) групп позволяет фитохелатинам связываться с ионами тяжелых ме-

таллов и образовывать в цитозоле хелатные комплексы с молекулярным весом 2,5–3,6 кДа [Cobbett, 2000; Серегин, 2001; Gallego et al., 2012]. Образовавшиеся низкомолекулярные комплексы затем транспортируются в вакуоль с помощью Cd/H⁺-антипортеров [Salt, Wagner, 1993] и АТФ-зависимых ABC-транспортеров тонопласта [Salt, Rauser, 1995], включая HMT1-транспортер, обнаруженный у дрожжей [Prévéral et al., 2009]. При этом фитохелатины участвуют не только в механизмах детоксикации тяжелых металлов [Clemens et al., 1999; Серегин, 2001; Gallego et al., 2012], но и в гомеостазе металлов, необходимых для нормального протекания физиологических процессов, например Zn и Cu [Thumann et al., 1991].

Синтез фитохелатинов индуцируется многими тяжелыми металлами, в том числе Cu, Zn, Ag, Au, Hg и Pb, но в наибольшей степени Cd [Rauser, 1995; Cobbett, 2000; Pal, Rai, 2010].

Фитохелатины, в отличие от металлотионеинов, не являются первичными генными продуктами, а синтезируются из глутатиона при участии фермента фитохелатинсинтазы (γ -глутамилцистеинтранспептидазы) [Robinson et al., 1993; Rauser, 1995; Clemens et al., 1999; Cobbett, 2000; Серегин, 2001; Capdevila et al., 2012]. В частности, в экспериментах с проростками гороха [Klarheck et al., 1995] и другими видами растений под влиянием кадмия отмечено уменьшение пула глутатиона одновременно с накоплением фитохелатинов [Rauser, 1995; Cobbett, 2000; Gallego, 2012].

Регуляция синтеза фитохелатинов осуществляется на уровне экспрессии генов, кодирующих фитохелатинсинтазу, а также генов, кодирующих ферменты синтеза глутатиона. Впервые ген *CAD1*, кодирующий фитохелатинсинтазу, был выделен у *cad1*-мутантов арабидопсиса, способных синтезировать нормальное количество глутатиона, но низкое – фитохелатинов [Ha et al., 1999]. В последние годы активно исследуется экспрессия генов *PCS*, кодирующих фитохелатинсинтазу у разных видов растений, в том числе арабидопсиса, риса, пшеницы, горчицы [DalCorso et al., 2010]. Показано, например, что экспрессия генов *AtPCS1* и *TaPCS1*, кодирующих фитохелатинсинтазу у арабидопсиса и пшеницы соответственно, активировала синтез фитохелатинов у дрожжей и способствовала повышению их устойчивости к кадмию [Vatamaniuk et al., 1999; Clemens et al., 1999]. У *Avicennia germinans* экспрессия гена *AgPCS* активировалась под влиянием не только кадмия, но и меди [Gonzalez-Mendoza et al., 2007].

Уровень экспрессии гена *SmPCS* у гипераккумулятора свинца *Salvinia minima* при дейст-

вии Pb возрастал в листьях, в то время как в корнях, напротив, снижался. Возможно, этот факт объясняется тем, что активация синтеза фитохелатинов в корнях регулируется только на посттранскрипционном уровне [Estrella-Gomez et al., 2009].

Согласно последним данным, в регуляции активности фитохелатинсинтазы и синтеза фитохелатинов может принимать участие фермент протеинфосфатаза 1 [Lima et al., 2012]. Например, в опытах с клеточной суспензией арабидопсиса при использовании специфического ингибитора протеинфосфатазы 1 – кантаридина показано, что уже через 30 мин от начала воздействия кадмия (100 мкМ) происходит снижение активности протеинфосфатазы 1, что способствует фосфорилированию фитохелатинсинтазы и последующему синтезу фитохелатинов. Отмеченное ингибирование активности протеинфосфатазы 1 индуцировало повышение синтеза фитохелатинов в основном за счет влияния на активность фитохелатинсинтазы, что свидетельствует о возможности регуляции их синтеза на посттранскрипционном уровне [Lima et al., 2012].

Несмотря на то что роль фитохелатинов в механизмах детоксикации тяжелых металлов очевидна, участие фитохелатинсинтазы и самих фитохелатинов в механизмах устойчивости к тяжелым металлам изучено недостаточно полно. Например, известно, что сверхэкспрессия гена *AtPCS1* и повышенный уровень фитохелатинов у трансгенных растений арабидопсиса может повышать аккумуляцию кадмия без увеличения устойчивости растений, более того, даже приводит к их гиперчувствительности к кадмию [Lee et al., 2003; Pomroni et al., 2006]. Существует предположение, что наряду со способностью образовывать хелатные комплексы с металлами фитохелатины принимают участие в антиоксидантных механизмах защиты, однако прямые экспериментальные данные, подтверждающие это, к настоящему моменту отсутствуют [Pal, Rai, 2010].

Интересно отметить, что экспрессия гена пшеницы *TaPCS1* приводила к снижению чувствительности мутантов *cad1-3* растений арабидопсиса к кадмию и, кроме того, способствовала дальнему транспорту кадмия, что, в свою очередь, приводило к снижению его накопления в корнях [Gong et al., 2003]. В экспериментах с мутантами *A. thaliana cad2-1* со сниженным синтезом глутатиона и *cad3-1*, неспособными синтезировать фитохелатины, было показано, что оба мутанта обладают высокой степенью аккумуляции мышьяка в по-

бегах растений. Поэтому можно предположить, что синтез фитохелатинов в корнях является одним из наиболее вероятных механизмов, предотвращающих накопление мышьяка в побегах и зерне растений [Liu et al., 2010; Duan et al., 2011].

Влияние тяжелых металлов на экспрессию генов, контролирующих синтез ферментов метаболизма глутатиона у растений

Глутатион представляет собой трипептид, состоящий из остатков трех аминокислот: цистеина, глицина и глутамина (γ -глутамилцистеинилглицин) [Серегин, 2001; Estrella-Gomez et al., 2012; Gallego et al., 2012; Anjum et al., 2012]. Глутатион содержит тиоловые группы, посредством которых он способен связываться с ионами металлов и металлоидов [Серегин, 2001; Anjum et al., 2012]. Глутатион обнаружен у всех организмов, включая растения.

Синтез глутатиона осуществляется в два этапа. Первый этап включает образование γ -глутамилцистеина из глутамата и цистеина. Данный этап катализируется ферментом γ -глутамилцистеинсинтетазой. Второй этап заключается в конъюгации γ -глутамилцистеина с глицином и катализируется ферментом глутатионсинтетазой [Серегин, 2001; Estrella-Gomez et al., 2012].

Установлено, что экспрессия генов, кодирующих ферменты, участвующие в биосинтезе глутатиона, способствует повышению металлоустойчивости растений. Например, мутанты арабидопсиса *cad2-1* с модифицированным бактериальным геном *S1pt::ECS*, кодирующим γ -глутамилцистеинсинтетазу в побегах растения, отличались повышенной устойчивостью к As, Hg и Cd по сравнению с нетрансгенными мутантными растениями *cad2-1* с заблокированным синтезом γ -глутамилцистеинсинтазы и чувствительными к действию тяжелых металлов [Li et al., 2006]. Кроме того, показано, что кадмий индуцировал экспрессию генов *gshI* и *gshII* (кодирующих глутатионсинтетазу) в листьях *A. thaliana* [Zhu et al., 1999], а сверхэкспрессия гена *gshII* *E. coli* в цитозоле трансгенных растений *B. juncea* способствовала повышению устойчивости этого вида к кадмию. Отмечается, что трансгенные растения *B. juncea* способны накапливать кадмий в значительно большей степени, чем растения дикого типа [Zhu et al., 1999].

Установлено, что не только кадмий, но и свинец способствует повышению экспрессии гена *SmGS*, активации глутатионсинтазы и аккумуляции глутатиона как в листьях, так и в

корнях растения гипераккумулятора *Salvinia minima*, при этом экспрессия гена *SmGS* в листьях была выше, чем в корнях [Estrella-Gomez et al., 2012].

Отмечено также, что содержание глутатиона зависит от концентрации металла в питательной среде, варьируя у разных видов растений. Например, было показано, что содержание глутатиона увеличивается с повышением концентрации кадмия у *Pisum sativum* [Gupta et al., 2002], *Sedum alfredii* [Sun et al., 2007], кукурузы [Rüegsegger and Brunold, 1992], а также в культуре клеток томата и табака [Estrella-Gomez et al., 2012].

Наряду с ферментами биосинтеза глутатиона важным ферментом его метаболизма является глутатион-S-трансфераза, катализирующая конъюгацию глутатиона с алифатическими, ароматическими, эпоксидными и гетероциклическими радикалами различных ксенобиотиков, действующих на растения. Наличие глутатион-S-трансферазы характерно для всех живых организмов, включая растения [Estrella-Gomez et al., 2012; Anjum et al., 2012]. Суперсемейство глутатион-S-трансферазы подразделяется на 7 классов (F, U, L, Z, T, DHAR, TCHQD), из которых характерными для растений являются F и U классы. В настоящее время физиологическая роль и участие фермента в защитных реакциях растений изучена недостаточно [Moons, 2003; Dixon et al., 2010; Anjum et al., 2012]. Известно, что у арабидопсиса семейство генов *gst* кодирует глутатион-S-трансферазу U класса, представителями данного семейства у риса являются гены *osgtu3* и *osgtu4*. Показано, что цинк (30 мкМ) и кадмий (20 мкМ) индуцируют экспрессию *osgtu3* и *osgtu4* генов в корнях проростков риса уже через 2 часа от начала их действия [Moons, 2003].

Другим глутатионзависимым ферментом является метилтрансфераза, катализирующая обратимые реакции переноса метильных групп. Так, например, селеноцистеинметилтрансфераза способствует метилированию селеноцистеина с последующим образованием метилселеноцистеина [LeDuc et al., 2004]. Прямых доказательств участия метилтрансферазы в защитных механизмах растений на действие тяжелых металлов к настоящему моменту нет. Однако показано, что сверхэкспрессия генов *SMTAt* и *SMTBj*, выделенных из гипераккумулятора селена *Astragalus bisulcatus*, способствовала повышению устойчивости к селену у *A. thaliana* и *Indian mustard* [Zhu et al., 2009]. Кроме того, трансгенные растения отличались большей способностью аккумулировать селен, чем растения дикого типа [LeDuc et al., 2004].

Влияние тяжелых металлов на экспрессию генов, участвующих в неспецифических адаптивных реакциях растений

Наряду с активацией генов и синтеза белков, участвующих непосредственно в передаче стресс-сигнала, транспорте ионов и механизмах детоксикации, тяжелые металлы оказывают влияние и на экспрессию генов, и, соответственно, на синтез белков, участвующих в неспецифических механизмах адаптации к действию различных стресс-факторов.

В частности, тяжелые металлы и металлоиды способны активировать экспрессию генов семейства *Hsp* белков теплового шока (БТШ), являющихся важными компонентами клеточного ответа практически на любое стрессовое воздействие [Gupta et al., 2010]. Например, у проростков томата при воздействии мышьяка происходило увеличение содержания транскриптов гена *Hsp90-1* в корнях, а под влиянием хрома – преимущественно в побегах [Goupil et al., 2009]. Воздействие кадмия на растения риса также способствовало активации экспрессии генов БТШ [Ogawa et al., 2009].

Кроме того, показано, что у растений *Lupinus luteus* при действии свинца, кадмия, а также мышьяка происходит активация экспрессии гена *LIPR10*, относящегося к семейству генов *PR* (pathogenesis-related protein) [Jomová et al., 2011]. Как известно, экспрессия генов *PR* семейства активируется при биотическом стрессе, но их активацию наблюдали и под влиянием тяжелых металлов, и при других абиотических стрессах, поэтому предполагается их участие в защитных реакциях растений на действие широкого спектра стресс-факторов [Edreva, 2005].

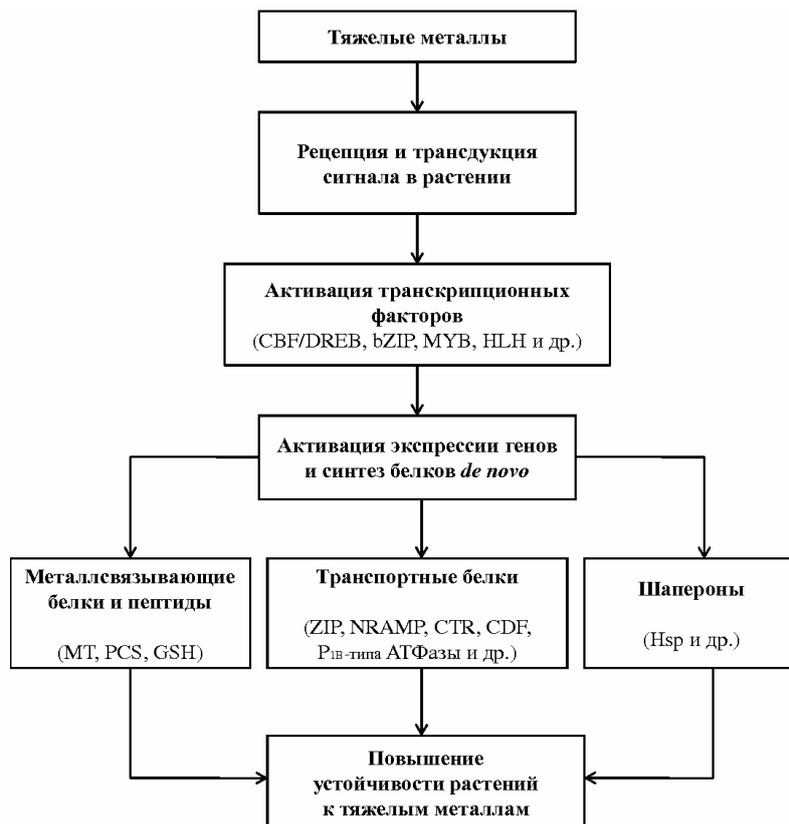
В настоящее время наряду с данными об экспрессии разных групп генов в условиях действия на растения тяжелых металлов появляются сведения о влиянии их на экспрессию микроРНК. МикроРНК – это короткие молекулы РНК, не кодирующие белки, которые связываются с комплементарными участками мРНК, тем самым инактивируют и помечают ее для последующей деградации рибонуклеазой [Huang et al., 2009]. МикроРНК обнаружены как у животных, так и у растений. В частности, микроРНК выделены и охарактеризованы у *A. thaliana* и риса [Sunkar, Zhu, 2004]. Показано, что микроРНК могут активироваться в ответ на действие различных абиотических факторов [Fujii et al., 2005; Sunkar, Zhu, 2004; Zhao et al., 2007; Jones-Rhoades, Bartel, 2004]. Например, кадмий способствовал как активации, так и ингибированию разных видов микроРНК у риса [Huang et al., 2009].

Заключение

Несмотря на продолжительный период изучения, вопросы устойчивости и адаптации растений к действию неблагоприятных факторов среды по-прежнему находятся в центре внимания физиологов многих стран. В последние годы благодаря развитию и широкому применению молекулярно-генетических методов особенно активно исследуются механизмы ответных реакций растений, в том числе и на действие тяжелых металлов, на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях. Так, за последние десятилетия были выделены и охарактеризованы многие семейства генов, активация экспрессии которых способствует повышению металлоустойчивости у разных видов растений (рис.). В частности, выявлены неизвестные ранее белки-транспортеры тяжелых металлов и кодирующие их гены. Получены новые данные об экспрессии большого числа ге-

нов, продукты которых участвуют в хелатировании тяжелых металлов. Появились сведения об активации генов, кодирующих компоненты цепи передачи стресс-сигнала, и сигнальных молекулах, которые также принимают участие в данном процессе. Кроме того, открыты и охарактеризованы регуляторные элементы транскрипции, включая микроРНК, способные регулировать экспрессию генов, в том числе и при действии на растения тяжелых металлов. Несомненно, результаты исследований экспрессии генов существенно расширяют и углубляют существующие представления о том, какие конкретно гены и как именно участвуют в защитно-приспособительных реакциях растений на действие тяжелых металлов.

Необходимо, однако, отметить, что, несмотря на очевидный прогресс и значительные успехи в этой области, имеющиеся экспериментальные данные нередко носят противоречивый характер и трудно сопоставимы между



Общая схема сигналинга, активации экспрессии генов и синтеза белков *de novo*, обеспечивающих металлоустойчивость растений [по: Vinocur, Altman, 2005; Fujita et al., 2006; DalCorso et al., 2010].

Сокращения: CBF/DREB – C-repeat-binding factors/dehydration-responsive element-binding factors; bZIP – белки «лейциновая застежка»; MYB – MYeloBlastosis protein; HLH – helix-loop-helix proteins; MT – металлотионеины; PCS – фитохелатинсинтаза; GSH – глутатион; ZIP – Zinc related transporter / Iron related transporter-like Protein; NRAMP – natural resistance associated macrophage protein; CTR – The Copper Transporter Family; CDF – cation diffusion facilitator; АТФазы P1B-типа – белки-транспортеры АТФаз P-типа; Hsp – белки теплового шока.

собой в силу того, что исследования ведутся на разных объектах, при этом используются разные тяжелые металлы, в разных концентрациях, неодинаковые экспозиции и т. д. Тем не менее сегодня вполне очевиден круг вопросов, поиски ответов на которые должны рассматриваться в качестве задач для проведения дальнейших исследований. К ним, на наш взгляд, в первую очередь следует отнести: а) изучение роли сигнальных молекул, вовлеченных в регуляцию экспрессии генов при действии тяжелых металлов; б) оценку соотносительного вклада разных генов и сигнальных систем в процессы адаптации к тяжелым металлам; в) оценку степени специфичности адаптивных реакций на действие тяжелых металлов; г) выяснение существования линейной или иной зависимости между содержанием транскриптов определенных генов и продолжительностью действия тяжелых металлов, а также между характером изменения экспрессии генов и концентрацией металлов; д) оценку возможности прямого (непосредственного) влияния тяжелых металлов на активность тех или иных генов.

Ответы на эти и некоторые другие вопросы помогут не только существенно углубить и детализировать существующие представления о природе металлоустойчивости растений, но и окажутся важным вкладом в общую теорию устойчивости растений к действию неблагоприятных факторов внешней среды.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение № 14.132.21.1321.

Литература

- Алексеева-Попова Н. В. Устойчивость к тяжелым металлам дикорастущих видов. Л.: Ботанический институт им. Комарова, 1991. 214 с.
- Казнина Н. М., Титов А. Ф., Топчиева Л. В., Лайдинен Г. Ф., Батова Ю. В. Экспрессия генов вакуолярной H⁺-АТФазы в корнях проростков ячменя разного возраста при действии кадмия // Физиология растений. 2013. Т. 60, № 1. С. 61–65.
- Кузнецов Вл. В., Дмитриева Г. А. Физиология растений: Учебник. М.: Абрис, 2011. 783 с.
- Лутова Л. А., Ежова Т. А., Додуева И. Е., Осипова М. А. Генетика развития растений: для биологических специальностей университетов. СПб.: Изд-во Н-Л, 2010. 432 с.
- Патрушев Л. И. Экспрессия генов. М.: Наука, 2000. 830 с.
- Репкина Н. С., Таланова В. В., Топчиева Л. В., Батова Ю. В., Титов А. Ф. Влияние кадмия на экспрессию генов транскрипционных факторов CBF1 и DREB1 в листьях проростков пшеницы // Труды КарНЦ РАН. 2012. № 2. С. 113–118.
- Серегин И. В. Фитохелатины и их роль в детоксикации кадмия у высших растений // Успехи биол. химии. 2001. С. 283–300.
- Титов А. Ф., Таланова В. В., Казнина Н. М., Лайдинен Г. Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2007. 170 с.
- Anjum N. A., Ahmad I., Mohmood I., Pacheco M., Duate A. C., Pereira E., Umar S., Ahmad A., Khan N. A., Iqbal M., Prasad M. N. V. Modulation of glutathione and its related enzymes in plants responses to toxic metal and metalloids – A review // Environ. Exp. Bot. 2012. Vol. 75. P. 307–324.
- Arazi T., Sunkar R., Kaplan B., Fromm H. A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants // Plant J. 1999. Vol. 20, N 2. P. 171–182.
- Assunção A. G. L., Da Costa Martins P., De Folter S., Vooijs R., Schat H., Aarts M. G. M. Elevated expression of metal transporter genes in tree accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* // Plant, Cell Environ. 2001. Vol. 24. P. 217–226.
- Ban Q., Liu G., Wang Y. A DREB gene from *Limonium bicolor* mediates molecular and physiological responses to copper stress in transgenic tobacco // J. Plant Physiol. 2011. Vol. 168. P. 449–458.
- Becher M., Talke I. N., Krall L., Krämer U. Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* // Plant J. 2004. Vol. 37. P. 251–268.
- Blaby-Haas C. E., Merchant S. S. The ins and outs of algal metal transport // Biochim. Biophys. Acta. 2012. Vol. 1823. P. 1531–1552.
- Blaudez D., Kohler A., Martin F., Sanders D., Chalot M. Poplar metal tolerance protein 1 confers zinc tolerance and is an oligomeric vacuolar zinc transporter with an essential leucine zipper motif // Plant Cell. 2003. Vol. 15. P. 2911–2928.
- Bohnert H. J., Gong Q., Li P., Ma S. Unraveling biotic stress tolerance mechanisms – getting genomics going // Curr. Opin. Plant Biol. 2006. Vol. 9. P. 180–188.
- Capdevila M., Bofill R., Palacios O., Atrian S. State-of-art of metallothioneins at the beginning of the 21st century // Coordin. Chem. Rev. 2012. Vol. 256. P. 46–62.
- Castiglione S., Franchin C., Fossati T., Lingua G., Torrigiani P., Biondi S. High zinc concentrations reduce rooting capacity and alter metallothionein gene expression in white poplar (*Populus alba* L. cv. Villafranca) // Chemosphere. 2007. Vol. 67. P. 1117–1126.
- Clemens S., Kim E. J., Neumann D., Schroeder J. I. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast // EMBO Journal. 1999. Vol. 18. P. 3325–3333.
- Cobbett C. S. Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification // Plant Physiol. 2000. Vol. 123. P. 825–832.
- Cohen C. K., Fox T. C., Garvin D. F., Kochian L. V. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants // Plant Physiol. 1998. Vol. 116. P. 1063–1072.

- Colangelo E. P., Guerinot M. L. Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2006. Vol. 9. P. 322–330.
- Curie C., Alonso J. M., Le Jean M., Ecker J. R., Briat J.-F. Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport // *Biochem J.* 2000. Vol. 347. P. 749–755.
- DalCorso G., Farinati S., Furini A. Regulatory networks of cadmium stress plants // *Plant Signal. Behav.* 2010. Vol. 5, N 6. P. 663–667.
- DiDonato R. J., Jr., Roberts L. A., Sanderson T., Easley R. B., Walker E. L. *Arabidopsis* Yellow Strip-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes // *Plant J.* 2004. Vol. 39. P. 403–414.
- Dixon D. P., Skipsey M., Edwards R. Role for glutathione transferases in plant secondary metabolism // *Phytochemistry.* 2010. Vol. 71. P. 338–350.
- Duan G.-L., Hu Y., Liu W.-J., Kneer R., Zhao F.-J., Zhu Y.-G. Evidence for a role of phytochelatin in regulating arsenic accumulation in rice grain // *Environ. Exp. Bot.* 2011. Vol. 71. P. 416–421.
- Edreva A. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years // *Gen. Appl. Plant Physiol.* 2005. Vol. 31. P. 105–124.
- Estrella-Gomez N. E., Sauri-Duch E., Zapata-Perez O., Santamaria J. M. Glutathione plays a role in protecting leaves of *Sedum minima* from Pb²⁺ damage associated with changes in the expression of SmGS genes and increased activity of GS // *Environ. Exp. Bot.* 2012. Vol. 75. P. 188–194.
- Estrella-Gomez N., Mendoza-Gozatl D., Moreno-Sanchez R., Gonzalez-Mendoza D., Zapata-Perez O., Martinez-Hernandez A., Santamaria J. M. The Pb-hyperaccumulator aquatic fern *Salvinia minima* Baker, responds to Pb²⁺ by increasing phytochelatin synthesis via changes in SmPCS expression and in phytochelatin synthase activity // *Aquatic Toxicol.* 2009. Vol. 91. P. 320–328.
- Foley R. C., Liang Z. M., Sing K. B. Analysis of type 1 metallothionein cDNAs in *Vicia faba* // *Plant Mol. Biol.* 1997. Vol. 33. P. 583–591.
- Fujii H., Choi T.-J., Lin S.-I., Aung K., Zhu J.-K. A miRNA involved in phosphate-starvation responses in *Arabidopsis* // *Curr. Biol.* 2005. Vol. 15. P. 2038–2043.
- Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusaka Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2006. Vol. 9. P. 436–442.
- Gallego S. M., Pena L. B., Barcia R. A., Azpilicueta C. E., Iannone M. F., Rosales E. P., Zawoznik M. S., Groppa M. D., Benavides M. P. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms // *Environ. Exp. Bot.* 2012. Vol. 83. P. 33–46.
- Gong J.-M., Lee D. A., Schroeder J. I. Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatin and cadmium in *Arabidopsis* // *PNAS.* 2003. Vol. 100. P. 10118–10123.
- Gonzalez-Mendoza D., Moreno A. Q., Zapata-Perez O. Coordinated responses of phytochelatin synthase and metallothionein gene in black mangrove, *Avicennia germinans*, exposed to cadmium and copper // *Aquatic Toxicol.* 2007. Vol. 83. P. 306–314.
- Goupil P., Souguir D., Ferjani E., Faure O., Hitmi A., Ledoigt G. Expression of stress-related genes in tomato plants exposed to arsenic and chromium in nutrient solution // *J. Plant Physiol.* 2009. Vol. 166. P. 1446–1452.
- Green L. S., Rogers E. E. FRD3 controls iron localization in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2004. Vol. 136. P. 2523–2531.
- Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M.H. Phytochelatin, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1987. Vol. 84. P. 439–443.
- Grotz N., Guerinot M. L. Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. Vol. 1763. P. 595–608.
- Guo W.-J., Bundithya W., Goldsbrough P. B. Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper // *New Phytol.* 2003. Vol. 159. P. 369–381.
- Gupta D. K., Huang H. G., Yang X. E., Razafindrabe B. H. N., Inouhe M. The detoxification of lead in *Sedum alfredii* H. is not related to phytochelatin but the glutathione // *J. Hazard. Mater.* 2010. Vol. 177. P. 437–444.
- Gupta S. C., Tohoyama H., Joho M., Inouhe M. Possible role of phytochelatin and glutathione metabolism in cadmium tolerance in chickpea roots // *J. Plant Res.* 2002. Vol. 115, N 6. P. 429–437.
- Ha S.-B., Smith A. P., Howden R., Dietrich W. M., Bugg S., O'Connell M. J., Goldsbrough P. B., Cobbett C. S. Phytochelatin synthase gene from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe* // *Plant Cell.* 1999. Vol. 11. P. 1153–1163.
- Hanikenne M., Nouet C. Metal hyperaccumulation and hypertolerance: a model for plant evolutionary genomics // *Curr. Opin. in Plant Biol.* 2011. Vol. 14. P. 252–259.
- Huang G.-Y., Wang Y.-S. Expression and characterization analysis of type 2 metallothionein from grey mangrove species (*Avicennia marina*) in response to metal stress // *Aquatic Toxicol.* 2010. Vol. 99. P. 86–92.
- Huang G.-Y., Wang Y.-S., Ying G.-G. Cadmium-inducible BgMT2, a type 2 metallothionein gene from mangrove species (*Bruguiera gymnorrhiza*), its encoding protein shows metal-binding ability // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2011. Vol. 405. P. 128–132.
- Huang S. Q., Peng J., Qiu C. X., Yang Z. M. Heavy metal-regulated new microRNAs from rice // *J. Inorgan. Biochem.* 2009. Vol. 103. P. 282–287.
- Jomová K., Feszterova M., Morevic M. Expression of pathogenesis-related genes and changes of superoxide dismutase activity induced by toxic elements in *Lupinus luteus* L. // *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 2011/12. Vol. 1, N 3. P. 437–445.
- Jonak C., Nakagami H., Hirt H. Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium // *Plant Physiol.* 2004. Vol. 136. P. 3276–3283.
- Jonak C., Okresz L., Bogre L., Hirt H. Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2002. Vol. 5. P. 415–424.

- Jones-Rhoades M., Bartel D. P. Computation identification of plant microRNAs and targets, including a stress-induced miRNA // *Mol. Cell*. 2004. Vol. 14. P. 787–799.
- Kabala K., Janicka-Russak M., Klobus G. Different responses of tonoplast proton pumps in cucumber roots to cadmium and copper // *J. Plant Physiol*. 2010. Vol. 167. P. 1328–1335.
- Kim D.-Y., Bovey L., Maeshima M., Martinoia E., Lee Y. The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance // *Plant J*. 2007. Vol. 50. P. 207–218.
- Klapheck S., Schlunz S., Bergmann L. Synthesis of phytochelatins and homo-phytochelatins in *Pisum sativum* L. // *Plant Physiol*. 1995. Vol. 107. P. 515–521.
- Klein M., Burla B., Martinoia E. The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants // *FEBS Letters*. 2006. Vol. 580. P. 1112–1122.
- Kohler A., Blaudez D., Chalot M., Martin F. Cloning and expression of multiple metallothioneins from hybrid poplar // *Plant Physiol*. 2004. Vol. 164. P. 83–93.
- Kotrba P., Najmanova J., Macek T., Ruml T., Mackova M. Genetically modified plants in phytoremediation of heavy metal and metalloids soil and sediment pollution // *Biotecol. Advances*. 2009. Vol. 27. P. 799–810.
- Krämer U., Talke I. N., Hanikenne M. Transition metal transport // *FEBS Letters*. 2007. Vol. 581. P. 2263–2272.
- Kumar G., Kushwaha H. R., Panjabi-Sabharwal V., Kumari S., Joshi R., Karan R., Mittal S., Pareek S. L. S., Pareek A. Clustered metallothionein genes are co-regulated in rice and ectopic expression of OsMT1e-P confers multiple abiotic stress tolerance in tobacco via ROS scavenging // *BMC Plant Biol*. 2012. Vol. 12. P. 1–17.
- Lasat M. M., Baker A. J. M., Kochian L. V. Altered Zn compartmentation in the root symplast and stimulated Zn absorption into leaf as mechanisms involved in Zn hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens* // *Plant Physiol*. 1998. Vol. 118. P. 875–883.
- Le Jean M., Schikova A., Mari S., Briat J.-B., Curie C. A loss-of-function mutation in AtYSL1 reveals its role in iron and nicotianamine seed loading // *Plant J*. 2005. Vol. 44. P. 769–782.
- LeDuc D. L., Tarun A. S., Montes-Bayon M., Meija J., Malit M. F., Wu C. P., Abdel Samie M., Chiang C.-Y., Tagmount A., deSouza M., Neuhierl B., Bock A., Caruso J., Terry N. Overexpression of selenocysteine methyltransferase in *Arabidopsis* and *Indian mustard* increases selenium tolerance and accumulation // *Plant Physiol*. 2004. Vol. 135. P. 377–383.
- Lee S., Moon J. S., Ko T.-S., Petros D., Goldsbrough P. B., Korban S. S. Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress // *Plant Physiol*. 2003. Vol. 131. P. 656–663.
- Li Y., Danker O. P., Carreira L., Smoth A. P., Meagher R. B. The shoot-specific expression of γ -glutamylcysteine synthetase directs the long-distance transport of thiol-peptides to roots conferring tolerance to mercury and arsenic // *Plant Physiol*. 2006. Vol. 141. P. 288–298.
- Liao Y., Zou H.-F., Wei W., Hao Y.-J., Tian A.-G., Huang J., Liu Y.-F., Zhang J.-S., Chen S.-Y. Soybean *GmbZIP44*, *GmbZIP62* and *GmbZIP78* genes function as negative regulator of ABA signaling and confer salt and freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis* // *Planta*. 2008. Vol. 228. P. 225–240.
- Lima A. I. G., Silva E. D. C., Figueire E. M. P. A. Cd-induced signaling pathways in plants: Possible regulation of PC synthase by protein phosphatase 1 // *Environ. Exp. Bot*. 2012. Vol. 79. P. 31–36.
- Lin W., Chai J., Love J., Fu D. Selective electrodiffusion of zinc ions in a Zrt-, Irt-like protein, ZIPB // *J. Biol. Chem*. 2010. Vol. 285. P. 39013–39020.
- Liu W.-J., Wood B. A., Raad A., McGrath S. P., Zhao F.-J., Feldmann J. Complexation of arsenite with phytochelatins reduces arsenite efflux and translocation from roots to shoots in *Arabidopsis* // *Plant Physiol*. 2010. Vol. 152. P. 2211–2221.
- Maksymiec W. Signaling responses in plants to heavy metal stress // *Acta Physiol. Plant*. 2007. Vol. 29. P. 177–187.
- Maksymiec W., Krupa Z. The effect of short-term exposition to Cd excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana* // *Environ. Exp. Bot*. 2006. Vol. 118. P. 187–194.
- Mazzucotelli E., Mastrangelo A. M., Crosatti C., Guerra D., Stanca A. M., Cattivelli L. Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translation regulations control transcription // *Plant Sci*. 2008. Vol. 174. P. 420–431.
- Moons A. *Osgtu3* and *osgtu4*, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal- and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots // *FEBS Letters*. 2003. Vol. 553. P. 427–432.
- Ogawa I., Nakanishi H., Mori S., Nishizawa N. K. Time course analysis of gene regulation under cadmium stress in rice // *Plant Soil*. 2009. Vol. 325. P. 97–108.
- Pal R., Rai J. P. N. Phytochelatins: Peptides involved in heavy metal detoxification // *Appl. Biochem. Biotechnol*. 2010. Vol. 160. P. 945–963.
- Pomponi M., Censi V., Di Girolamo V., De Paolis A., di Toppi L. S., Aromolo R., Costantino P., Cardarelli M. Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase in tobacco plants enhances Cd²⁺ tolerance and accumulation but not translocation to the shoot // *Planta*. 2006. Vol. 223. P. 180–190.
- Prévéral S., Gayet L., Moldes C., Hoffmann J., Mounicou S., Gruet A., Reynaud F., Lobinski R., Verbavatz J.-M., Vavasseur A., Forestier C. A common highly conserved cadmium detoxification mechanism from Bacteria to humans // *J. Biol. Chem*. 2009. Vol. 284, N 8. P. 4936–4943.
- Rascio N., Navari-Izzo F. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? // *Plant Sci*. 2011. Vol. 180, N 2. H. 169–181.
- Rausser W. E. Phytochelatins and related peptides // *Plant Physiol*. 1995. Vol. 109. P. 1141–1149.
- Rausser W. E. Structure and function of metal chelators produced by plants // *Cell Biochem. Biophys*. 1999. Vol. 31. P. 19–48.

- Robinson N. J., Tommey A. M., Kuske C., Jackson P. J. Plant metallothioneins // *Biochem. J.* 1993. Vol. 295. P. 1–10.
- Rüegsegger A., Brunold C. Effect of cadmium on γ -glutamylcysteine synthesis in maize seedlings // *Plant Physiol.* 1992. Vol. 99. P. 428–433.
- Ryvolova M., Adam V., Kizek R. Analysis of metallothionein by capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A.* 2012. Vol. 1226. P. 31–42.
- Salt D. E., Wagner G. J. Cadmium transport across tonoplast of vesicles from Oat roots // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268, N 17. P. 12297–12302.
- Salt D., Rauser W. E. mgATP-dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of Oat roots // *Plant Physiol.* 1995. Vol. 107. P. 1293–1301.
- Šamajová O., Plihl O., Al-Yousif M., Hirt H., Šamaj J. Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases // *Biotechnol. Adv.* 2013. Vol. 31. P. 118–128.
- Sancenón V., Puig S., Mateu-Andres I., Dorcey E., Thiele D. J., Penarrubia L. The Arabidopsis copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 15348–15355.
- Schaaf G., Ludewig U., Erenoglu B. E., Mori S., Kitahara T., von Wirén N. ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore and nicotianamine-chelated metals // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, N 10. P. 9091–9096.
- Singh K. B., Foley R. C., Onate-Sánchez L. Transcription factors in plant defense and stress responses // *Curr. Opin. in Plant Biol.* 2002. Vol. 5. P. 430–436.
- Sun Q., Ye Z. H., Wang X. R., Wong M. H. Cadmium hyperaccumulation leads to an increase of glutathione rather than phytochelatin in the cadmium hyperaccumulator *Sedum alfredii* // *J. Plant Physiol.* 2007. Vol. 164. P. 1489–1498.
- Sunkar R., Zhu J.-K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis // *Plant Cell.* 2004. Vol. 16. P. 2001–2019.
- Talke I. N., Hanikenne M., Krämer U. Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation? And higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* // *Plant Physiol.* 2006. Vol. 142. P. 148–167.
- Thévenod F. Cadmium and cellular signaling cascades: To be or not to be? // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009. Vol. 238. P. 221–239.
- Thomine S., Wang R., Ward J. M., Crawford N. M., Schroeder J. I. Cadmium and iron transport by membranes of plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes // *PNAS.* 2000. Vol. 97, N 9. P. 4991–4996.
- Thumann J., Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M. H. Reactivation of metal-requiring apoenzymes by phytochelatin-metal complexes // *FEBS.* 1991. Vol. 284, N 1. P. 66–69.
- Uraguchi S., Fujiwara T. Cadmium transport and tolerance in rice: perspectives for reducing grain cadmium accumulation // *Rice.* 2012. 5:5.
- Vaahtera L., Brosche M. More than the sum of its parts – How to achieve a specific transcriptional responses to abiotic stress // *Plant Sci.* 2011. Vol. 180. P. 421–430.
- Van de Mortel J. E., Schat H., Moerland P. D., Ver Loren-VAN Themaat E., Van Der Ent S., Blankestijn H., Ghandilyan A., Tsiatsiani S., Aarts M. G. M. Expression differences for genes involved in lignin, glutathione and sulphate metabolism in response to cadmium in *Arabidopsis thaliana* and the related Zn/Cd-hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* // *Plant, Cell Environ.* 2008. Vol. 31. P. 301–324.
- Vatamaniuk O. K., Mari S., Lu Y.-P., Rea P. A. AtPCS1, a phytochelatin synthase from Arabidopsis: Isolation and *in vitro* reconstruction // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. Vol. 96. P. 7110–7115.
- Verbruggen N., Hermans C., Schat H. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2009. Vol. 12. P. 364–372.
- Verkleij J. A. C., Golan-Goldhirsh A., Antosiewicz D. M., Schwitzguébel J.-P., Schröder P. Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper parts // *Environ. Exp. Bot.* 2009. Vol. 67. P. 10–22.
- Verret F., Gravot A., Auroy P., Leonhardt N., David P., Nussaume L., Vavasseur A., Richaud P. Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance // *FEBS Letters.* 2004. Vol. 576. P. 306–312.
- Vinocur B., Altman A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2005. Vol. 16, N 2. P. 123–132.
- Wang Y., Gao C., Liang Y., Wang C., Yang C., Liu G. A novel bZIP gene from *Tamarix hispida* mediates physiological responses to salt stress in tobacco plants // *J. Plant Physiol.* 2010. Vol. 167. P. 222–230.
- Weber M., Trampczynska A., Clemens S. Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in *Arabidopsis thaliana* and the Cd²⁺-hypertolerant facultative metallophyte *Arabidopsis halleri* // *Plant Cell Environ.* 2006. Vol. 29. P. 950–963.
- Wei W., Zhang Y., Han L., Guan Z., Chai T. A novel WRKY transcriptional factor from *Thlaspi caerulescens* negatively regulates the osmotic stress tolerance of transgenic tobacco // *Plant Cell Rep.* 2008. Vol. 27. P. 795–803.
- Wong C. K. E., Cobbett C. S. HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana* // *New Phytol.* 2009. Vol. 181, N 1. H. 71–78.
- Yeh C.-M., Hsiao L.-J., Huang H.-J. Cadmium activates a mitogen-activated protein kinase gene and MBP kinases in rice // *Plant Cell Physiol.* 2004. Vol. 45. P. 1306–1312.
- Zhao B., Liang R., Ge L., Li W., Xiao H., Lin H., Ruan K., Jin Y. Identification of drought-induced microRNAs in rice // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. Vol. 354. P. 585–590.
- Zhao H., Eide D. The yeast ZRT1 encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. Vol. 93. P. 2454–2458.

Zhigang A., Cuijie L., Yuangang Z., Yejie D., Wachter A., Gromes R., Rausch T. Expression of BjMT2, a metallothionein 2 from *Brassica juncea*, increases copper and cadmium tolerance in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana*, but inhibits root elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings // J. Exp. Bot. 2006. Vol. 57. P. 3575–3582.

Zhu Y. L., Pilon-Smits E. A. H., Jouanin L., Terry N. Overexpression of glutathione synthetase in indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance // Plant Physiol. 1999. Vol. 119. P. 73–79.

Zhu Y. L., Pilon-Smits E. A. H., Zhao F.-J., Williams P. N., Meharg A. A. Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation // Trends Plant Sci. 2009. Vol. 14, N 8. P. 436–442.

Zou M., Guan Y., Ren H., Zhang F., Chen F. A bZIP transcription factor, OsABI5, is involved in rice fertility and stress tolerance // Plant Mol. Biol. 2008. Vol. 66. P. 675–683.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Репкина Наталья Сергеевна

аспирантка
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: nrt9@ya.ru
тел.: (8142) 762712

Таланова Вера Викторовна

ведущий научный сотрудник, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: talanova@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 762712

Титов Александр Федорович

председатель КарНЦ РАН, чл.-корр. РАН, д. б. н., проф.
руководитель лаб. экологической физиологии растений
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: titov@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769710

Repkina, Natalia

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: nrt9@ya.ru
tel.: (8142) 762712

Talanova, Vera

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: talanova@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 762712

Titov, Alexandr

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: titov@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769710

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 575.113+597.113:597

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИТЕЛЛОГЕНИНА В КРОВИ МЕЛКОЧЕШУЙНОЙ КРАСНОПЕРКИ-УГАЙ *TRIBOLODON BRANDTII*

**А. М. Андреева¹, Р. А. Федоров¹, И. П. Рябцева¹, Н. Е. Ламаш^{2,3},
А. Э. Филиппова¹**

¹ Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН, Борок

² Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток

³ Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

В сыворотке крови преднерестовых самок мелкочешуйной красноперки-угай из Японского моря идентифицировали белок вителлогенин с помощью методов протеомики – 2D-SDS-электрофореза и последующей масс-спектрометрии MALDI в тандемном режиме. Поиск гомологов в базе данных NCBI по спектрам фрагментации анализируемого белка позволил идентифицировать вителлогенин красноперки-угай с высоким критерием достоверности. Результаты работы показали возможность успешной идентификации вителлогенина по его С-концевому фрагменту, не входящему в состав консервативных мотивов. Полученные результаты предполагают использование методов протеомики для мониторинга состояния водоемов.

Ключевые слова: мелкочешуйная красноперка-угай; кровь; вителлогенин; электрофорез; масс-спектрометрия.

**A. M. Andreeva, R. A. Fyodorov, I. P. Ryabtseva, N. E. Lamash,
A. E. Philippova. IDENTIFICATION OF VITELLOGENIN IN THE BLOOD
SERUM OF THE PACIFIC REDFIN *TRIBOLODON BRANDTII***

We identified the protein vitellogenin in the blood serum of the pre-spawning females of *Tribolodon brandtii* from the Sea of Japan using proteomic methods – 2d-SDS-electrophoresis and MALDI mass spectrometry in the tandem mode. The search for homologues in the DB NCBI by the spectra of fragmentation of the analyzed protein made it possible to identify the vitellogenin of *Tribolodon brandtii* with the high «score» criterion. The results showed vitellogenin can be successfully identified by its C-terminal region, which is not part of conservative motifs. The results suggest proteomic methods can be used to monitor waterbodies.

Key words: *Tribolodon brandtii*; blood; vitellogenin; electrophoresis; mass spectrometry.

Введение

Вителлогенин входит в состав семейства белков, транспортирующих липиды и содержащих в структуре консервативный домен «lipid transport domain»; структурную формулу этого димерного белка можно представить как $Vg = \text{lipid} ([Lv-Pv])_2$, где Vg – белок вителлогенин, Lv – белок липовителлин, Pv – белок фосвитин [Anderson et al., 1998; Babin et al., 1999; Wang et al., 2000]. Белок синтезируется в печени, после чего поступает в кровь в виде Ca-фосфолипопротеина. Известно, что он отсутствует в крови самцов и имеется в незначительных количествах в крови самок; после эстрадиоловой индукции появляется у самцов и резко нарастает в крови у самок [Нейфах, Тимофеева, 1978]. Данным обстоятельством обусловлен интерес к вителлогенину как к индикатору загрязнений водоемов, так как некоторые сбрасываемые в водоемы соединения имитируют действие эстрогенов и приводят к феминизации популяций рыб, например, эндокринные дизрупторы (EDs) с эстрогенными свойствами [Sonnenschein, Soto, 1998].

Наиболее доступными методами идентификации вителлогенина рыб являются иммунологические методы, основанные на специфическом взаимодействии антител и антигенов, – иммуноблоттинг, иммуноферментные методы. Однако такой подход чаще всего выявляет не один, а несколько белков – претендентов на роль вителлогенина, часть которых связывает антитела специфично, а часть – неспецифически. Проблема заключается в сложности оценки специфичности такого связывания и трактовки полученных результатов не только в случае вителлогенина [Johanning, Specker, 1995; Matsubara et al., 1995, 1999; Finn et al., 2000; Shved et al., 2010], но и других белков [Mohida et al., 1994; Bengtén et al., 2002; Vesely et al., 2006; Liu et al., 2007; Ганжа, 2011].

В сыворотке крови самок рыб с гонадами 4-й стадии зрелости вителлогенин обнаруживается в составе так называемой «половой фракции», локализованной на диск-электрофореграмме между гамма-2- и альфа-2-глобулинами: часть белков этой фракции расположена между гамма-2- и гамма-1-глобулинами, другая часть – между гамма-1- и альфа-2-глобулинами [Andreeva, 2001]. Ввиду множественности «половой фракции» мы предлагаем использовать для идентификации вителлогенина методы протеомики – 2D-SDS-электрофорез с последующей масс-спектрометрией MALDI и поиском гомологов в базе данных NCBI. Поскольку аминокислотная последовательность вителлогенина содержит консервативные мо-

тивы, такой подход дает шанс успешной идентификации белка с использованием баз данных, интегрирующих информацию о величинах молекулярных масс продуктов трипсинолиза вителлогенинов у видов (позвоночных, в их числе и рыб) с расшифрованным геномом. Надежная идентификация вителлогенина в крови рыб дает возможность адекватной оценки состояния водной экосистемы в отношении загрязняющих ее соединений с эстрогенными свойствами.

Целью данной работы является идентификация белка вителлогенина в сыворотке крови самок мелкочешуйной красноперки-угай с помощью масс-спектрометрии MALDI.

Материалы и методы

Объекты исследования. В качестве объекта исследования использовали самок мелкочешуйной красноперки-угай *Tribolodon brandtii*, отловленных в период апреля-мая в Японском море, залив Восток. В работе использовали сыворотку крови самок с гонадами 4-й стадии зрелости. Отбор крови проводили по протоколу [Андреева и др., 2007].

Методы исследования. Применяли фракционирование белков сыворотки крови в ПААГ и масс-спектрометрию MALDI (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация). Масс-спектрометрию выполняли специалисты ИБМХ РАН. Белки сыворотки крови разделяли в двумерном SDS-электрофорезе [Laemmli, 1970]. Низкий уровень «шумов» продуктов трипсинолиза белков из биологических жидкостей рыб на масс-спектрах позволил в первом направлении электрофореза использовать диск-электрофорез вместо изофокусирования [Andreeva, 2012]. В первом направлении проводили диск-электрофорез в 9%-м ПААГ; в лунку геля вносили 2 мкл сыворотки, содержащей 0,1–0,2 мг белка, в 4 мкл 40%-й сахарозы. Презэлектрофорез проводили в режиме 2,5 мА, основной электрофорез – 3,0 мА на лунку, при напряжении около 160 В и 300 В соответственно. Далее вырезали полоску геля с анализируемыми белками сыворотки и вымачивали ее в течение 15 минут в денатурирующей смеси, содержащей 0,0625 М трис-HCl (pH 6,8), 2%-й SDS, 10%-ю сахарозу и 5%-й β-МЭ. По истечении времени полоску переносили на блок SDS-геля, заливали концентрирующим гелем и полимеризовали. Каждый образец дублировали внесением в лунку 40 мкл обработанной денатурирующей смесью биологической жидкости, содержащей около 26 мкг белка. Презэлектрофорез проводили в режиме 50 мА, основной электро-

форез – 60 мА на камеру, при напряжении около 80 и 100 В соответственно. После электрофореза гели фиксировали 70%-м изопропанолом и окрашивали Coomassie R-250. Из геля вырезали окрашенные красителем участки, содержащие белки, для последующего их трипсинолиза.

Продукты трипсинолиза анализировали с помощью масс-спектрометрии. Масс-спектры m/z получали на тандемном MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенный УФ-лазером (Nd) в режиме положительных ионов в линейной моде, с использованием рефлектрона и в тандемном режиме [Гуфман и др., 2006]. Масс-спектры обрабатывали с помощью программного пакета FlexAnalysis 2.4 (Bruker Daltonics, Германия). При помощи программы Mascot (опция «пептидный фингер-принт», www.matrixscience.com) проводили поиск гомологов в базе данных NCBI среди белков всех организмов. Кандидатные белки, имеющие параметр достоверности score >83 в базе данных NCBI, считали определенными надежно ($p < 0,05$). Спектры фрагментации m/z отдельных пептидов получали в тандемном режиме, с использованием программного обеспечения Biotoools 3.0 (Bruker Daltonics, Германия) проводили поиск по m/z .

Результаты и обсуждение

В диск-электрофорезе сыворотки крови самок рыб выявлена множественная «половая фракция» (рис. 1: а).

Для масс-спектрометрии с дорожки «половой фракции» на 2D-SDS-геле были отобраны несколько субъединиц, в их числе субъединица с ММ около 26 кДа (рис. 1: б). На примере данной субъединицы рассмотрим принцип идентификации белка вителлогенина. Для идентификации белка получили масс-спектры продуктов его трипсинолиза (рис. 2). Далее проводили поиск гомологов в NCBI. Проведенный по масс-спектрам m/z поиск не дал приемлемых результатов. Для субъединицы с ММ 26 кДа кандидатные последовательности были представлены в основном библиотеками кДНК, сконструированными на основе популяций мРНК трески *Gadus morhua* (score 80), черного толстоголова *Pimephales promelas* (score 79) и других рыб (Mascot EST vertebrates).

Далее поиск гомологов был продолжен по m/z пептидной карты белка. Для фрагмента с молекулярной массой 974,4966 Da обнаружено 50 кандидатных белков, из которых 23 – вителлогенины рыб с критерием достоверности score выше 117: 1) vitellogenin precursor [*Pimephales*

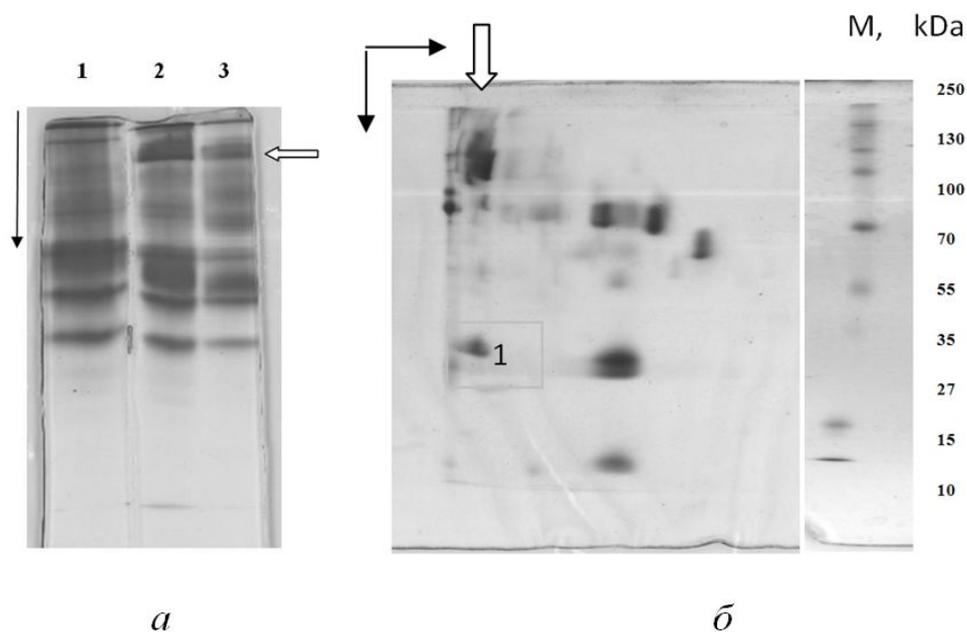


Рис. 1. Фракционирование белков сыворотки крови красноперки-угай в диск- (а) и SDS-электрофорезе (б)

а – сыворотка крови самцов (1) и самок (2, 3); вертикальная стрелка указывает направление электрофореза, горизонтальная светлая стрелка указывает на локализацию «половой фракции» в крови самок; б – электрофореграмма белков сыворотки самки красноперки-угай; горизонтальная стрелка указывает направление диск-, вертикальная – SDS-электрофореза, светлая стрелка указывает «дорожку» «половой фракции», цифра 1 обозначает локализацию субъединицы с молекулярной массой около 26 кДа; М – маркер молекулярной массы Fermentas, молекулярные массы маркерных белков представлены в килодальтонах (kDa)

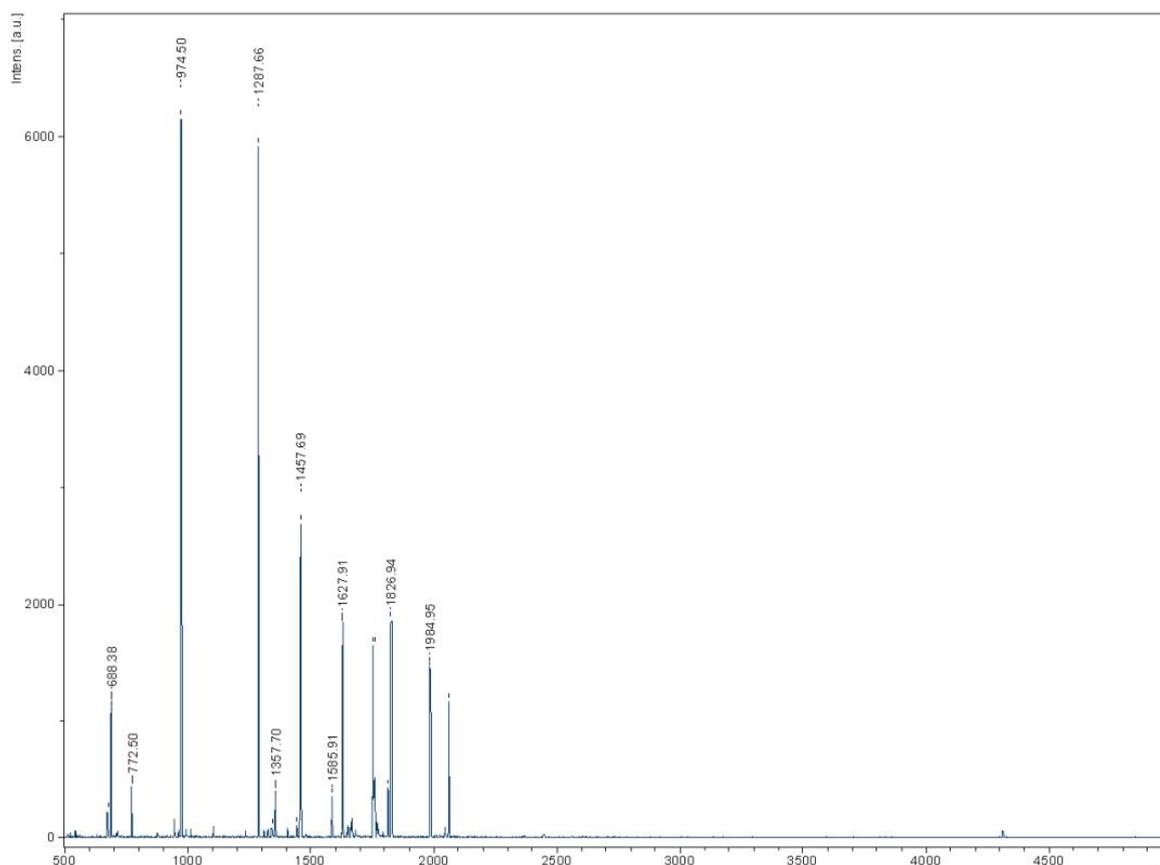


Рис. 2. Масс-спектр продуктов трипсинолиза субъединицы с молекулярной массой около 26 кДа. По оси абсцисс – отношение величины молекулярной массы к заряду продуктов трипсинолиза белков (m/z), по оси ординат – интенсивность сигнала

promelas] (score 312); 2) vitellogenin [*Cyprinus carpio*] (score 308); vitellogenin [*Carassius auratus*] (score 289); vitellogenin 1 precursor [*Danio rerio*] (score 268); vitellogenin 7 precursor [*Danio rerio*] (score 262); vitellogenin B1 [*Cirrhinus molitorella*] (score 247); и др. (Mascot NCBI). На рис. 3 представлена аминокислотная последовательность одного из этих кандидатных белков – Vg карпа.

Аминокислотная последовательность вителлогенина карпа из 1353 остатков на 4 % перекрывалась с исследуемым белком красноперки-угай (рис. 3). Для пептида K.LLGYQLAAYFDKPTAR.V score была максимальной (табл.).

Аминокислотная последовательность вителлогенина *Cyprinus carpio* и его пептидов, совпадающих с пептидами белка красноперки-угай

Start-End	Mr (calc)	Score	Peptide
433-445	1440,7105		R. EVVMLGYGSMIAR. H + oxidation (M)
433-445	1456,7054		R. EVVMLGYGSMIAR. H+ 2 oxidation (M)
1035-1050	1811,9880	14	R. LLKQISLIDEETPEGK. A
1174-1189	1825,9726	129	K. LLGYQLAAYFDKPTAR. V
1236-1248	1286,6619	76	K. AEAGVLGEFFAAR. L
1249-1255	973,4869	66	R. LELEWER. L

(<http://www.matrixscience.com/>)

Таким образом, субъединица с мол. массой около 26 кДа представляет собой С-концевой фрагмент вителлогенина красноперки-угай. Анализ аминокислотной последовательности Vg в DB CDD NCBI показал, что этот фрагмент лежит вне области консервативных мотивов.

Выводы

Результаты работы показали успешную идентификацию вителлогенина красноперки-угай с использованием баз данных по белкам рыб с секвенированным геномом с высоким критерием достоверности. Успешная идентификация прошла с использованием MALDI в тандемном режиме. Важным выводом работы является возможность идентификации вителлогенина по неконсервативному фрагменту. Полученные результаты предполагают возможность использования подходов протеомики для оценки состояния водоемов по маркерным белкам.

Авторы выражают искреннюю благодарность к. б. н. М. В. Серебряковой (ИБМХ РАН) за масс-спектрометрический анализ белков.

1 MRAVVLALTV ALVASQQINL VPEFTPGKTY VYNYEALLLG GLPHEGLARA
 51 GIKVNSKVHL SAVTENTFLM KLMDPLIY EY AGIWPKDPFV PATKLT SALA
 101 AQLQIPIKFE YANGVVGKVF APAGVSP TVL NLHRGILN L QLN LKKTQNI
 151 YELQEAGA QG VCRTHYVISE DPKANHITVT KSKDL SHCQE RIMKDVGLAY
 201 TERCAECTER IKSLIETATY NYIMKPASAG VLITEATVEE VHQFS PFNEI
 251 HGAAQMEAKQ TLA FVEIEKT LVVPIKADYL ARGSLQY EFA TEILQTP IHL
 301 MKISDAPAQI IEVLKHLVAN NVAMVHEDAP LKFVQLIQ LL RVSTLENIEA
 351 IWAQFKDKPA YRRWLLDALP SVGTPV I I K F I KEKFLAGEL TLPEFIQALV
 401 VALQMTADL DTIQLTASLA MHEKIAKMPA LREVVM LGYG SM IARHCVAV
 451 PTC SAELLRP IHEIAAEATS KNDIREITLA LKVLGNAGHP ASLKPIMKLL
 501 PGLRTAASSL PLRVQVDAIL ALRNIAKKEP KLVQPVALQL VLDRALHPEV
 551 RMVACIVLFE SKPSVALVSS LAGALKTETN MHVVS FAYSH IKSLTRITAP
 601 DMAAVAGAAN VAIKLM SRKL DRLSFRFSRA LQLDYYHTPL MIGAAGSAYM
 651 INDAATILPR AVVAKARAYL AGAAADVLEI GVRTEGIQEA LLKSPA ADES
 701 VDRITKIKRT LRALANWKDL PNDQPLASVY IKFLGQEVAF VKIDKTIIBE
 751 AIPIVTGPKE RELKAALKA LQBGIAWQYA KPLLA AEVRR ILPTAVGVPM
 801 ELSLYTAAVA AASVNVKATI TPPLPEBIET MTLEQLKKT D VQLQAEARPS
 851 IALQTFAVMG VNTALIQAAV MARGKIRTIA PVKVAARADI LKGNKYVEAL
 901 PVEVPEHIAT LSFETLAVVR NIEPTAERT VPLVPELAVQ NSQTHSDYLS
 951 SENQDEV PVR APAPFDKTL C LAVPYIEIKG CVELHSHNAA FIRNDPLYI
 1001 IGQHSARATV ARAEGPAVER LELEVQVGPR AAERLLKQIS LIDEETPEGK
 1051 AFL LKKEIL ETEDKNRPVS SESRSSSSSR SNRSSSSSSS SSSSSSSSSS
 1101 MSSSRVSKTA TIMEPFRKEH KD RYLAPHGA SKKVVSSGSSA SSFERIQQA
 1151 KFLGNAVPPV FAVIARAVRV DHKLLGYQLA AYFDKPTARV QIVVSSIAEN
 1201 DNLKICVDGA LLSKHKVTAK LAWGPECQQY AVTAKAEAGV LGEFPAARLE
 1251 LEWERLPITV TTYAKM SKH IYMAAFQAGF RLERVMNSEK EIELTLALPN
 1301 QRSLNVIFRI PEMT LSRMGI HLPYAIPI NP DGSLSIQIDE DILSWIQRHI
 1351 KEE

Рис. 3. Аминокислотная последовательность вителлогенина карпа. Mascot, Protein View: gi|151558991|vitellogenin [Cyprinus carpio]. Жирным шрифтом выделены перекрывающиеся пептиды карпа и красноперки-угай.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 13-04-00427-а).

Литература

Андреева А. М., Чалов Ю. П., Рябцева И. П. Особенности распределения белков плазмы между специализированными компартментами внутренней среды на примере карпа *Cyprinus carpio* (L.) // Журн. эвол. биохимии и физиологии. 2007. Т. 43, № 6. С. 501–504.

Ганжа Е. В. Некоторые показатели иммунитета триплоидной радужной форели *Oncorhynchus mykiss* при её культивировании в условиях южного Вьетнама // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб: материалы международной конференции (Борок, 2011 г.). Москва, 2011. С. 90–95.

Гоуфман Е. И., Мошковский С. А., Тихонова О. В., Лохов П. Г., Згода В. Г., Серебрякова М. В., Торопыгин И. Ю., Власова М. А., Арчаков А. И., Сафарова М. Р., Макаров О. В. Протеомное исследование термостабильной фракции сыворотки пациентов с различными опухолями с применением двумерного электрофореза // Биохимия. 2006. Т. 71, вып. 4. С. 445–453.

Нейфах А. А., Тимофеева М. Я. Проблемы регуляции в молекулярной биологии развития. М.: Наука, 1978. 307 с.

Anderson T. A., Levitt D. G., Banaszak L. J. The structural basis of lipid interactions in lipovitellin, a soluble lipoprotein // Structure. 1998. Vol. 6 (7). P. 895–909. doi:10.1016/S0969-2126(98)00091-4.

Андреева А. М. Serum gamma-globulins of the fishes // Journal of Ichthyology. 2001. V. 41 (6). P. 464–470. Original Russian text is published in Voprosy Ikhtology, 2001, V. 41 (4). P. 550–556.

Андреева А. М. Structural and functional organization of fish blood proteins. N. Y.: Nova Science Publisher, 2012, 188 p.

Babin P. J., Bogert J., Kooiman F. P., Van Marrewijk W. J. A., Van der Horst D. J. Apolipoprotein B, vitellogenin, and microsomal triglyceride transfer protein genes are derived from a common ancestor // J. Mol. Evol. 1999. Vol. 49, N 150. P. 1–9.

Bengtén E., Quiniou S. M., Stuge T. B., Katagiri T., Miller N. W., Clem L. W., Warr G. W., Wilson M. The IgH locus of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*, contains multiple constant region gene sequences: different genes encode heavy chains of membrane and secreted IgD // J. Immunol. 2002. Vol. 169 (5). P. 2488–2497.

Finn R. N., Fyhn H. J., Norberg B., Munholland J. and Reith M. Oocyte hydration as a key feature in the adaptive evolution of teleost fishes to seawater // Proc. 6 Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish. 2000. P. 289–291.

Johanning K. M., Specker J. L. Characterization of yolk proteins during oocyte development of tilapia, *Oreochromis mossambicus* // *Comp. Biochem. Physiol.* 1995. Vol. 112B. P. 177–189.

Laemmler U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // *Nature (Gr. Brit.)*. 1970. Vol. 227 (4), N 5259. P. 680–685.

Liu J. L., Anderson G. P., Goldman E. R. Isolation of anti-toxin single domain antibodies from a semi-synthetic spiny dogfish shark display library // *BMC Biotechnology*. 2007. 7:78. doi:10.1186/1472-6750-7-78.

Matsubara T., Adachi S., Ijiri S. and Yamauchi K. Change of lipovitellin during in vitro oocyte maturation in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fich.* 1995. Sci.61:478–481.

Matsubara T., Ohkubo N., Andoh T., Sullivan C. V., Hara A. Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost spawning pelagic eggs // *Dev. Biol.* 1999. Vol. 213 (1). P. 18–32.

Mohida K., Lou Y.-H., Harat A., Yamauchi K. Physical biochemical properties of IgM from a teleost fish // *Immunology*. 1994, 83. P. 675–680.

Shved N. A., Syasiana I. G., Kumeiko V. V. Enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) measurement of vitellogenin in plasma and liver histopathology in barfin plaice *Liopsetta pinnifasciata* from Amursky Bay, Sea of Japan // *Fich. Physiol. Biochem.* 2010. Vol. 37, N 4. P. 781–799.

Sonnenschein C., Soto A. M. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics, antagonists // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1998. Vol. 65. P. 143–150.

Vesely T., Reschova S., Pokorova D., Hulova J., Nevorankova Z. Production of monoclonal antibodies against immunoglobulin heavy chain in common carp (*Cyprinus carpio* L.) // *Veterinari Medicina*. 2006 (5), 51. P. 296–302.

Wang H., Yan T., Tan J. T. T., Gong Z. A zebrafish vitellin gene (vg3) encodes a novel vitellogenin without a phosvitin domain and may represent a primitive vertebrate vitellogenin gene // *Gene*. 2000. Vol. 256. P. 303–310.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Андреева Алла Михайловна

зав. ЦКП «Молекулярные технологии», д. б. н.
Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН
пос. Борок, Некоузский район, Ярославская обл.,
Россия, 152742
эл. почта: aam@ibiw.yaroslavl.ru
тел.: (48547) 24119

Федоров Роман Александрович

младший научный сотрудник
ЦКП «Молекулярные технологии»
Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН
пос. Борок, Некоузский район, Ярославская обл.,
Россия, 152742
эл. почта: fedor-off@yandex.ru

Рябцева Ирина Павловна

научный сотрудник ЦКП «Молекулярные технологии»
Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН
пос. Борок, Некоузский район, Ярославская обл.,
Россия, 152742
эл. почта: molbiol@ibiw.yaroslavl.ru

Ламаш Нина Евгеньевна

старший научный сотрудник
Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского
Дальневосточного отделения РАН
лаб. фармакологии
ул. Пальчевского, д. 17, Владивосток,
Россия, 690059
Дальневосточный федеральный университет
ул. Суханова, 8, Владивосток,
Россия, 690950
эл. почта: ninalamash@yandex.ru

Филиппова Александра Эльдаровна

старший лаборант ЦКП «Молекулярные технологии»
Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН
пос. Борок, Некоузский район, Ярославская обл.,
Россия, 152742
эл. почта: antury@yandex.ru

Andreeva, Alla

I. P. Papanin Institute for Biology of Inland Waters
Russian Academy of Sciences,
152742, Borok, Nekouzskiy District, Yaroslavl Region
Russia
e-mail: aam@ibiw.yaroslavl.ru
tel.: (48547) 24119

Fedorov, Roman

I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters
Russian Academy of Sciences,
152742, Borok, Nekouzskiy District, Yaroslavl Region
Russia
e-mail: fedor-off@yandex.ru

Ryabtseva, Irina

I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters
Russian Academy of Sciences,
152742, Borok, Nekouzskiy District, Yaroslavl Region
Russia
e-mail: molbiol@ibiw.yaroslavl.ru

Lamash, Nina

A. V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology
Far Eastern Branch of the
Russian Academy of Sciences
17 Palcheyevskogo St.,
690059 Vladivostok, Russia
Far Eastern Federal University,
8 Sukhanova St., 690059
Vladivostok, Russia
e-mail: ninalamash@yandex.ru

Philippova, Alexandra

I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters
Russian Academy of Sciences,
152742 Borok, Nekouzskiy District, Yaroslavl Region
Russia
e-mail: antury@yandex.ru

УДК 581.1:582.542.11:546.48

ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ НА НЕКОТОРЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ У РАСТЕНИЙ ТИМОФЕЕВКИ ЛУГОВОЙ (*PHLEUM PRATENSE* L.)

Ю. В. Батова, Н. М. Казнина, Г. Ф. Лайдинен, А. Ф. Титов

Институт биологии Карельского научного центра РАН

В условиях вегетационного опыта изучалось влияние кадмия на ряд основных физиологических процессов растений тимopheевки луговой (*Phleum pratense* L.). опыты показали, что после 40 дней воздействия кадмия в концентрации 40 мг/кг субстрата у растений наблюдается торможение роста, которое в большей степени проявляется в отношении надземных органов. Кадмий вызывал также снижение содержания зеленых пигментов, но функциональная активность фотосинтетического аппарата растений при этом поддерживалась на высоком уровне. Установлено также, что под влиянием металла увеличивается число устьиц на единицу площади листа и возрастают интенсивность транспирации и устьичная проводимость, хотя нарушений в оводненности тканей органов не происходит. Полученные результаты свидетельствуют о высокой металлоустойчивости тимopheевки луговой, которая достигается за счет структурно-функциональных изменений, направленных на поддержание высокой интенсивности фотосинтеза и необходимого водного баланса.

Ключевые слова: *Phleum pratense* L., кадмий, рост, фотосинтез, водный обмен.

Yu. V. Batova, N. M. Kaznina, G. F. Laidinen, A. F. Titov. EFFECT OF CADMIUM ON SOME PHYSIOLOGICAL PROCESSES IN TIMOTHY (*PHLEUM PRATENSE* L.)

The effect of cadmium on some major physiological processes in timothy (*Phleum pratense* L.) was studied in a greenhouse experiment. After 40 days of exposure to 40 mg/kg cadmium the plants demonstrated growth inhibition, which was the most pronounced in the above-ground organs. Cadmium also reduced the content of green pigments, but the functional activity of the plants' photosynthetic apparatus remained high. We found also that treatment with the metal increased the number of stomata per unit leaf area, and promoted the transpiration rate and stomatal conductance, although the water content in the organs remained unaffected. The results prove timothy is highly resistant to the metal owing to the structural and functional modifications targeted at maintaining the high rate of photosynthesis and adequate water balance.

Key words: *Phleum pratense* L., cadmium, growth, photosynthesis, water metabolism.

Введение

Тяжелые металлы являются одним из наиболее опасных загрязнителей окружающей среды. Вблизи предприятий горнодобывающей, металлургической, химической промышленности и теплоэнергетики содержание тяжелых металлов в почве может многократно превышать их фоновые значения [Merrington, Alloway, 1994; Лянгузова, 2005]. В результате на этих территориях происходит нарушение естественных фитоценозов, в частности, изменяется их видовой состав – увеличивается долевое участие видов с высокой металлоустойчивостью и снижается представительство менее устойчивых видов [Жуйкова и др., 2002; Лайдинен и др., 2011]. К числу устойчивых видов относится целый ряд многолетних злаков, включая тимopheевку луговую [Алексеева-Попова, 1991; Титов и др., 2007].

Тимopheевка луговая (*Phleum pratense* L.) имеет широкое распространение в подзоне средней и северной тайги [Раменская, 1983] и участвует в формировании травянистых сообществ различных типов, в том числе существующих вблизи промышленных предприятий [Атабаева, 2007; Казнина и др., 2009; Лайдинен и др., 2011]. Известно также, что тимopheевка используется для озеленения крупных промышленных городов и территорий, прилегающих к автомобильным магистралям [Мифтахова, 2005], а также для рекультивации техногенно нарушенных территорий [Ламанова, Шеремет, 2011]. Все это говорит о высокой металлоустойчивости данного вида. Однако имеющиеся в литературе сведения о влиянии тяжелых металлов на растения тимopheевки луговой касаются главным образом ростовых показателей и содержания фотосинтетических пигментов [Атабаева, 2007; Титов и др., 2007; Казнина и др., 2009], хотя для оценки ее адаптивного потенциала необходимо в первую очередь изучить влияние тяжелых металлов на основные физиологические процессы растений.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования явилось изучение влияния кадмия, как одного из наиболее токсичных тяжелых металлов, на ряд важнейших физиологических процессов (рост, фотосинтез, транспирацию) растений тимopheевки луговой.

Материалы и методы

Исследования проведены с использованием приборно-аналитической базы Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН.

Семена тимopheевки луговой были собраны в одной из дикорастущих популяций вблизи г. Петрозаводска. Проращивание семян проводили в лабораторных условиях в чашках Петри при температуре воздуха 22° в течение 7 дней. Затем проростки высаживали в сосуды с песком объемом 1 дм³ и выращивали в условиях вегетационного опыта. В опытных вариантах в сосуды добавляли кадмий в форме сульфата в концентрации 40 мг/кг. Полив растений осуществляли половинным раствором Кнопа.

Анализ растений проводили через 40 дней после высадки в сосуды. Действие кадмия на рост растений оценивали по следующим показателям: длина наиболее развитого корня, высота главного побега, сырая и сухая биомасса подземных и надземных органов. О влиянии кадмия на состояние фотосинтетического аппарата (ФСА) судили по изменению (по отношению к контролю) площади листовой пластинки полностью сформированного (5-го) листа, интенсивности фотосинтеза, параметров флуоресценции хлорофилла (максимальной и реальной квантовой эффективности фотосистемы II (ФС II)), содержания фотосинтетических пигментов. Влияние кадмия на водный обмен растений оценивали по изменению оводненности тканей корня и побега, интенсивности транспирации и величине устьичной проводимости, а также по состоянию устьичного аппарата.

Площадь листовой пластинки рассчитывали по формуле $S = 2/3ld$, где l – длина, d – ширина листовой пластинки [Аникиев, Кутузов, 1961]. Содержание хлорофиллов a , b и каротиноидов определяли спектрофотометрически, экстрагируя 80%-м ацетоном [Шлык, 1971]. Расчет доли хлорофиллов в светособирающем комплексе (ССК) от их суммы проводили с учетом того, что весь хлорофилл b находится в светособирающем комплексе, а отношение хлорофиллов a/b в ССК равно 1,2 [Lichtenthaler, 1987]. Измерение параметров флуоресценции хлорофилла осуществляли с использованием флуориметра MINI-PAM (Walz, Германия). Максимальную квантовую эффективность ФС II (F_v/F_m) рассчитывали как отношение переменной флуоресценции (F_v) к максимальной (F_m) у адаптированных к темноте листьев. Реальную квантовую эффективность ФС II (Yield) определяли у адаптированных к свету листьев по формуле: $Yield = (F_r' - F_t) / F_r'$, где F_r' – максимальный уровень флуоресценции, F_t – стационарный уровень флуоресценции [Maxwell, Jonson, 2000]. Оводненность тканей рассчитывали по общепринятой формуле. Интенсивность фотосинтеза, транспирации и устьичную проводимость определяли с помощью уста-

новки для исследования CO₂-газообмена и водяных паров HCM-1000 (Walz, Германия). Подсчет числа устьиц на нижнем эпидермисе листа и измерение размеров замыкающих клеток и устьичной щели осуществляли методом отпечатков [Жолкевич, Пильщикова, 1989] с использованием светового микроскопа Микмед 2 (ЛОМО, Россия) и окуляр-микрометра.

Биологическая повторность в пределах каждого варианта опыта составляла не менее 10 растений. В таблицах и на рисунках приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки по двум независимым опытам. Достоверность различий между вариантами опыта оценивали с помощью критерия Стьюдента ($P \leq 0,05$).

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что кадмий в изученной концентрации вызывает у растений тимофеевки луговой 30-процентное снижение накопления биомассы. При этом его негативное влияние на рост в большей степени проявлялось в отношении надземных органов. Так, под действием металла существенно снижались (по отношению к контролю) высота главного побега, накопление сырой и сухой биомассы побегов (табл. 1). В то же время на длину и накопление сырой биомассы корней кадмий не оказал заметного влияния, а уменьшение их сухой биомассы было выражено в меньшей степени, чем биомассы побегов.

Таблица 1. Влияние кадмия (40 мг/кг субстрата) на рост растений тимофеевки луговой

Показатель	Контроль	Cd ²⁺	% от контроля
Высота побега, см	30,1 ± 0,7	20,7 ± 1,2	69*
Сырая биомасса побега, мг	771 ± 58	478 ± 54	62*
Сухая биомасса побега, мг	135 ± 12	73 ± 9	54*
Длина корня, см	19,6 ± 0,7	18,6 ± 0,4	95
Сырая биомасса корня, мг	610 ± 53	521 ± 67	85
Сухая биомасса корня, мг	65 ± 6	40 ± 5	62*
Сырая биомасса растения, мг	1381 ± 98	999 ± 115	72*

* – здесь и в табл. 2, 3 различия по отношению к контролю достоверны при $P \leq 0,05$.

Как правило, под действием кадмия у растений в большей степени тормозится рост корней, поскольку они первыми контактируют с ионами металла, а кадмий, как известно, может воздействовать на рост непосредственно, нарушая процессы деления и растяжения клеток [Серегин, Иванов, 2001]. Хотя в ряде случа-

ев при действии кадмия наблюдается ингибирование роста надземных органов растений при сохранении роста корневой системы, как показано, например, на ячмене [Puertas-Mejía et al., 2010]. Такая же реакция отмечена у растений пшеницы в условиях засоления [Francois et al., 1986] и у растений *Festuca pratensis* при дефиците элементов минерального питания [Усманов, 1987]. Авторы полагают, что перераспределение биомассы в пользу корней является одной из важных адаптивных реакций при подобных стрессовых воздействиях.

Помимо прямого действия, кадмий может тормозить рост растений и опосредованно, через изменение характера протекания физиологических процессов. При этом установлено, что наиболее чувствительным к данному металлу является фотосинтез [Bertrand, Poirier, 2005]. При оценке влияния кадмия на ФСА растений нами было выявлено, что под действием металла заметно уменьшается площадь листовой пластинки и снижается содержание зеленых пигментов (табл. 2). Причем уменьшение количества хлорофилла *b* было выражено в гораздо большей степени, чем хлорофилла *a*, что приводило к заметному увеличению отношения *a/b* и снижению доли хлорофиллов в ССК. Отмеченные изменения, очевидно, связаны со структурными перестройками в мембранах хлоропластов, которые, как известно, играют важную роль в механизмах регуляции работы ФСА [Мокроносов и др., 2006].

Таблица 2. Влияние кадмия (40 мг/кг субстрата) на состояние фотосинтетического аппарата растений тимофеевки луговой

Показатель	Контроль	Cd ²⁺	% от контроля
Площадь 5-го листа, см ²	7,5 ± 0,4	4,8 ± 0,5	64*
Содержание хлорофилла <i>a</i> , мг/г сырого веса	1,23 ± 0,06	0,82 ± 0,01	67*
Содержание хлорофилла <i>b</i> , мг/г сырого веса	0,68 ± 0,03	0,23 ± 0,01	33*
Содержание каротиноидов, мг/г сырого веса	0,53 ± 0,03	0,54 ± 0,01	101
Отношение хлорофиллов <i>a/b</i>	1,80 ± 0,04	3,65 ± 0,05	203*
Доля хлорофиллов в ССК, %	78,8 ± 1,1	47,4 ± 0,5	60*
Fv/Fm (максимальная квантовая эффективность ФС II)	0,77 ± 0,003	0,78 ± 0,002	101
Yield (реальная квантовая эффективность ФС II)	0,75 ± 0,003	0,75 ± 0,002	99
Интенсивность фотосинтеза, мМоль CO ₂ /м ² ·с	26,1 ± 1,5	39,5 ± 0,6	151*

В отличие от зеленых пигментов содержание каротиноидов в присутствии кадмия не изменялось (табл. 2), что, очевидно, связано с их защитной функцией [Таланова и др., 2001]. Сохранение высокой концентрации каротиноидов может рассматриваться в качестве одного из адаптационных механизмов, обеспечивающих не только эффективное поглощение энергии, но и предотвращение повреждений ФСА в неблагоприятных условиях внешней среды.

Хлороз листьев, обычно свидетельствующий об уменьшении количества зеленых пигментов, является характерным признаком токсического действия кадмия на ФСА растений. Как следует из имеющихся в литературе данных, этот эффект может быть связан с негативным влиянием металла на биосинтез хлорофилла [Padmaja et al., 1990; Siedlecka, Krupa, 1999] и/или с усилением деградации пигментов [Abdel-Basset et al., 1995], а также со снижением количества хлоропластов в клетках листа [Baryla et al., 2001; Sandalio et al., 2001; Казнина и др., 2006].

Снижение содержания хлорофиллов, в свою очередь, считается одной из главных причин торможения скорости фотосинтеза у растений в присутствии кадмия [Ouzounidou et al., 1997]. Однако в наших опытах, несмотря на уменьшение количества зеленых пигментов, негативного влияния кадмия на интенсивность фотосинтеза обнаружено не было. Более того, в присутствии кадмия скорость этого процесса даже возросла (табл. 2). Не было отмечено и изменения показателей, отражающих функциональную активность ФС II. Так, величины показателей Fv/Fm и Yield, характеризующие соответственно максимальную фотохимическую активность ФС II и долю световой энергии, используемой комплексом ФС II на транспорт электронов [Maxwell, Jonson, 2000], практически не различались у растений опытного и контрольного вариантов. В опытах с растениями *Brassica napus* было установлено, что при длительном воздействии кадмия депигментация листьев, связанная с уменьшением количества хлоропластов, не сопровождается изменениями в фотохимической активности ФС II [Baryla et al., 2001]. Активизация работы ФСА на фоне снижения количества хлорофиллов обнаружена у бобов после 2-недельного воздействия на них кадмия в концентрациях от 10^{-7} до 10^{-5} М [Караваев и др., 2001] и у *Populus tremula* после 28 суток экспозиции на растворе с этим металлом в концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ М [Kieffer et al., 2009].

Отмеченная выше способность растений поддерживать высокую интенсивность фотосинтеза в неблагоприятных условиях внешней среды имеет важное приспособительное зна-

чение, поскольку позволяет удовлетворить потребности в энергетических и пластических ресурсах, необходимых для процесса адаптации [Климов, 2003]. Причем, как показано на примере холодной адаптации растений, чем сильнее выражена способность к сохранению функциональной активности ФСА при действии стрессора, тем выше устойчивость растений к данному фактору [Климов и др., 1997].

Проведенное нами исследование также показало, что растения тимopheевки луговой способны в присутствии кадмия поддерживать на высоком уровне показатели водного обмена. В частности, металл не только не оказал негативного влияния на оводненность тканей корня и побега, но более того, изученные показатели даже несколько возросли (табл. 3). При анализе состояния устьичного аппарата было обнаружено, что у растений, подвергнутых действию кадмия, увеличивалось количество устьиц на единицу площади листа. При этом размеры замыкающих клеток устьиц и устьичной щели не изменялись.

Таблица 3. Влияние кадмия (40 мг/кг субстрата) на показатели водного обмена растений тимopheевки луговой

Показатель	Контроль	Cd ²⁺	% от контроля
Кол-во устьиц, шт./мм ²	121,8 ± 5,1	228,6 ± 9,2	188*
Длина замыкающих клеток устьиц, мкм	44,4 ± 0,9	44,5 ± 0,7	100
Ширина замыкающих клеток устьиц, мкм	22,0 ± 0,7	22,8 ± 0,5	104
Длина устьичной щели, мкм	21,7 ± 0,6	21,7 ± 0,4	100
Ширина устьичной щели, мкм	10,9 ± 0,3	10,8 ± 0,3	99
Устьичная проводимость, мМ/м ² ·с	53,4 ± 5,2	142,0 ± 0,2	266*
Интенсивность транспирации, мМ/м ² ·с	1,6 ± 0,1	3,6 ± 0,2	223*
Оводненность тканей корня, %	89,3 ± 0,5	92,2 ± 0,4	103*
Оводненность тканей побега, %	82,6 ± 0,6	84,7 ± 0,3	103*

Известно, что устьичный аппарат растений играет важную роль в адаптации к меняющимся условиям произрастания [Coupe et al., 2006]. Быстрая реакция на флуктуации внешних факторов заключается в изменении размера устьичной щели, что позволяет предотвратить потери воды, например, в условиях засухи или засоления [Hetherington, Woodward, 2003]. Установлено, что кадмий вызывает закрытие устьиц у целого ряда культурных растений: кукурузы и подсолнечника [Bazzaz et al., 1974], бобов [Barceló et al., 1988], рапса [Baryla et al., 2001] и гороха [Sandalio et al., 2001].

Помимо изменения размеров устьичной щели в процессе адаптации растений к неблагоприятным условиям произрастания может меняться количество устьиц во вновь образующихся листьях [Coupe et al., 2006]. Сравнительно недавно было обнаружено, что зрелые листья способны передавать молодым листьям сигнал об изменениях в окружающей среде, который, в свою очередь, инициирует у них изменения в развитии устьичного аппарата за счет коррекции активности определенных групп генов (*TMM*, *YODA*, гены *ER*-семейства), кодирующих белки, участвующие в регуляции процесса деления клеток-предшественниц на две замыкающие клетки устьица [Bergmann, 2006]. В ряде работ указывается, что длительное или постоянное воздействие техногенных загрязнителей вызывает серьезные изменения анатомического строения листьев растений в сторону усиления их ксероморфности, которое проявляется, помимо прочего, в уменьшении размеров листовой пластинки и увеличении числа устьиц на единицу площади [Смирнов, 1986; Зиятдинова и др., 2012]. Полагают, что механизмы, участвующие в регуляции водного обмена растений в условиях недостатка влаги, используются ими и для обеспечения устойчивости к техногенным факторам [Гетко, 1989].

Сведения об изменении числа устьиц у растений в присутствии кадмия в литературе единичны. Показано, например, что под влиянием металла уменьшалось количество устьиц у сахарной свеклы [Greger, Johansson, 1992], *Brassica napus* [Baryla et al., 2001], ячменя [Казнина и др., 2011]. Обнаружено также, что характер структурных изменений устьичного аппарата во многом зависит от концентрации металла и вида растения [Coupe et al., 2006], а также от расположения листа [Özyiğit, Akinci, 2009]. Однако конкретный механизм влияния кадмия на формирование устьиц остается невыясненным.

Обнаруженное нами увеличение числа устьиц у тимopheевки луговой в присутствии кадмия при отсутствии выраженных изменений в размере замыкающих клеток и устьичной щели, очевидно, явилось основной причиной значительного повышения интенсивности транспирации и устьичной проводимости (табл. 3). При этом поддержание оводненности тканей при повышенном уровне транспирации обеспечивается, по-видимому, сохранением активного роста корня и его поглотительной способности [Barceló, Poschenrieder, 1990].

Помимо регуляции водного режима растений, устьица, как известно, оказывают существенное влияние на процесс фотосинтеза, из-

меняя скорость поступления CO_2 в хлоропласты из атмосферы [Кузнецов, Дмитриева, 2006]. Поэтому возрастание скорости фотосинтеза, отмеченное нами у тимopheевки в присутствии кадмия, можно, по-видимому, объяснить увеличением количества устьиц и усилением устьичной проводимости. В литературе имеются сведения, что изменение количества устьиц на поверхности листа может оказывать влияние на скорость фотосинтеза и накопление биомассы у травянистых растений [Mooney et al., 1991], и это рассматривается авторами как один из механизмов адаптации к неблагоприятным условиям внешней среды.

В целом полученные нами данные свидетельствуют о способности растений тимopheевки луговой длительное время расти в присутствии сравнительно высоких концентраций кадмия в корнеобитаемой зоне без существенного нарушения у них основных физиологических функций. При этом в растениях могут происходить значительные структурные (уменьшение содержания хлорофиллов, увеличение количества устьиц) и функциональные (увеличение интенсивности фотосинтеза и транспирации, возрастание устьичной проводимости) изменения, которые позволяют им поддерживать нормальную работу ФСА и обеспечивают необходимый водный баланс. Важно, что все эти изменения происходят на фоне ингибирования роста побега и сохранения активного роста корня и, очевидно, имеют защитно-приспособительный характер, способствуя поддержанию жизнедеятельности растений в присутствии повышенных концентраций кадмия во внешней среде.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития», подпрограмма «Биоразнообразие: состояние и динамика».

Литература

Алексеева-Попова Н. В. Токсическое действие свинца на высшие растения (обзор) / Устойчивость к тяжелым металлам дикорастущих видов. Л.: Наука, 1991. С. 92–100.

Аникиев В. В., Кутузов Ф. Ф. Новый способ определения площади листовой поверхности у злаков // Физиология растений. 1961. Т. 8, № 3. С. 375–377.

Атабаева С. Д. Физиолого-биохимические основы действия тяжелых металлов на растения: автореф. дис. ... докт. биол. наук. Алматы, 2007. 34 с.

Гетко Н. В. Растения в техногенной среде: структура и функция ассимиляционного аппарата. Минск.: Наука и техника, 1989. 208 с.

Жолкевич В. Н., Пильщикова Н. В. Методы изучения транспирации и состояния устьиц // Водный обмен растений / В. Н. Жолкевич, Н. А. Гусев, А. В. Капля и др. М.: Наука, 1989. С. 152–167.

Жуйкова Т. В., Мордвина Е. С., Баймашева А. О., Фриз О. А. Фитоиндикация и промышленный регион / Биота горных территорий. Екатеринбург. 2002. С. 53–65.

Зиятдинова К. З., Уразгильдин Р. В., Денисова А. В. Морфология листьев и побегов дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) в условиях загрязнения окружающей среды (на примере Уфимского промышленного центра) // Известия Самарского научного центра РАН. 2012. Т. 14, № 1(6). С. 1466–1469.

Казнина Н. М., Лайдинен Г. Ф., Венжик Ю. В., Титов А. Ф. Влияние кадмия на некоторые анатомо-морфологические показатели листа и содержание пигментов у ячменя // Вопросы общей ботаники: традиции и перспективы: материалы Междунар. научной конф., посвященной 200-летию Казанской ботанической школы (23–27 января 2006 г., Казань). Казань, 2006. С. 153–155.

Казнина Н. М., Титов А. Ф., Лайдинен Г. Ф., Батова Ю. В. Влияние промышленного загрязнения почвы тяжелыми металлами на морфологические признаки растений *Phleum pratense* L. // Труды КарНЦ РАН. 2009, № 3. С. 50–55.

Казнина Н. М., Титов А. Ф., Лайдинен Г. Ф., Батова Ю. В. Влияние кадмия на водный обмен растений ячменя // Труды КарНЦ РАН. 2011, № 3. С. 57–61.

Караваев В. А., Баулин А. М., Гордиенко Т. В., Довыдьков С. А., Тихонов А. Н. Изменения фотосинтетического аппарата листьев бобов в зависимости от содержания тяжелых металлов в среде выращивания // Физиология растений. 2001. Т. 48, № 1. С. 47–54.

Климов С. В. Холодовое закаливание растений – результат поддержания повышенного отношения фотосинтез/дыхание при низких температурах // Изв. РАН Сер. биол. 2003. № 1. С. 57–62.

Климов С. В., Астахова В. Н., Трунова Т. И. Связь холодоустойчивости растений с фотосинтезом // Физиология растений. 1997. Т. 44, № 6. С. 879–886.

Кузнецов Вл. В., Дмитриева Г. А. Физиология растений. М.: Высшая школа. 2006. 736 с.

Лайдинен Г. Ф., Казнина Н. М., Батова Ю. В., Титов А. Ф. Состояние травянистой растительности в условиях промышленного загрязнения (на примере Южной Карелии) // Раст. ресурсы. 2011. Т. 47, вып. 4. С. 51–61.

Ламанова Т. Г., Шеремет Н. В. Состояние агропопуляций *Phleum pratense* (Poaceae) на отвалах в лесостепи Кузнецкой котловины // Раст. ресурсы. 2011. Т. 47, вып. 4. С. 61–74.

Лянгузова И. В. Промышленное загрязнение окружающей среды (краткий обзор проблемы) / Проблемы экологии растительных сообществ. СПб.: ООО «ВВМ», 2005. С. 23–27.

Мифтахова С. А. Биологические основы интродукции некоторых видов злаковых трав для газонно-среднетраежной подзоны республики Коми // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Сыктывкар, 2005. 22 с.

Мокронос А. Т., Гавриленко В. Ф., Жигалова Т. В. Фотосинтез. Физиолого-экологические и биохимические аспекты. М.: Академия, 2006. 446 с.

Раменская М. Л. Анализ флоры Мурманской области и Карелии. Л.: Наука, 1983. 215 с.

Смирнов И. А. Роль устьичного аппарата в формировании газовойносливости древесных растений // Вестн. с.-х. науки Казахстана. 1986. № 10. С. 72–75.

Серегин И. В., Иванов В. Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // Физиология растений. 2001. Т. 48, № 4. С. 606–630.

Таланова В. В., Титов А. Ф., Боева Н. П. Влияние свинца и кадмия на проростки ячменя // Физиология и биохимия культ. растений. 2001. Т. 33, № 1. С. 33–37.

Титов А. Ф., Таланова В. В., Казнина Н. М., Лайдинен Г. Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2007. 170 с.

Усманов И. Ю. Аутоэкологические адаптации растений к изменениям азотного питания. Уфа: Изд. БФ АН СССР, 1987. 148 с.

Шлык А. А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // Биологические методы в физиологии растений М.: Наука, 1971. С. 154–170.

Abdel-Basset R., Issa A. A., Adam M. S. Chlorophyllase activity: effects of heavy metals and calcium // Photosynthetica. 1995. Vol. 31. P. 421–425.

Baryla A., Carrier P., Franck F., Coulomb C., Sahut C., Havaux M. Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth // Planta. 2001. Vol. 212. P. 696–709.

Barceló J., Vázquez M. D., Poschenrieder C. Structural and ultrastructural disorders in cadmium-treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) // New Phytol. 1988. Vol. 108. P. 37–49.

Barceló J., Poschenrieder C. Plant water relations as affected by heavy metal stress: A review // J. Plant Nutr. 1990. Vol. 13. P. 1–37.

Bazzaz F. A., Rolfe G. L., Carlson R. W. Effect of Cd²⁺ on photosynthesis and transpiration of excised leaves of corn and sunflower // Physiol. Plant. 1974. Vol. 32. P. 373–377.

Bergmann D. Stomatal development from neighborly to global communication // Curr. Opin. Plant Biol. 2006. Vol. 9. P. 478–483.

Bertrand M., Poirier I. Photosynthetic organisms and excess of metals // Photosynthetica. 2005. Vol. 43. P. 345–353.

Coupe S. A., Palmer B. G., Lake J. A., Overy S. A., Oxborough K., Woodward F. I., Gray J. E., Quick W. P. Systemic signaling of environmental cues in *Arabidopsis* leaves // J. Exp. Bot. 2006. Vol. 57. P. 329–341.

Francois L. E., Maas E. V., Donovan T. J., Youngs V. L. Effect of salinity on grain and quality, vegetative growth and germination of semi-dwarf and durum wheat // Agron. J. 1986. Vol. 78. P. 1053–1058.

Greger M., Johansson M. Cadmium effects on leaf transpiration of sugar beet (*Beta vulgaris*) // Physiol. Plant. 1992. Vol. 86. P. 465–473.

Hetherington A. M., Woodward F. I. The role of stomata in sensing and driving environmental change // Nature. 2003. Vol. 424. P. 901–908.

Kieffer P., Schröder P., Dommès J., Hoffmann L., Renaut J., Hausman J.-F. Proteomic and enzymatic response of poplar to cadmium stress // J. Proteomics. 2009. Vol. 72. P. 379–396.

Lichtenthaler H. K. Chlorophylls and carotenoids – pigments of photosynthetic biomembranes // Methods Enzymol. 1987. Vol. 148. P. 350–382.

Maxwell K., Johnson G. N. Chlorophyll fluorescence – practical guide // J. Exp. Bot. 2000. Vol. 51. P. 659–668.

Alloway B. J. The flux of Cd, Cu, Pb and Zn in mining polluted soils // Water Air Soil Pollut Merrington G. 1994. Vol. 73. P. 333–344.

Mooney H. A., Drake D. G., Luxmoore R. J. et al. Predicting ecosystem response to elevated CO₂ concentrations // Bioscience. 1991. Vol. 41. P. 96–104.

Ouzounidou G., Moustakas M., Eleftheriou E. P. Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves // Environ. Contamin. Toxicol. 1997. Vol. 32, N 2. P. 154–160.

Özyiğit I. I., Akinci S. Effects of some stress factor (aluminium, cadmium and drought) on stomata of roman nettle (*Urtica pilulifera* L.) // Not. Bot. Hort. Agrobot. Cl. 2009. Vol. 37. P. 108–115.

Padmaja K., Prasad D. P. K., Prasad A. R. K. Inhibition of chlorophyll synthesis in *Phaseolus vulgaris* L. seedlings by cadmium acetate // Photosynthetica. 1990. Vol. 24, N 3. P. 399–405.

Puertas-Mejía M. A., Ruiz-Díez B., Fernández-Pascual M. Effect of cadmium ion excess over cell structure and functioning of *Zea mays* and *Hordeum vulgare* // Biochem. Syst. Ecol. 2010. Vol. 38. P. 285–291.

Sandalio L. M., Dalurzo H. C., Gomes M., Romero-Puertas M. C., del Río L. A. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants // J. Exp. Bot. 2001. Vol. 52, N 364. P. 2115–2126.

Siedlecka A., Krupa Z. Cd/Fe interaction in higher plants – its consequences for the photosynthetic apparatus // Photosynthetica. 1999. Vol. 36, N 3. P. 321–331.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Батова Юлия Валерьевна

научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия 185910
e-mail: batova@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 762706

Казнина Наталья Мстиславовна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
e-mail: kaznina@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 762706

Лайдинен Галина Федоровна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
e-mail: laidinen@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 762706

Титов Александр Федорович

председатель КарНЦ РАН, чл.-корр. РАН, д. б. н., проф.
руководитель лаб. экологической физиологии растений
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
e-mail: titov@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769710

Batova, Yulia

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: batova@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 762706

Kaznina, Natalia

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: kaznina@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 762706

Laidinen, Galina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: laidinen@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 762706

Titov, Alexandr

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: titov@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769710

УДК 581.1:581.2.02

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ Pb^{2+} И ЭДТА НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ *PELARGONIUM ZONALE* L.

Д. И. Башмаков, Л. П. Акамова, К. А. Сазанова

Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева

В работе исследовано влияние ионов Pb^{2+} и ЭДТА на физиолого-биохимические параметры (рост осевых органов, площадь листа, металлоторерантность, скорость генерации супероксидного анион-радикала, интенсивность перекисного окисления липидов, активность аскорбат-пероксидазы) молодых растений *Pelargonium zonale* L. Результаты проведенной работы свидетельствуют, что ионы Pb^{2+} , в отличие от других металлов, в диапазоне изученных концентраций практически не влияли на растения *Pelargonium zonale*. Предобработка семян ЭДТА оказывала негативный эффект на рост и окислительный статус ювенильных растений пеларгонии, подвергнутых действию ионов Pb^{2+} .

Ключевые слова : *Pelargonium zonale* L., предобработка семян, ЭДТА, индекс толерантности, свинец, супероксидный анион-радикал, перекисное окисление липидов, аскорбат-пероксидаза.

D. I. Bashmakov, L. P. Akamova, K. A. Sazanova. Pb^{2+} AND EDTA EFFECT ON PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS IN *PELARGONIUM ZONALE* L.

We studied Pb^{2+} and EDTA effects on the growth of axial organs, leaf area, metal tolerance, superoxide generation rate, LPO rate and APX activity in *Pelargonium zonale* L. seedlings. Within the investigated range of concentrations, ions of Pb^{2+} , unlike other metals, had practically no effect on *Pelargonium zonale* plants. Pretreatment of *Pelargonium zonale* seeds with EDTA negatively affected the growth parameters and oxidative status of young plants exposed to Pb^{2+} .

Key words : *Pelargonium zonale* L.; seed pretreatment, EDTA; index of tolerance; lead; superoxide anion; lipid peroxidation; ascorbate peroxidase.

Введение

Начало выплавки и использования свинца относится ко II тысячелетию до н. э., однако до начала XIX века свинцовая промышленность была развита слабо [Рынок руд...]. В настоящее время свинец входит в шестерку основных цветных металлов, по которым проводят торги на London Metal Exchange. По данным U. S. Geological Survey [2011], на 1 января 2011 года

общемировые запасы свинца составляли 75,9 млн тонн, или 0,26 % от общего объема запасов цветных металлов. Мировая добыча свинца в 2010 году составила 4,2 млн тонн (4 место после алюминия, меди и цинка). Вопреки тому, что свинец вытесняется в современных высокотехнологичных производствах пластмассами или другими металлами – оловом, цинком, алюминием, происходит ежегодный рост объемов добычи свинца на 6 %. Это сопровождается

ся увеличением его эмиссии в окружающую среду. В результате происходит интенсивное загрязнение свинцом почв и водных бассейнов, как на территориях, непосредственно прилегающих к районам добычи и переработки, так и далеко за их пределами [Callender, 2003]. Свинец надолго включается в биологические круговороты и способен аккумулироваться в растительном и животном организме, поэтому увеличение техногенной эмиссии в окружающую среду делает свинец одним из опасных загрязнителей биоты.

Свинец, как правило, обнаруживается в каждом растении, но не относится к эссенциальным элементам [Ильин, 1991]. В небольших количествах Pb^{2+} повышает содержание крахмала, ускоряет прорастание семян [Ягодин, 1989]. Но уже в концентрациях от 0,1 до 2,4 мМ свинец способен ингибировать активность фотосистемы II [Физиология растительных организмов..., 1989]. Pb^{2+} влияет на поглощение воды растением, ингибирует дыхание [Козаренко, 1987], биосинтез хлорофилла [Singh et al., 1996], минеральное питание [Malcová, Gryndler, 2003]. При действии Pb^{2+} снижается содержание хлорофилла и корневая активность [Li-hong et al., 2006]. Pb^{2+} нарушает транспорт калия и кальция через плазматические мембраны [Rucinska, Gwozdz, 2005], препятствует образованию веретена деления и нормальному прохождению митоза, индуцирует образование двуядерных клеток [Jiang, Liu, 2000].

Известно, что самоочищение почв практически не происходит или скорость его чрезвычайно низка. Так, период полуудаления из почвы свинца составляет несколько тысяч лет [Лебедева, Фрумин]. Свинец не подвержен биодegradации [Saxena et al., 1999], поэтому растения являются наиболее важными природными компонентами в решении проблемы нейтрализации вредных воздействий индустриального производства. Их устойчивость и способность аккумулировать различные загрязнители определяют использование некоторых видов в фиторемедиации почв. Эта находящаяся на стадии становления и недорогая технология позволяет использовать растения для удаления, преобразования или стабилизации загрязняющих веществ, локализованных в воде, отложениях или почвах [McGrath, Zhao, 2003]. Некоторые виды, растущие на содержащих свинец почвах, выработали способность аккумулировать в своих тканях большие количества этого металла без проявления симптомов токсичности. Их предложено использовать для очистки загрязненных свинцом участков [Baker, Brooks, 1989]. В начале 1990-х гг. были проведены по-

левые опыты для проверки потенциальной фитоэкстракции металлов растениями-гипераккумуляторами [Brown et al., 1995]. По сравнению с неаккумулялирующими растениями концентрации металлов в растениях-гипераккумуляторах на 1–3 порядка выше. К гипераккумуляторам свинца относят тот или иной вид, если в его надземных или подземных органах аккумулируется свыше 1000 мкг/г (0,1 % сухой массы) этого металла [McGrath, 1998]. В мировой флоре насчитывают всего 5 видов-гипераккумуляторов свинца [Prasad, Freitas, 2006]. Самый распространенный среди них вид – пеларгония зональная (*Pelargonium zonale* L.).

Большую актуальность имеет разработка и внедрение способов повышения фиторемедиационной способности растений методами генной инженерии, чтобы придать быстро растущим неаккумулялирующим растениям некоторые свойства гипераккумуляторов [Chaney et al., 1997], или обработкой физиологически активными веществами для повышения экстрагирующей способности растений [Pierzynski, Schwab, 1993]. Искусственные хелаты типа этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) были проверены на повышение фитодоступности металлов и последующее поглощение и транслокацию в побеги [Прасад, 2009]. По данным ряда авторов, ЭДТА можно применять в качестве препарата, повышающего фитоэкстракцию свинца из загрязненных почв [Huang, Cunningham, 1996; Saxena et al., 1999; Автухович, 2005].

Исходя из вышесказанного, целью данной работы было изучение физиолого-биохимических параметров пеларгонии при действии тяжелых металлов и совместном действии ЭДТА и ионов Pb^{2+} .

Материалы и методы

Объект исследования. Молодые растения *Pelargonium zonale* L. (семейство Гераниевые – *Geraniaceae*). Эта декоративная культура появилась в Европе в начале XVIII века в результате многократных скрещиваний пеларгонии зональной с другими видами и формами. Высота растений колеблется от 30 до 120 см. Очень нетребовательна к условиям выращивания [Комнатные растения...].

Постановка эксперимента. 1. Влияние эквимолярных концентраций ТМ на растения пеларгонии. Перед посевом семена стерилизовали в растворе 13%-й H_2O_2 в 96%-м C_2H_5OH в течение 5 мин. После удаления стерилизующего раствора семена проращивали в чашках Петри (по 30 штук на чашку) в факторостатных условиях (освещенность около 80 мкМ фото-

нов/м²·с, фотопериод 14 ч, температура 21 °С) на растворах, содержащих 0 (контроль), 10, 100 и 1000 мкМ ионов Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺ или Pb²⁺ (концентрации подобраны в предварительных экспериментах и близки к физиологической, сублетальной и летальной соответственно). Использовали соли CuSO₄·5H₂O; ZnSO₄·7H₂O NiSO₄·7H₂O и Pb(NO₃)₂ квалификации чда. На 12-е сутки опыта у растений измеряли линейные размеры (длину корня и побегов).

2. Влияние ионов Pb²⁺ и ЭДТА на растения пеларгонии. Семена пеларгонии замачивали в растворе ЭДТА (10⁻² %) или дистиллированной воде (контроль) в течение 8 часов, затем их переносили на растворы, содержащие 10 мкМ или 1 мМ ионов Pb²⁺ (Pb(NO₃)₂). На 5, 8 и 12-е сутки измеряли линейные параметры растений пеларгонии, а также на 12-е сутки – площадь листа. На 10-е сутки опыта спектрофотометрическим методом определяли скорость генерации супероксидного анион-радикала, интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активность аскорбатпероксидазы (АПО) в листьях пеларгонии.

Для определения величины устойчивости растений рассчитывали индекс толерантности (ИТ) = длина корня в опыте / длина корня в контроле [Koornneeff et al., 1997].

Определение линейных размеров проростков и площади листа. Молодые растения сканировали с разрешением 800 dpi. Измерения длины органов проростков (главный корень, побег) с точностью до 0,1 мм, а также определение площади семядолей проводили в программе MapInfo Professional v. 11.

Скорость генерации супероксидного анион-радикала определяли по восстановлению адреналина в адренохром [Лукаткин, 2002а]. Высечки листьев (300 мг) гомогенизировали в 15 мл дистиллированной воды, затем гомогенат центрифугировали 15 мин при 4000 g. К 3 мл супернатанта добавляли 100 мкл 0,01%-го раствора адреналина и инкубировали 45 мин при комнатной температуре и освещенности 80 мкМ фотонов/м²·с. Сразу после инкубации измеряли оптическую плотность образовавшегося адренохрома против гомогената с водой на спектрофотометре UV-mini 1240 (Shimadzu, Япония) при длине волны 480 нм. Скорость генерации супероксида рассчитывали в мкМ/г·мин ($\epsilon = 4020 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Интенсивность ПОЛ в листьях оценивали по накоплению продукта окисления – малонового диальдегида (МДА) – по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [Лукаткин, Голованова, 1988]. Навеску листьев 0,3 г гомогенизировали в среде выделения (0,1 М фосфатный

буфер pH 7,6, содержащий 0,35 М NaCl). К 3 мл гомогената добавляли 2 мл 0,5 % ТБК в 20 % трихлоруксусной кислоте, инкубировали на кипящей водяной бане 30 мин, фильтровали и регистрировали оптическую плотность фильтрата на спектрофотометре UV-mini 1240 (Shimadzu, Япония) при длине волны 532 нм. Контролем служила среда выделения с реагентом. Концентрацию МДА рассчитывали по молярной экстинкции ($\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$); количество МДА, содержащегося в листьях, рассчитывали в мкМ МДА на 1 г сырой массы.

Активность АПО определяли по методике [Лукаткин, 2002б] с модификациями. Высечки листьев массой 1 г гомогенизировали в 10 мл 50 мМ фосфатного буфера (pH 7,6) с добавлением 0,3 г поливинилпирролидона (ПВП). Полученную смесь фильтровали и центрифугировали 10 мин при 8000 g.

Реакционная смесь состояла из 50 мкл 0,1 мМ ЭДТА, 300 мкл 0,05 мМ аскорбиновой кислоты, 50 мкл перекиси водорода, 2,55 мМ фосфатного буфера (pH 7,6) и 50 мкл полученного при центрифугировании экстракта. Оптическую плотность регистрировали на спектрофотометре UV-mini 1240 (Shimadzu, Япония) при длине волны 290 нм.

Контролем служила следующая смесь: 2,75 мл фосфатного буфера (pH 7,6), 50 мкл ЭДТА, 50 мкл перекиси водорода, 150 мкл аскорбиновой кислоты (без ферментного экстракта).

При расчете активности АПО использовали снижение оптической плотности раствора за первые 30 с реакции с последующим расчетом активности с использованием коэффициента молярной экстинкции $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Повторности и статистическая обработка результатов. Все опыты проводили в трех повторностях. Каждый опыт состоял из двух-трех биологических повторностей (высечек листьев с 10–15 проростков), каждый вариант включал три аналитические повторности. Результаты обрабатывали статистически по общепринятым биометрическим формулам с использованием пакетов прикладных программ «Microsoft Excel 2010» и «Statistica v. 8». Существенность различий между вариантами оценивали по критерию Стьюдента при уровне значимости 95 %.

Результаты и обсуждение

Сравнительное действие эквимольных концентраций тяжелых металлов (ТМ) на рост побегов и корней пеларгонии приведено на рис. 1.

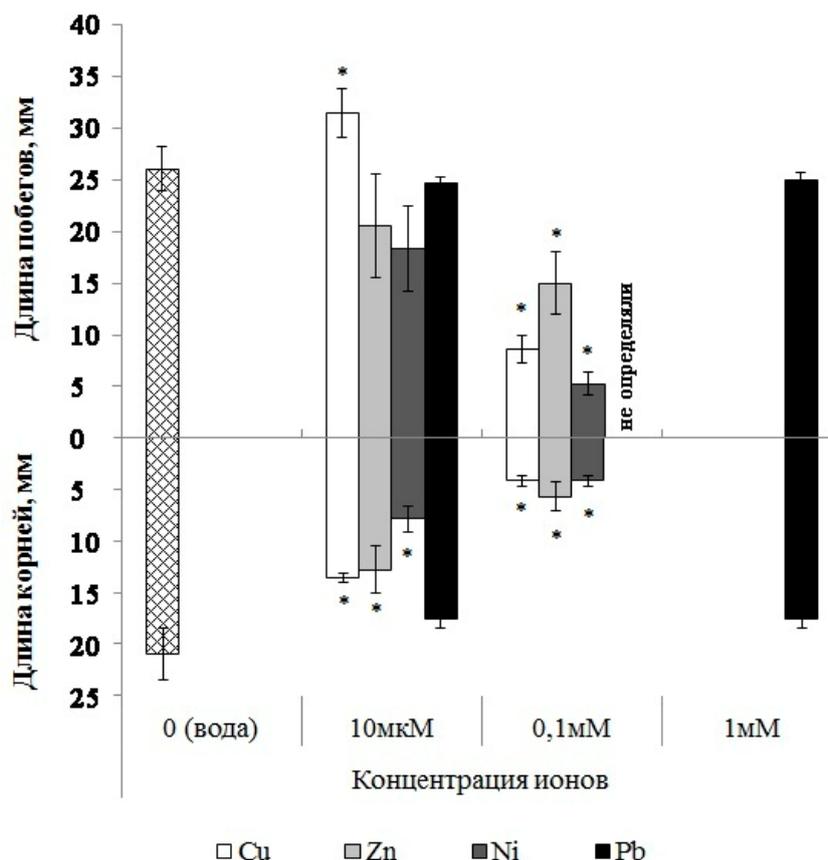


Рис. 1. Влияние эквимольных концентраций тяжелых металлов на рост побегов и корней *Pelargonium zonale* L.

Примечание. * отмечены значения опытных вариантов, существенно отличающихся от водного контроля при $P = 0,05$

При концентрации 10 мкМ ионы Cu^{2+} стимулировали рост побегов. В остальных вариантах существенных различий по действию ТМ на рост побегов не отмечено. Изученные ТМ, за исключением Pb^{2+} , при концентрации 10 мкМ существенно ингибировали рост корней. При концентрации 100 мкМ ингибирование роста побегов и корней ионами Cu^{2+} , Ni^{2+} и Zn^{2+} усилилось. Концентрации 1 мМ изученных ТМ оказались летальными для пеларгонии. Однако ионы Pb^{2+} даже при концентрации 1 мМ не оказывали существенного токсичного действия на рост осевых органов растений.

Результаты корреляционного анализа свидетельствуют о том, что исследованные концентрации ТМ оказывали менее выраженный эффект на рост корней, чем на рост побегов. Наиболее сильно ингибировали рост побегов ионы Ni^{2+} ($r = -0,96$) и Cu^{2+} ($r = -0,95$), а рост корней – ионы Cu^{2+} ($r = -0,93$) и Zn^{2+} ($r = -0,89$), тогда как ионы Pb^{2+} на рост осевых органов оказывали слабое и умеренное влияние ($r = -0,27$ и $-0,50$ для побегов и корней соответственно).

Дальнейшие исследования были сконцентрированы на изучении физиологических эффектов ионов свинца и ЭДТА на молодые растения пеларгонии. В табл. 1 отображено влияние ионов Pb^{2+} и ЭДТА на площадь листовой пластинки.

Как низкие, так и высокие концентрации свинца практически не изменяли площадь листьев пеларгонии. И даже имеется тенденция к увеличению площади листа с повышением концентрации ионов свинца в среде выращивания ($r = 0,80$). Обработка ЭДТА приводила к значительному увеличению листовых пластинок в контроле, однако на фоне ионов Pb^{2+} отмечено резкое ингибирование роста листьев, усиливающееся по мере повышения концентрации свинца в инкубационной среде.

На фоне действия ионов Pb^{2+} длина побегов всегда была на уровне контроля или выше его значений. Изменения длины побегов по сравнению с контролем не зависели от испытанных концентраций и носили, по всей видимости, случайный характер (табл. 1).

Таблица 1. Влияние предобработки семян ЭДТА на рост осевых органов *Pelargonium zonale* на фоне ионов Pb^{2+} , мм

Концентрация Pb^{2+}	Сутки опыта	Побеги		Корни	
		без ЭДТА	с ЭДТА	без ЭДТА	с ЭДТА
0 (вода)	5	8,8 ± 0,6	8,0 ± 0,4	10,1 ± 0,7	10,3 ± 0,9
	8	20,4 ± 0,7	19,8 ± 0,7	13,9 ± 0,8	13,6 ± 0,8
	12	21,9 ± 0,6	22,4 ± 0,6	14,7 ± 0,8	14,4 ± 1,0
10 мкМ	5	8,5 ± 0,6	7,6 ± 0,6	10,7 ± 0,8	13,1 ± 0,9
	8	22,8 ± 0,5	19,3 ± 0,6	17,3 ± 0,8	15,8 ± 0,8
	12	24,6 ± 0,6	22,7 ± 0,6	17,6 ± 0,9	17,4 ± 0,8
1 мМ	5	9,6 ± 0,6	6,2 ± 0,3	11,4 ± 0,7	9,2 ± 0,9
	8	22,2 ± 0,7	21,3 ± 0,7	17,1 ± 0,8	10,9 ± 0,7
	12	25,0 ± 0,6	25,8 ± 0,7	16,6 ± 0,9	12,7 ± 0,8

Обработка ЭДТА существенно не изменяла динамику роста побегов.

На 5-е сутки опыта как низкие (10 мкМ), так и высокие (1 мМ) концентрации ионов Pb^{2+} стимулировали рост корней пеларгонии. Этот эффект усиливался при увеличении времени экспозиции (спустя 8 суток) и сохранялся при хроническом действии ионов Pb^{2+} (на 12-е сутки опыта). Обработка ЭДТА стимулировала рост корня при 10 мкМ Pb^{2+} и негативно сказалась на росте корней на фоне 1 мМ ионов Pb^{2+} .

Для определения устойчивости растений пеларгонии к неблагоприятным факторам среды рассчитывали индекс толерантности (ИТ). О степени адаптации растений свидетельствует как величина ИТ, так и динамика его изменения. Так, на фоне ионов Pb^{2+} ИТ превышал 100 %, что свидетельствует о высокой устойчивости пеларгонии к действию этого металла (рис. 2).

Величина ИТ у необработанных и обработанных ЭДТА растений несущественно менялась с течением времени, что также может свидетельствовать об отсутствии признаков хронического отравления свинцом или ЭДТА. Однако на фоне 1 мМ ионов Pb^{2+} ИТ обработанных ЭДТА растений был ниже 100 %, что говорит о негативном влиянии ЭДТА на металлоустойчивость проростков. Тем более что проростки, обработанные ЭДТА, характеризовались менее развитым ассимиляционным аппаратом. Об этом свидетельствовало сокращение площади листьев (табл. 2). Это особенно опасно на герминальной (предъювенильной) стадии развития, до образования устойчивого ассимиляционного аппарата и перехода растения к самостоятельному питанию.

Таблица 2. Влияние предобработки семян ЭДТА на площадь листа *Pelargonium zonale* на фоне ионов Pb^{2+} , мм²

Вариант опыта	0 (вода)	10 мкМ	1 мМ
Без ЭДТА	13,72 ± 0,81	15,73 ± 0,75	17,07 ± 0,81
ЭДТА	21,67 ± 1,10	12,75 ± 0,45	11,30 ± 0,44

Ростовые параметры являются интегральным показателем стрессового воздействия на растения. Изученные ТМ (за исключением Pb^{2+}) негативно влияли на рост осевых органов пеларгонии. Более сильному ингибированию подвергались побеги, а не корни. Ионы Pb^{2+} не влияли на рост корней и побегов пеларгонии зональной и слабо стимулировали рост

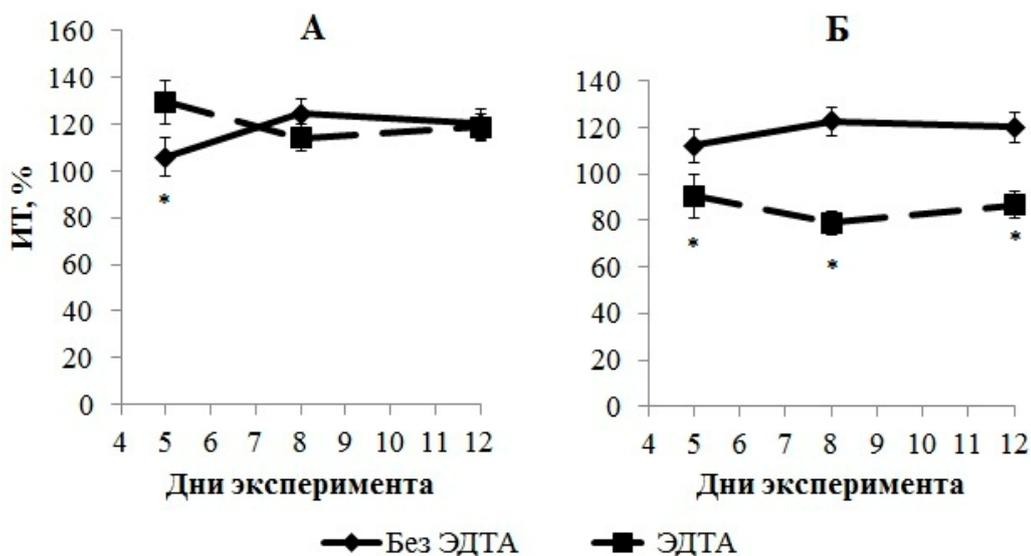


Рис. 2. Индексы толерантности растений *Pelargonium zonale* на фоне ионов Pb^{2+} (А – 10 мкМ, Б – 1 мМ) и предобработки семян ЭДТА.

Примечание. * отмечены значения опытных вариантов, существенно отличающихся от контроля (вариант без ЭДТА) при $P = 0,05$

семядольных листьев. Подобные эффекты являются нетипичными для действия ТМ [Shah et al., 2010]. Можно предположить, что растения герани развили «гипертолерантность» к ионам Pb^{2+} , но не обладают сопутствующей толерантностью к другим металлам, особенно Ni и Cu [Schat, Vooijs, 1997]. У видов-гиперэкстракторов загрузка металлами ксилемы может происходить за счет меньшего секвестрирования металлов в вакуолях корней [Lasat et al., 1998; Heavy Metal Stress..., 2004]. Этим, вероятно, объясняется повышенная токсичность изученных металлов для побегов.

Индукцированная химическими веществами фитоэкстракция рассматривается как двухступенчатый процесс, в котором растения сначала аккумулируют металлы в корнях, а затем усиливается перенос металлов в побеги за счет стимулирующего компонента [Salt et al., 1998]. Этот перенос – следствие нарушения метаболизма, регулирующего транспорт металла в побеги. Токсичность ионов свинца для растений, обработанных ЭДТА, по всей видимости, объясняется нарушением одного из механизмов защиты растения, например, вакуолярной компартментации свинца в физиологически неактивных формах. Вследствие этого ионы свинца накапливаются в растениях в концентрациях, превышающих металлоустойчивость клеток [Xiong Zhi-ting, Lu Ping, 2002; Автухович, 2005].

Совокупность данных по повреждающему действию ТМ в растительном организме можно представить следующей схемой. Когда клетки получают металлы в небольшом избытке, работают механизмы избегания, такие как исключение, секвестрирование или компартментация. Когда избыток металла достигает сублетальных концентраций, то окислительный стресс, запускаемый токсическими металлами, приводит к возрастанию активных форм кислорода; на этой основе далее разрушаются биомолекулы и сильно нарушается метаболизм. Это в конечном счете приводит к ослаблению или остановке роста [Bertrand, Poirier, 2005; Küpper, 2009].

Руководствуясь этой схемой, мы изучили влияние ионов Pb^{2+} и ЭДТА на окислительный статус растений *Pelargonium zonale*. Очевидно, что первичные эффекты ТМ связаны с генерацией АФК, происходящей на уровне клеток и их органелл.

Для оценки уровня окислительного стресса в растениях мы определяли скорость генерации супероксидного анион-радикала – одной из наиболее быстро образующихся в клетках растений АФК [Mittler, 2002; Stancheva et al.,

2010]. В наших опытах выявлено, что ионы Pb^{2+} практически не изменяли стационарный уровень супероксида (табл. 3).

Таблица 3. Влияние предобработки семян ЭДТА на скорость генерации супероксидного анион-радикала в листьях *Pelargonium zonale* на фоне ионов Pb^{2+} , мкМ/г-мин

Вариант опыта	0 (вода)	10 мкМ	1 мМ
Без ЭДТА	0,86 ± 0,04	0,91 ± 0,04	0,95 ± 0,04
ЭДТА	0,79 ± 0,09	1,09 ± 0,03	0,74 ± 0,06

Обработка ЭДТА индуцировала повышение скорости генерации супероксидного анион-радикала на фоне 10 мкМ и снижение до уровня контроля – при 1 мМ ионов Pb^{2+} .

АФК способны реагировать со многими компонентами клеток, включая липиды, белки и нуклеиновые кислоты, приводя к нарушению их структуры и функций [Kehrer, 2000]. При взаимодействии АФК с жирными кислотами образуются пероксиды липидов. Показано, что повышение ПОЛ при стрессе может происходить в результате повышения активности липоксигеназы [Gallego et al., 1996; Weckx, Clijsters, 1997]. Активность этого фермента и сопровождающее ее накопление продуктов ПОЛ в корнях и листьях растений также индуцируется ТМ [Saeidi-Sar et al., 2007].

В качестве индикатора деградации клеточных мембран часто используют содержание малонового диальдегида (МДА). Интенсивность ПОЛ в листьях пеларгонии, оцененная по накоплению МДА, представлена в табл. 4.

Таблица 4. Влияние предобработки семян ЭДТА на концентрацию МДА в листьях *Pelargonium zonale* на фоне ионов Pb^{2+} , мкМ/г

Вариант опыта	0 (вода)	10 мкМ	1 мМ
Без ЭДТА	0,26 ± 0,05	0,29 ± 0,06	0,26 ± 0,06
ЭДТА	0,45 ± 0,09	0,34 ± 0,07	0,36 ± 0,08

Ионы Pb^{2+} не оказывали существенного влияния на концентрацию МДА. Результаты корреляционного анализа свидетельствуют о том, что интенсивность ПОЛ при действии ионов Pb^{2+} не связана со скоростью генерации супероксида в листьях пеларгонии ($r = 0,06$). В варианте с ЭДТА без металла было отмечено резкое повышение концентрации МДА, а в вариантах Pb^{2+} +ЭДТА зарегистрировано несущественное превышение интенсивности ПОЛ по сравнению с вариантами без ЭДТА.

Сверхвысокое накопление ионов ТМ смещает клеточное равновесие в сторону ускорения окисления. Предполагается, что толерантность к тяжелым металлам может быть связана со способностью растений тушить

активные формы кислорода [Лукаткин и др., 2007]. Показано, что после обработки растений ТМ происходила металлозависимая активация низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбиновой кислоты, восстановленного глутатиона, α -токоферола) и ферментов каталазы, АПО, супероксиддисмутазы, глутатион-редуктазы [Башмаков, 2012].

Неоднозначны данные об активности ряда ферментов при действии Pb^{2+} . Так, с повышением концентрации Pb^{2+} активность супероксиддисмутазы (СОД) слегка возрастала или не изменялась, активность каталазы обычно возрастала, пероксидазы — вначале возрастала, затем снижалась [Li-hong et al., 2006]. При исследовании хронического действия свинца на растения показано, что при низких концентрациях ($< 2,5$ мМ/л) ионов Pb активность СОД в клетках постепенно возрастала; при высокой концентрации (>10 мМ/л) активность СОД вначале возрастала, а затем понижалась, с одновременным возрастанием уровня активированных форм кислорода и денатурации антиоксидантных ферментов [Hui-zhong et al., 2006].

При изучении реакций антиоксидантных ферментов на обработку металлами сообщалось об увеличении активности АПО. Б. П. Шоу и Н. П. Роут [Shaw, Rout, 1998] наблюдали металл-специфические (Hg и Cd) различия в реакции фермента у старых проростков *Phaseolus aureus* по сравнению с более молодыми, когда Hg индуцировал активацию фермента, а Cd — нет. Предполагается, что повышенный синтез АПО в ответ на Hg может защищать растение от окислительного стресса, индуцированного металлом.

В наших экспериментах ионы Pb^{2+} не индуцировали активность АПО в листьях пеларгонии (табл. 5). Напротив, высокие (1 мМ) концентрации свинца снижали активность фермента на 33 % по отношению к водному контролю.

Таблица 5. Влияние предобработки семян ЭДТА на активность АПО в листьях *Pelargonium zonale* на фоне ионов Pb^{2+} , мкМ/г-мин

Вариант опыта	0 (вода)	10 мкМ	1 мМ
Без ЭДТА	1,43 ± 0,03	1,43 ± 0,24	0,95 ± 0,04
ЭДТА	0,71 ± 0,17	0,71 ± 0,06	0,48 ± 0,08

Обработка ЭДТА резко снижала активность АПО в листьях растений пеларгонии как по отношению к контролю, так и по отношению к необработанным растениям. Результаты попарного корреляционного анализа также свидетельствуют в пользу того, что при обработке ЭДТА роль АПО в антиоксидантной защите у

растений пеларгонии снижается. Так, в листьях растений, не обработанных ЭДТА, отмечена высокая обратно пропорциональная зависимость активности АПО и скорости генерации супероксида ($r = -0,83$), в то время как в вариантах с ЭДТА зависимость переходит в прямо пропорциональную ($r = 0,61$).

Заключение

Ростовые параметры и индексы толерантности молодых растений *Pelargonium zonale* L. не зависели от концентрации ионов Pb^{2+} и длительности экспозиции, в отличие от воздействия других металлов, резко ингибирующих ростовые параметры с увеличением концентрации ионов в среде выращивания. Ионы Pb^{2+} практически не изменяли окислительный статус молодых растений пеларгонии. Однако при высоких концентрациях Pb^{2+} значительно снижалась активность АПО в листьях изученных растений.

Обработка ЭДТА существенно снижала металлоторантность растений на фоне 1 мМ Pb^{2+} , индуцировала повышенную генерацию супероксидного анион-радикала при 10 мкМ ионов Pb^{2+} и резко ингибировала активность АПО в листьях растений пеларгонии.

Поскольку в целом обнаружены неблагоприятные эффекты ЭДТА на растения пеларгонии, мы не рекомендуем применять предпосевную обработку семян данным препаратом при использовании пеларгонии для фиторемедиации почв, загрязненных свинцом.

Литература

- Автухович И. Е. Роль органических кислот в повышении фитоэкстракции свинца древесными растениями из водного раствора // Лесной вестник МГУЛ. 2005. Вып. 2, № 38. С. 10–12.
- Башмаков Д. И. Экофизиологические аспекты металлотоксичности высших растений. LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012. 309 с.
- Ильин В. Б. Тяжелые металлы в системе почва-растение. Новосибирск: Наука, 1991. 151 с.
- Козаренко А. Е. Свинец в растениях // Свинец в окружающей среде. М.: Наука, 1987. С. 71–76.
- Комнатные растения. Пеларгония. URL: <http://www.florets.ru/komnatnye-rasteniya/pelargoniya/> (дата обращения: 15.06.2012).
- Лебедева О. Ю., Фруммин Г. Т. Распределение валовых форм тяжелых металлов в почвах Костромской области // Среда обитания. URL: http://www.terrahumana.ru/archiv/10_03/10_03_47.pdf (дата обращения: 17.08.2012).
- Лукаткин А. С. Вклад окислительного стресса в развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. 1. Образование активированных форм кислорода при охлаждении растений // Физиология растений. 2002а. Т. 49, № 5. С. 697–702.

Лукаткин А. С. Вклад окислительного стресса в развитие холодого повреждения в листьях теплолюбивых растений. 2. Образование активированных форм кислорода при охлаждении растений // Физиология растений. 2002б. Т. 49, № 6. С. 878–885.

Лукаткин А. С., Голованова В. С. Интенсивность перекисного окисления липидов в охлажденных листьях теплолюбивых растений // Физиология растений. 1988. Т. 35, вып. 4. С. 773–779.

Лукаткин А. С., Грачева Н. В., Гришенкова Н. Н., Духовскис П. В., Бразайтите А. А. Цитокинин-подобные препараты ослабляют повреждения растений кукурузы ионами цинка и никеля // Физиология растений. 2007. Т. 54, № 3. С. 432–439.

Прасад М. Н. В. Растения, аккумулирующие и/или включающие токсичные микроэлементы, и их роль в фиторемедиации // Микроэлементы в окружающей среде: биогеохимия, биотехнология и биоремедиация / Под ред. М. Н. В. Прасада, К. С. Саджвана, Р. Найди; пер. с англ. к. б. н. Д. И. Башмакова и д. б. н. А. С. Лукаткина. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2009. С. 592–620.

Рынок руд и концентратов цветных металлов 2011: алюминий, медь, никель, олово, цинк. URL: <http://www.metalresearch.ru/page144.html> (дата обращения: 15.08.2012)

Физиология растительных организмов и роль металлов / Кожанова О. Н., Дмитриева А. Г., Чернавская Н. М. и др. М.: Изд-во МГУ, 1989. 155 с.

Ягодин Б. А. Применение удобрений и охрана окружающей среды // Агрохимия. М.: Агропромиздат, 1989. С. 626–649.

Baker A. J. M., Brooks R. R. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution // Ecology and Phytochemistry. Biorecovery 1. 1989. P. 81–126.

Bertrand M., Poirier I. Photosynthetic organisms and excess of metals // Photosynthetica. 2005. Vol. 43, N 3. P. 345–353.

Brown S. L., Chaney R. L., Angle J. S., Baker A. M. Zinc and cadmium uptake by hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and metal tolerant *Silene vulgaris* grown on sludge-amended soils // Environ. Sci. Technol. 1995. Vol. 29. P. 1581–1585.

Callender E. Heavy Metals in the Environment – Historical Trends // Treatise on Geochemistry / Ed.: B. Sherwood Lollar; Executive Eds. H. D. Holland and K. K. Turekian, Elsevier. 2003. Vol. 9. P. 67–105.

Chaney R. L., Malik M., Li Y. M., Brown S. L., Brewer E. P., Angle J. S., Baker A. J. Phytoremediation of soil metals // Curr. Opin. Biotechnol. 1997. N 8. P. 279–284.

Gallego S. M., Benavides M. P., Tomaro M. L. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress // Plant Sci. 1996. Vol. 121. P. 151–159.

Heavy Metal Stress in Plants: from Biomolecules to Ecosystems / Ed. M. N. V. Prasad, Heidelberg: Springer-Verlag, 2004. 462 p.

Huang J. W., Cunningham S. D. Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation // New Phytol. 1996. Vol. 134. P. 75–84.

Hui-zhong W., Xin-quan Zh., Cur-ping H. Влияние свинца на активность супероксид дисмутаза в корнях проростков *Agrostis* // Nongye hanjing kexue xuebao= J. Agro-Environ. Sci. 2006. Vol. 25, N 3. P. 644–647.

Jiang W., Liu D. Effects of Pb²⁺ on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays* L. // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2000. Vol. 65, N 6. P. 786–793.

Kehrer J. P. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity // Toxicol. 2000. Vol. 149. P. 43–50.

Koornneeff M., Alonso-Blanco C., Peeters A. J. M. Genetic approaches in plant physiology // New Phytol. 1997. Vol. 137. P. 1–8.

Küpper H. Heavy Metals and Plants – a complicated relationship. URL: http://www.unikonstanz.de/FuF/Bio/kuepper/Homepage/Heavy_Metal_detoxification_PortoAlegre2009.pdf. (дата обращения: 23.04.2010).

Lasat M. M., Baker A. J. M., Kochian L. V. Altered Zn compartmentation in the root symplasm and stimulated Zn absorption into the leaf as mechanisms involved in Zn hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens* // Plant Physiol. 1998. Vol. 118, N 1. P. 675–883.

Li-hong Zh., Xue-mei L., Qiang Ch., Xing-yuan H. Влияние свинца на антиоксидантные ферменты и активность корней сортов кукурузы // Jilin xuebao=J. Jilin Agr. Univ. 2006. Vol. 28, N 2. P. 119–122.

Malcová R., Gryndler M. Amelioration of Pb and Mn toxicity to arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intradices* by maize root exudates // J. Biol. Plantarum. 2003. Vol. 47, N 2. P. 297–299.

McGrath S. P. Phytoextraction for soil reclamation // Plants That Hyperaccumulate Heavy Metals. Their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytomining / Ed. R. R. Brooks, Wallingford, Oxon: CAB International, 1998. 261 p.

McGrath S. P., Zhao F. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils // Curr. Opin. Biotechnol. 2003. Vol. 14, N 1. P. 277–282

Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends in Plant Science. 2002. Vol. 7. Iss. 9, N 1. P. 405–410.

Pierzynski, G. M., Schwab A. P. Bioavailability of zinc, cadmium and lead in metal-contaminated alluvial soil // J. Environ. Qual. 1993. Vol. 22. P. 247.

Prasad M. N. V., Freitas H. Metal-tolerant plants: biodiversity prospecting for phytoremediation technology // Trace elements in the environment: biogeochemistry, biotechnology, and bioremediation / Eds. M. N. V. Prasad, K. S. Sajwan, R. Naidu, Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2006. Chapter 25. P. 483–506.

Rucinska R., Gwozdz E. A. Influence of lead on membrane permeability and lipoxygenase activity in lupine roots // J. Biol. Plantarum. 2005. Vol. 49, N 4. P. 617–619.

Saeidi-Sar S., Khavari-Nejad R. A., Fahimi H., Ghorbanli M., Majd A. Interactive effects of gibberellin A3 and ascorbic acid on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in Glycine max seedlings under nickel stress // Russ. J. Plant Physiol. 2007. Vol. 54. P. 74–79.

Salt D. E., Smith R. D., Raskin I. Phytoremediation // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1998. Vol. 49, N 1. P. 643–668.

Saxena P. K., Krishnaraj S., Dan T., Perms M. R., Vettakkorum-Kankav N. N. Phytoremediation of metal contaminated and polluted soils // Heavy Metal Stress in Plants – from Molecules to Ecosystems / Eds. M. N. V. Prasad, J. Hagemeyer, Heidelberg: Springer-Verlag, 1999. P. 305–329.

Schat H., Vooijs R. Multiple tolerance and co-tolerance to heavy metals in *Silene vulgaris*, a co-segregation analysis // New Phytol. 1997. Vol. 136. P. 489–496.

Shah F. U. R., Ahmad N., Masood K. R., Peralta-Videa J. R. and Ahmad F. U. D. Heavy Metal Toxicity in Plants // Plant Adaptation and Phytoremediation / Eds. M. Ashraf, M. Ozturk, M. S. A. Ahmad, Springer, 2010. 481 p.

Shaw B. P., Rout N. P. Age-dependent responses of *Phaseolus aureus* Roxb. to inorganic salts of mercury and cadmium // Acta Physiol. Plant. 1998. Vol. 20. P. 85–90.

Singh R. P., Dabas S., Choudhary A. Recovery of Pb^{2+} caused inhibition of chlorophyll biosynthesis in leaves of *Vigna radiata* (L.) Wilczek by inorganic salts // Indian J. Exp. Biology. 1996. Vol. 34, N 11. P. 1129–1132.

Stancheva I., Geneva M., Hristozkova M., Markovska Y., Salamon I. Antioxidant capacity of sage grown on heavy metal-polluted soil // Физиология растений. 2010. Т. 57. С. 857–863.

U. S. Geological Survey. Mineral Commodity Summaries // U. S. Geological Survey. 2011. 198 p.

Weckx J. E. J., Clijsters H. M. M. Zn phytotoxicity induces oxidative stress in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* // Plant Physiol Biochem. 1997. Vol. 35. P. 405–410.

Xiong Zhi-ting, Lu Ping. Joint enhancement of lead accumulation in Brassica plants by EDTA and ammonium sulfate in sand culture // J. Environ. Sci. (China), 2002. Vol. 14, N 2. P. 216–220.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Башмаков Дмитрий Идрисович

доцент каф. ботаники и физиологии растений, к. б. н.
ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный
университет им. Н. П. Огарева»
ул. Большевикская, 68, Саранск,
Республика Мордовия, Россия, 430005
эл. почта: dimabashmakov@yandex.ru
тел.: (8342) 322507

Bashmakov, Dmitry

Mordovia, Ogariov State University.
68, Bolshevitskaja St., 430005, Saransk,
Mordovia, Russia
e-mail: dimabashmakov@yandex.ru
tel.: (8342) 322507

Сазанова Кристина Александровна

аспирантка
ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный
университет им. Н. П. Огарева»
ул. Большевикская, 68, Саранск,
Республика Мордовия, Россия, 430005
эл. почта: krissaz@rambler.ru
тел.: (8342) 322507

Sazanova, Kristina

Mordovia, Ogariov State University.
68, Bolshevitskaja St., 430005, Saransk,
Mordovia, Russia
e-mail: krissaz@rambler.ru
tel.: (8342) 322507

Акамова Людмила Петровна

студентка 6 курса
ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный
университет им. Н. П. Огарева»
ул. Большевикская, 68, Саранск,
Республика Мордовия, Россия, 430005
эл. почта: mila@mail2k.ru
тел.: (8342) 322507

Akamova, Lyudmila

Mordovia, Ogariov State University.
68, Bolshevitskaja St., 430005, Saransk,
Mordovia, Russia
e-mail: mila@mail2k.ru
tel.: (8342) 322507

УДК 581.45:582.091:504.5 (470.22) (1-212)

ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В ЛИСТЬЯХ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ НА УРБАНИЗИРОВАННЫХ ТЕРРИТОРИЯХ В УСЛОВИЯХ СЕВЕРА

Л. В. Ветчинникова¹, Т. Ю. Кузнецова¹, А. Ф. Титов²

¹Институт леса Карельского научного центра РАН

²Институт биологии Карельского научного центра РАН

Установлено, что среди представителей лиственных древесных пород (береза, липа, рябина, тополь), наиболее часто используемых для озеленения северных городов, хорошо выраженной способностью к аккумуляции тяжелых металлов обладает береза, для которой характерно накопление самых токсичных элементов – кадмия, свинца и никеля, а также марганца. Кроме того, выявлено, что содержание тяжелых металлов в листьях в течение вегетационного периода не остается постоянным, а возрастает к концу вегетационного сезона, что наиболее четко проявляется у берез, произрастающих на урбанизированных территориях.

Ключевые слова: береза, липа, рябина, тополь, атмосферное загрязнение, тяжелые металлы, сезонные изменения.

L. V. Vetchinnikova, T. Yu. Kuznetsova, A. F. Titov. PATTERNS OF HEAVY METAL ACCUMULATION IN LEAVES OF TREES IN URBAN AREAS IN THE NORTH

Studies have demonstrated that among the deciduous species (birch, lime, rowan, poplar) most commonly used for landscaping northern cities, birch stands out for a high capacity to accumulate heavy metals. It stores the most toxic elements – cadmium, lead and nickel, as well as manganese. We found also that the heavy metal content in the leaves did not remain constant over the growing season, but increased towards its termination. This pattern was the most explicit in the birch trees growing in urban areas.

Key words: birch, lime, rowan, poplar, air pollution, heavy metals, seasonal variations.

Введение

Среди глобальных экологических проблем одно из первых мест, по признанию многих специалистов, занимает загрязнение окружающей среды поллютантами. Они имеют разное происхождение и различную химическую природу, но особое место среди них принадлежит тяжелым металлам, как правило, связанным с антропо-

генной деятельностью, в результате которой в атмосферу попадает более 60 % от их общего количества, а свинца, кадмия, никеля – до 90–99 % [Adriano, 1986; Никонов и др., 2004; Кулагин, Шагиева, 2005 и др.]. Поэтому в последние десятилетия значительное развитие получили работы, направленные на изучение распространения тяжелых металлов в окружающей среде и их аккумуляции растениями [Чернень-

кова, 1986, 2002; Clemens, 2001; Memon et al., 2001; Hall, 2002; Piczak et al., 2003; Rosselli et al., 2003; Титов и др., 2007; Головки и др., 2008; Костюк, 2009 и др.]. В результате установлено, что хотя многие тяжелые металлы и не являются необходимыми для нормальной жизнедеятельности растений химическими элементами, тем не менее могут ими активно поглощаться и долго сохранять токсические свойства, оказывая тем самым длительное негативное действие и последствие на организм. Их прямое влияние на растения начинается с момента контакта и сорбции надземными органами, преимущественно листьями. В условиях городской среды в качестве важного барьера на пути распространения тяжелых металлов могут выступать древесные растения. Их ассимиляционные органы (листья), имеющие широко развитую поверхность обмена с окружающим воздухом, поглощают и осаждают из воздуха наибольшее количество атмосферных примесей [Илькун, 1978], но при этом сами подвергаются повреждениям намного сильнее других органов.

Исходя из вышесказанного, цель данной работы состояла в установлении особенностей накопления тяжелых металлов в листьях основных видов древесных растений, наиболее широко представленных в городской флоре Европейского Севера нашей страны.

Материалы и методы

Исследования проводили на березе повислой (*Betula pendula* Roth), липе сердцевидной (*Tilia cordata* Mill.), рябине обыкновенной (*Sorbus aucuparia* L.) и тополе бальзамическом (*Populus balsamifera* L.). Отбор листьев для анализа осуществляли с деревьев, произрастающих в г. Петрозаводске (Республика Карелия, 62° с. ш., 34° в. д.) на территории Губернаторского парка (памятник ландшафтной архитектуры), расположенного в центре города.

Характер накопления тяжелых металлов в летний и осенний периоды изучали в листьях березы повислой (*Betula pendula* Roth) и березы пушистой (*Betula pubescens* Ehrh.), растущих в природных условиях (Ботанический сад Петрозаводского государственного университета, расположенный примерно в 10 км от г. Петрозаводска и отделенный от него акваторией Онежского озера) и на территории города. Для сравнения в Петрозаводске были выбраны наиболее загрязненные улицы его центральной части (ул. Анохина и пр. Первомайский) [Гос. доклад..., 2007]. Отбор образцов проводили в период полного развития листовой пластинки (июль) и в начале ее пожелтения (сентябрь).

Концентрацию тяжелых металлов (кадмий, свинец, никель, медь, цинк, железо, марганец) определяли методом атомно-абсорбционной спектrophотометрии на атомно-абсорбционном спектрофотометре AA-6800 (Shimadzu, Япония).

Математическую обработку данных осуществляли с помощью общепринятых методов вариационной статистики с использованием пакета программ Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что концентрация кадмия в листьях древесных растений (береза, липа, рябина и тополь), произрастающих в парковой зоне в центре г. Петрозаводска, колеблется от 0,01 до 0,54 мг/кг, свинца – от 0,5 до 5,4 мг/кг, никеля – от 0,01 до 1,9 мг/кг, меди от 10,1 до 35,2 мг/кг, цинка – от 25,6 до 85,4 мг/кг, железа – от 350 до 720 мг/кг, марганца – 103 до 652 мг/кг сухого вещества. В целом эти значения не достигают предельно допустимых величин для жизнедеятельности растений [Минеев, 1988; Кабата-Пендиас, Пендиас, 1989].

Следует при этом отметить, что локальные источники тяжелых металлов в исследуемом районе отсутствуют, поэтому основное их поступление, очевидно, происходило за счет атмосферных выпадений. Выявленные различия соответствуют сложившемуся мнению [Тарчевский, 1964; Тарабрин, 1982 и др.] о том, что избирательная способность и интенсивность поглощения металлов ассимилирующими органами древесных растений из воздуха определяются свойствами самих растений (характер архитектуры кроны и положения в ней листьев, размер и форма листовых пластинок, густота волосяного покрова листовой поверхности, степень покрытия листьев воском), характером загрязнений (размер и концентрация частиц) и условиями окружающей среды (температура воздуха, уровень освещенности, относительная влажность воздуха и др.).

Наиболее заметные различия между изученными видами установлены нами по накоплению кадмия, свинца и никеля (рис. 1: А–В). Так, содержание кадмия в листьях березы было в 2 раза выше по сравнению с тополем и почти в 7 раз – по сравнению с рябиной и липой (рис. 1: А). Концентрация свинца и никеля в листьях березы также была значительно выше по сравнению с другими изученными породами (рис. 1: Б, В). По уровню содержания кадмия растения распределялись следующим образом: береза > тополь > рябина > липа; свин-

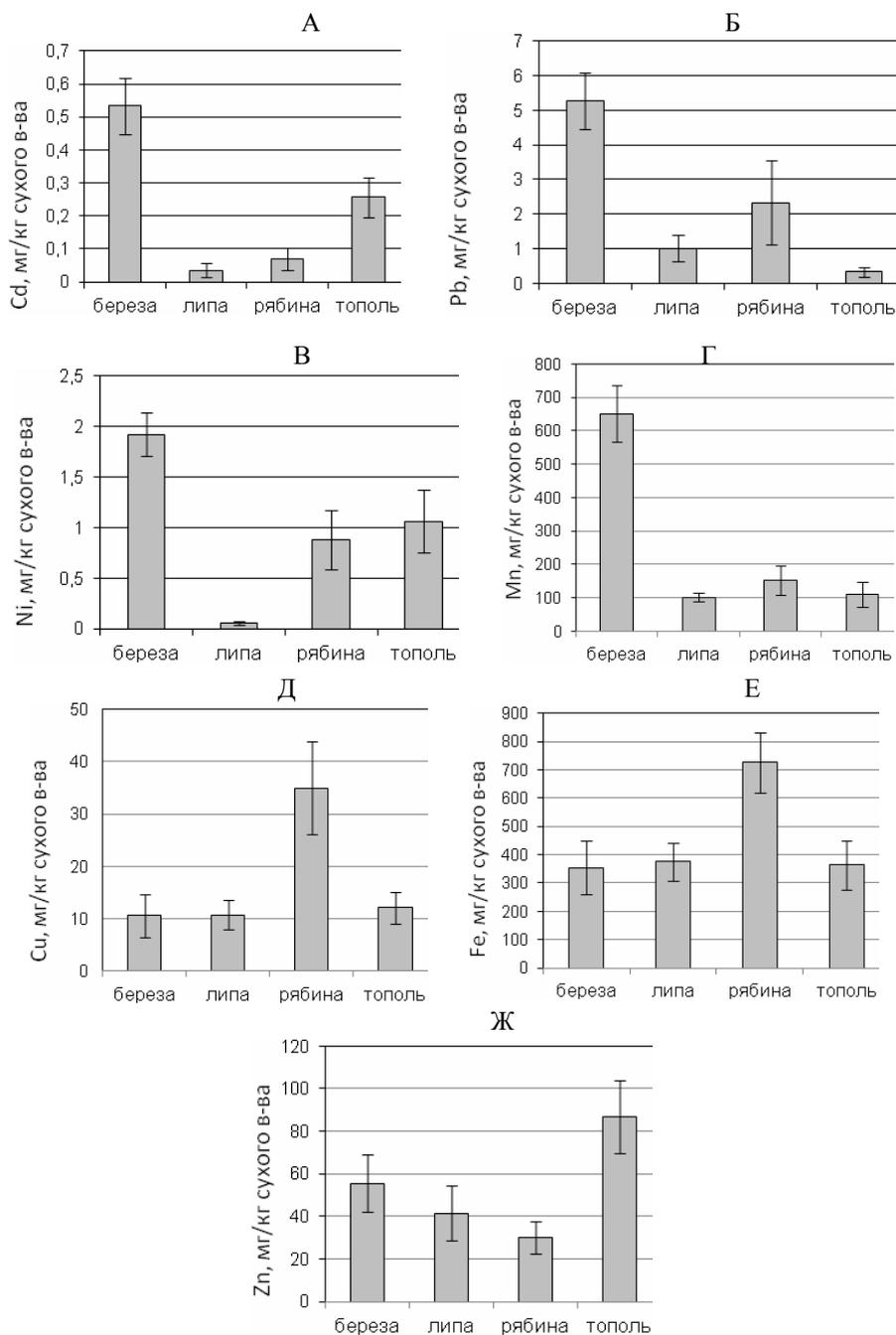


Рис. 1. Содержание кадмия (А), свинца (Б), никеля (В), марганца (Г), меди (Д), железа (Е) и цинка (Ж) (в мг/г сухого вещества) в листьях древесных растений, произрастающих в парковой зоне г. Петрозаводска

ца: береза > рябина > липа > тополь; *никеля*: береза > тополь > рябина > липа. В целом повышенные концентрации наиболее токсичных металлов зафиксированы в листьях березы.

Кроме того, в листьях березы обнаружено преимущественное накопление марганца (650 мг/кг сухого вещества), тогда как у других видов его содержание было в несколько раз ниже и варьировало в диапазоне от 100 до 120 мг/кг сухого вещества (рис. 1: Г). Об-

щий ряд по содержанию *марганца* выглядел следующим образом: береза > рябина > тополь > липа.

Иная картина отмечена нами при изучении характера накопления в листьях древесных растений меди, железа и цинка. В частности, содержание меди (рис. 1: Д) преобладало в листьях рябины (до 35 мг/кг сухого вещества). У других же видов ее количество в листьях было значительно ниже.

Наибольшая концентрация железа (около 720 мг/кг сухого вещества) обнаружена в листьях рябины (рис. 1: Е). У других видов его количество было вдвое меньше, варьируя в диапазоне от 350 до 380 мг/кг сухого вещества.

Преимущественное накопление цинка обнаружено в листьях тополя (85 мг/кг сухого вещества), а наименьшее – в листьях рябины (26 мг/кг). Общий убывающий ряд по содержанию цинка выглядит так: тополь > береза > липа > рябина (рис. 1: Ж). Аналогичные данные о преобладании цинка в листьях разных видов рода *Populus* получены также Н. В. Прохоровой с соавт. [1998] в условиях лесостепного и степного Поволжья и Л. В. Копыловой [2012] в условиях Забайкалья.

Полученные нами результаты позволили выявить наличие определенных видовых особенностей у древесных растений по накоплению тяжелых металлов в листьях. Так, наибольшей аккумулярующей способностью в отношении тяжелых металлов обладают листья березы, наименьшей – листья липы. Для листьев березы характерно повышенное поглощение наиболее токсичных тяжелых металлов – кадмия, свинца и никеля, а также

марганца. Листья тополя концентрируют преимущественно цинк и могут накапливать кадмий и никель. Для листьев рябины установлено преимущественное содержание меди и железа, отмечена также способность к поглощению свинца.

На основании проведенных исследований также установлено, что содержание тяжелых металлов в листьях берез в течение вегетационного периода не остается постоянным, а определенным образом изменяется. В частности, наиболее заметные различия обнаружены по накоплению меди (рис. 2: А), цинка (рис. 2: Б), железа (рис. 2: В) и марганца, концентрации которых к концу вегетационного сезона увеличились. Наибольшее накопление этих металлов к осени наблюдалось в листьях берез, произрастающих в городских условиях (более чем в 2 раза). Например, содержание меди в листьях березы возросло с 8,3 мг/кг (в летний период) до 14,9 мг/кг (осенью) сухого вещества. У березы, произрастающей в условиях ботанического сада, концентрации меди и цинка в листьях увеличились к осени на 25 %, а содержание железа и марганца практически не изменялось.

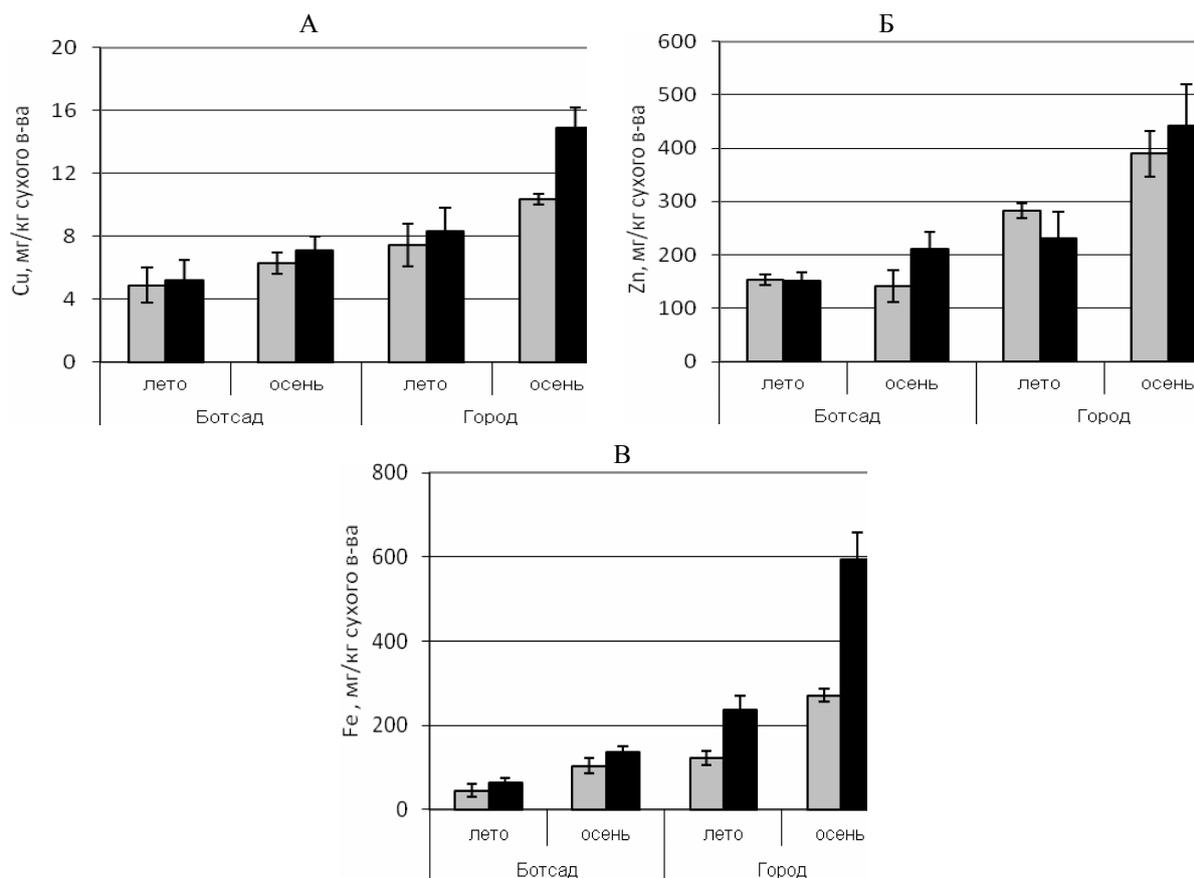


Рис. 2. Содержание меди (А), цинка (Б) и железа (В) в листьях берез, произрастающих в природных (Ботанический сад) и городских условиях (г. Петрозаводск), в летний и осенний периоды:

■ Береза повислая ■ Береза пушистая

Содержание наиболее токсичных тяжелых металлов, таких как кадмий, свинец и никель, в листьях березы в период вегетации оказалось относительно стабильным. В частности, концентрация свинца в листьях изученных берез летом достигала 3,1 мг/кг, а осенью – 3,5 мг/кг сухого вещества (рис. 3: Б). Концентрация никеля в течение вегетационного сезона также изменялась незначительно: от 3,0 до 4,2 мг/кг сухого вещества.

Содержание кадмия (рис. 3: А) у изученных берез в период вегетации колебалось от 0,72 до 1,12 мг/кг сухого вещества. По сводным данным, представленным в работе Кабата-Пендиас, Пендиас [1989], фоновое содержание этого металла в надземной части растений составляет 0,05–0,6 мг/кг, а токсичное – 1,0–70,0 мг/кг сухого вещества. Это означает, что в период наших исследований концентрация кадмия в листьях березы несколько превышала нижнюю границу диапазона, который считается токсичным. Согласно литературным данным, кадмий в основном поглощается корневой системой и в меньшей степени надземными органами. По мнению А. А. Лурье с соавт. [1995], механизмы, препятствующие транспорту тяжелых металлов в надземную часть и репродуктивные органы, особенно активно действуют в отношении кадмия и в меньшей степени – цинка. Для кадмия эти механизмы проявляются при любой его концентрации в почве, а для цинка – только при концентрациях, значительно превышающих фоновые. Вероятно, этим хотя бы отчасти можно объяснить довольно стабильные показатели, зафиксированные нами при изучении содержания кадмия в листьях березы в зависимости от места произрастания и периода вегетации.

Сопоставление полученных данных также свидетельствует о существовании определенных различий у видов берез по накоплению тяжелых металлов в листьях: у березы пушистой содержание почти всех изученных нами элементов (за исключением никеля) в городских условиях было всегда выше, чем у березы повислой.

Следовательно, содержание тяжелых металлов в ассимилирующих органах (листьях) березы в течение вегетационного периода не остается постоянным, а возрастает к концу вегетации, что наиболее четко проявляется у берез, произрастающих в городских условиях. Значительных изменений в концентрации кадмия, свинца и никеля в течение вегетационного периода не обнаружено. Вместе с тем в листьях березы отмечено небольшое превышение нижних пределов пороговой концентрации по кадмию. Установлено также, что ткани листьев березы обладают определенной избирательной способностью к накоплению тяжелых металлов, зависящей от видовой принадлежности.

Таким образом, среди представителей лиственных древесных пород (береза, липа, рябина, тополь), наиболее часто используемых для озеленения северных городов, отчетливо выраженной способностью к аккумуляции тяжелых металлов обладает береза, для которой характерно накопление самых токсичных тяжелых металлов – кадмия, свинца и никеля, а также марганца. Для рябины характерно поглощение значительных количеств меди и железа. В листьях тополя концентрируется преимущественно цинк и кадмий. Несмотря на то что береза выступает видом-накопителем тяжелых металлов, в условиях значительной антропогенной (или техногенной) нагрузки с целью максимального извлечения из биогеохимического

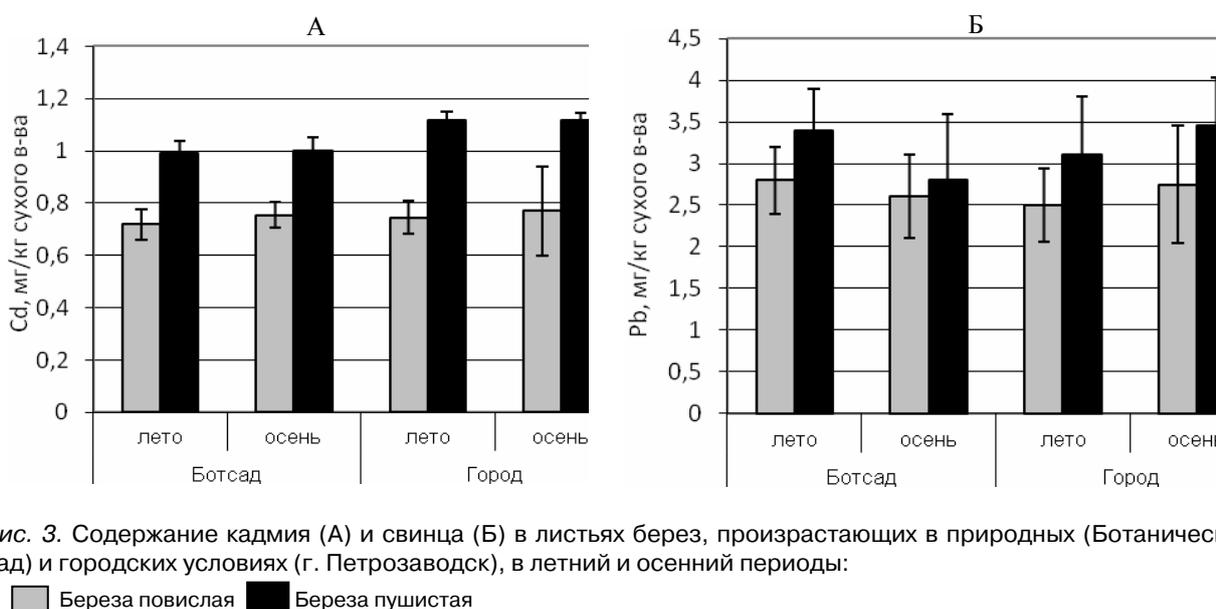


Рис. 3. Содержание кадмия (А) и свинца (Б) в листьях берез, произрастающих в природных (Ботанический сад) и городских условиях (г. Петрозаводск), в летний и осенний периоды:

■ Береза повислая ■ Береза пушистая

круговорота тяжелых металлов целесообразно создание искусственных посадок со смешанным видовым составом древесных растений.

Литература

Головки Т. К., Гармаш Е. В., Скугорева С. Г. Тяжелые металлы в окружающей среде и растительных организмах // Вестник ИБ Коми НЦ УрО РАН. 2008. № 7. С. 2–7.

Государственный доклад о состоянии окружающей среды Республики Карелия в 2006 году / Мин-во сельск., рыбн. хоз-ва и экологии Респ. Карелия; сост. А. Н. Громцев, О. Л. Кузнецов. Петрозаводск: ГУ РК «Издательский Дом «Карелия», 2007. 308 с.

Илькун Г. М. Загрязнители атмосферы и растения. Киев: Наукова думка, 1978. 246 с.

Кабата-Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях. М.: Мир, 1989. 439 с.

Копылова Л. В. Накопление тяжелых металлов в древесных растениях на урбанизированных территориях Восточного Забайкалья: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Улан-Удэ, 2012. 24 с.

Костюк В. И. Устойчивость овса к тяжелым металлам. Апатиты: Изд-во Кольского научного центра РАН, 2009. 117 с.

Кулагин А. А., Шагиева Ю. А. Древесные растения и биологическая консервация промышленных загрязнителей. М.: Наука, 2005. 190 с.

Лурье А. А., Фокин А. Д., Касатиков В. А. Поступление цинка и кадмия в зерновые культуры из почвы, удобренной остатками сточных вод // Агрохимия. № 11, 1995. С. 80–92.

Минеев В. Г. Экологические проблемы агрохимии. Москва: МГУ, 1988. 199 с.

Никонов В. В., Лукина Н. В., Безель В. С. и др. Рассеянные элементы в бореальных лесах / Отв. ред. А. С. Исаев. М.: Наука, 2004. 616 с.

Прохорова Н. В., Матвеев Н. М., Павловский В. А. Аккумуляция тяжелых металлов дикорастущими и культурными растениями в лесостепном и степном Поволжье. Самара: Самар. ун-т, 1998. 97 с.

Тарабрин В. П. Устойчивость древесных растений в условиях промышленного загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами // Взаимодействие между лесными экосистемами и загрязнителями. Таллин, 1982. С. 24–27.

Тарчевский В. В. Влияние дымогазовых выделений промышленных предприятий Урала на растительность // Растения и промышленная среда. Свердловск: Изд-во Урал. ун-та, 1964. С. 5–71.

Титов А. Ф., Таланова В. В., Казнина Н. М., Лайдинен Г. Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2007. 172 с.

Черненко Т. В. Изучение березняков разнотравных в окрестностях металлургических комбинатов // Экология. 1986. № 6. С. 65–67.

Черненко Т. В. Реакция лесной растительности на промышленное загрязнение. М.: Наука, 2002. 191 с.

Adriano D. C. Trace Elements in the Terrestrial Environment. Springer Verlag. New York. 1986. 533 pp.

Clemens S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis // Planta. 2001. Vol. 212. P. 475–486.

Hall J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance // Journal of Experimental Botany. 2002. Vol. 53, N 366. P. 1–11.

Memon A. R., Aktoprakligil D., Ozdemir A., Vertii A. Heavy Metal Accumulation and Detoxification Mechanisms in Plants // Turk. J. Bot. 2001. Vol. 25. P. 111–121.

Piczak K., Sniewicz A., Zyrnicki W. Metal concentrations in deciduous tree leaves from urban areas in Poland // Environmental Monitoring and Assessment. 2003. Vol. 86. P. 273–287.

Rosselli W., Keller C., Boschi K. Phytoextraction capacity of trees growing on a metal contaminated soil // Plant and Soil. 2003. Vol. 256. P. 265–272.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Ветчинникова Лидия Васильевна

рук. группы биотехнологии воспроизводства древесных растений, ведущий научный сотрудник, д. б. н. Институт леса Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910 эл. почта: vetchin@krc.karelia.ru тел.: (8142) 768160

Кузнецова Татьяна Юрьевна

Институт леса Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910 эл. почта: vetchin@krc.karelia.ru тел.: (8142) 768160

Титов Александр Федорович

председатель КарНЦ РАН, чл.-корр. РАН, д. б. н., проф. руководитель лаб. экологической физиологии растений, Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910 эл. почта: titov@krc.karelia.ru тел.: (8142) 769710

Vetchinnikova, Lidiya

Forest Research Institute, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences 11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia e-mail: vetchin@krc.karelia.ru tel.: (8142) 768160

Kuznetsova, Tatiana

Forest Research Institute, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences 11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia e-mail: vetchin@krc.karelia.ru tel.: (8142) 768160

Titov, Alexandr

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences 11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia e-mail: titov@krc.karelia.ru tel.: (8142) 769710

УДК 577.115.3:582.632.1

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ЛИПИДОВ И ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ОТДЕЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ В ЖЕНСКИХ СЕРЕЖКАХ БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ (*BETULA PENDULA* ROTH)

Л. В. Ветчинникова, О. С. Серебрякова, М. К. Ильинова

Институт леса Карельского научного центра РАН

Впервые исследован жирнокислотный состав отдельных фракций липидов женских сережек *Betula pendula* Roth в соответствии с фазами их весенне-летнего развития. Установлено, что до опыления в пестичных цветках нейтральные липиды превышали содержание фосфо- и гликолипидов почти в два раза, при этом во всех фракциях отмечали накопление насыщенных жирных кислот. После оплодотворения активизация метаболических процессов в женских сережках березы повислой сопровождалась увеличением фосфо- и гликолипидов на фоне повышения доли ненасыщенных жирных кислот, преимущественно за счет моно- и/или диеновых.

Ключевые слова: *Betula pendula* Roth, женские сережки, нейтральные липиды, гликолипиды, фосфолипиды, жирные кислоты.

L. V. Vetchinnikova, O. S. Serebryakova, M. K. Ilyinova. DYNAMICS OF THE LIPID CONTENT AND THE FATTY ACID COMPOSITION OF SOME LIPID FRACTIONS IN FEMALE CATKINS OF *BETULA PENDULA* ROTH

The fatty acid composition of some lipid fractions in female catkins of *Betula pendula* Roth was studied for the first time by the phases of their spring and summer development. We found that pistillate flowers prior to pollination contained nearly twice more neutral lipids than phospho- and glycolipids, and accumulation of saturated fatty acids was observed in all other fractions. The activation of metabolic processes in female catkins following pollination was accompanied by a rise in phospho- and glycolipids simultaneously with an increase in the proportion of unsaturated fatty acids, mainly owing to mono- and/or diene acids.

Key words: *Betula pendula* Roth, female catkins, neutral lipids, glycolipids, phospholipids, fatty acids.

Введение

Важным этапом развития растительного организма является переход от вегетативного роста к формированию репродуктивной сферы, от которой во многом зависит устойчивость видов во времени, их выживание, поддержание численности, сохранение и расширение ареалов

[Юсуфов, 1972]. Несмотря на то что цветок является наиболее уязвимым органом для воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды, многими авторами показано, что способность к заложению генеративных органов у травянистых растений, имеющих сельскохозяйственное значение, возникает только при участии пониженных температур (яровизация) на фоне

определенного фотопериода (фотопериодизм) [Полевой, 1989; Кузнецов, Дмитриева, 2006].

Как известно, в процессе формирования генеративных органов происходит усиленный синтез нуклеиновых кислот, изменяется гормональный статус, а также состав синтезируемых белков, повышается активность ферментов и т. п. [Peoples et al., 1985; Schaffer, Petreikov, 1997; Bonome et al., 2011; Famiani, 2012 и др.]. Гораздо хуже изучены метаболические изменения в липидном обмене, хотя многократно показано, что у высших растений устойчивость к неблагоприятным факторам среды обеспечивается наличием полиненасыщенных жирных кислот в структуре мембранных липидов [Родионов, 1983; Войников, 2011 и др.]. Однако в отношении репродуктивных органов растений, особенно древесных, подобного рода данные практически отсутствуют.

В связи с этим целью нашей работы явилось изучение динамики жирнокислотного состава различных фракций липидов, содержащихся в женских сережках *Betula pendula* Roth в разные фазы их весенне-летнего развития в условиях южной части Республики Карелия.

Материалы и методы

Основными объектами изучения были 30–40-летние деревья березы повислой *Betula pendula* Roth, произрастающие на экспериментальных участках, расположенных в зеленой зоне г. Петрозаводска (61° 79' с. ш., 34° 35' в. д.). Материалом для исследования служили женские сережки, сбор которых проводили в соответствии с фазами их развития [Корчагина, 1973; Кайгородова, 1975; Каледя, 1982, 1985; Полевой, 1989] в весенне-летний период (с мая по июль): I фаза – рецептивный период пестичных цветков, II фаза – опыление, оплодотворение и рост зародыша за счет деления клеток, III – рост зародыша за счет растяжения клеток, IV – созревание семян.

Экстракцию липидов из тканей осуществляли смесью хлороформа и метанола в соотношении 2:1 по объему [Folch et al., 1957]. Суммарное количество липидов определяли весовым методом, а разделение на фракции – методом колоночной хроматографии с использованием силикагеля (размер зерен – 75–150 мк, Sigma). В качестве колонки служили стеклянные пипетки Пастера, предназначенные для капельного дозирования. Фракции липидов извлекали последовательно следующими растворителями: нейтральные липиды – хлороформом, гликолипиды – ацетоном, фосфолипиды – метанолом. Метилловые эфиры жирных

кислот (ЖК) получали путем переэтерификации липидов метанолом в присутствии ацетилхлорида и анализировали на газо-жидкостном хроматографе «Хроматэк – Кристалл 5000 М.1» (Йошкар-Ола, Россия) с использованием капиллярной колонки HP-INNOWAX (30 м x 0,32 мм) при температурах: термостата – 180 °С (изотерма), пламенно-ионизационного детектора – 240 °С, испарителя – 220 °С и скорости газа-носителя (азот) 50 мл/мин. Идентификацию жирных кислот осуществляли с помощью стандартного набора метилловых эфиров жирных кислот (Supelko, 37 компонентов), а также сопоставлением эквивалентной длины цепи экспериментально полученных компонентов с известными данными и логарифмических индексов. Вычисляли содержание индивидуальных жирных кислот, а также их групп, объединенных по числу двойных связей в углеродной цепочке: моноеновые (М), диеновые (Д), триеновые (Тр) и насыщенные (Н). Количественное определение жирных кислот проводили методом внутреннего стандарта (маргариновая кислота). Коэффициент ненасыщенности (К) жирных кислот определяли как отношение суммы ненасыщенных кислот к сумме насыщенных. Индекс двойной связи (ИДС), характеризующий степень ненасыщенности липидов, рассчитывали по методу Лайонса и др. [Lyons et al., 1964]: $ИДС = (М + 2xD + 3xТр) / 100$.

Математическую обработку данных осуществляли общепринятыми методами статистики с использованием пакета программ Microsoft Excel [Ивантер, Коросов, 2003]. В таблицах и рисунках приведены средние арифметические значения трех и более независимых экспериментов и их стандартные ошибки. Разницу средних величин оценивали по t-критерию Стьюдента и вероятности, которую признавали статистически значимой при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты исследований показали, что в женских сережках березы повислой содержалось значительное количество суммарных липидов, однако их величина менялась в соответствии с фазой развития растений (табл. 1). Наименьшая концентрация суммарных липидов была обнаружена в рецептивный период пестичных цветков (фаза I) и соответствовала по значениям зрелым листовым пластинкам, которые были объектом нашего изучения в предыдущие годы [Шуляковская и др., 2004]. После оплодотворения (фаза II) к началу роста зародыша (фаза III) количество суммарных липидов увеличивалось. По всей вероятности,

женские сережки в этот период выступали доминирующим центром, аттрагирующее действие которого резко возрастало в связи с развитием зародыша [Полевой, 1989]. Одновременно с притоком ассимилятов происходило использование липидов на построение новых тканей и органов, о чем свидетельствовало некоторое понижение концентрации суммарных липидов в период созревании семян (фаза IV).

Таблица 1. Содержание суммарных липидов (мг/г сухого вещества) в женских сережках березы повислой в весенне-летний период развития

Фаза развития женской сережки	Содержание суммарных липидов
I – рецептивное состояние пестичных цветков	126 ± 3,5
II – опыление, оплодотворение и рост зародыша за счет деления клеток	134 ± 5,8
III – рост зародыша за счет растяжения клеток	214 ± 2,3
IV – созревание семян	194 ± 8,1

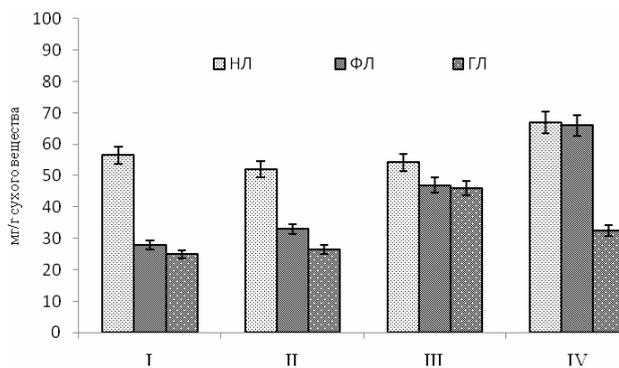


Рис. 1. Динамика содержания нейтральных (НЛ), фосфо- (ФЛ) и гликолипидов (ГЛ) в женских сережках березы повислой в весенне-летний период развития

По горизонтали – фазы развития женских сережек березы: I фаза – рецептивный период пестичных цветков, II фаза – оплодотворение и рост зародыша за счет деления клеток, III – рост зародыша за счет растяжения клеток, IV – созревание семян

По составу суммарные липиды женских сережек березы повислой были представлены как нейтральными (НЛ), так и полярными – фосфо- (ФЛ) и гликолипидами (ГЛ). Сравнительный анализ показал, что практически во все изученные фазы развития содержание нейтральных липидов было выше по сравнению с фосфо- и гликолипидами (рис. 1). Наибольшие различия наблюдали в фазу рецептивного состояния пестичных цветков (фаза I), когда нейтральные липиды превышали как фосфо-, так и гликолипиды почти в два раза. После оплодотворения обнаружено устойчивое увеличение количества полярных липидов, что, вероятно, объясняется быстрым ростом

тканей и активацией образования мембран новых клеточных структур зародыша (рис. 1: фаза III). Содержание фосфолипидов и гликолипидов по значениям почти совпадало, однако к фазе созревания семян (рис. 1: фаза IV) синтез фосфолипидов значительно усилился и их величина сравнялась с нейтральными липидами, превысив значения гликолипидов в два раза.

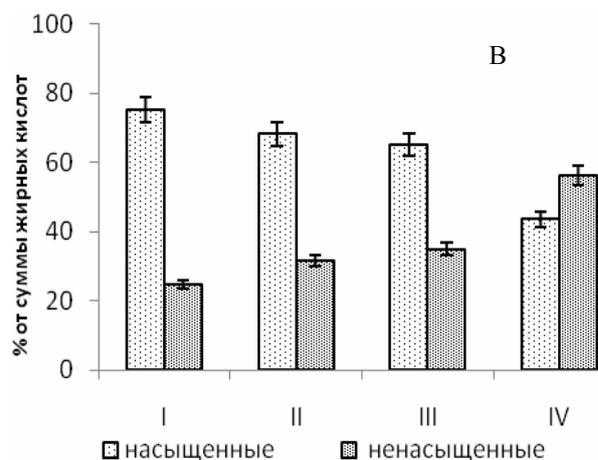
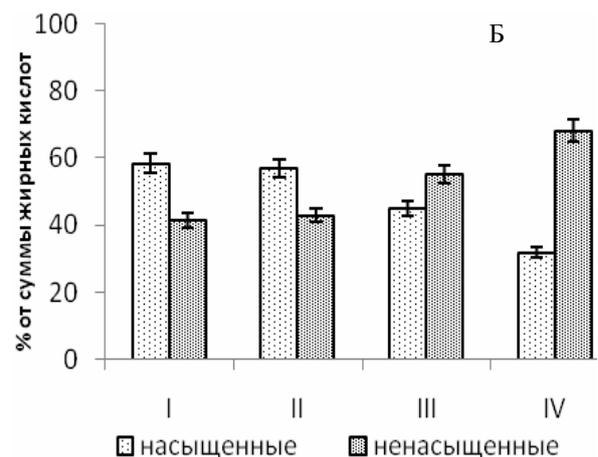
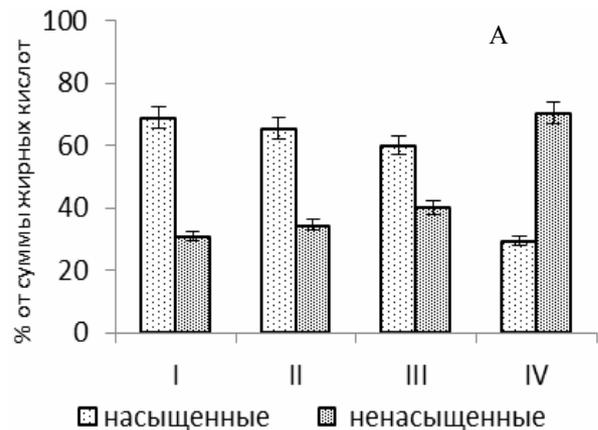


Рис. 2. Динамика содержания насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в нейтральных (А), фосфо- (Б) и гликолипидах (В) женских сережек березы повислой в весенне-летний период развития

На основании полученных данных было показано, что в период подготовки пестичных цветков к оплодотворению во всех фракциях липидов насыщенные жирные кислоты преобладали над ненасыщенными (рис. 2: А, Б, В, фаза I). Особенно заметно это проявилось во фракции гликолипидов, в которых доля насыщенных жирных кислот составляла 75 % и в три раза превышала сумму ненасыщенных (рис. 2: В, фаза I). Отсюда следует, что до наступления периода оплодотворения в пестичных цветках березы происходило накопление насыщенных жирных кислот. По всей вероятности, это связано с тем, что пестичные цветки, как и пыльца [Ветчинникова и др., 2012], к моменту оплодотворения имеют низкую физиологическую активность. В дальнейшем, после попадания пыльцы на рыльце пестика, насыщенные жирные кислоты, по всей вероятности, выполняют субстратную и/или энергетическую роль, а также участвуют в синтезе веществ, обеспечивающих процессы оплодотворения и дальнейшего формирования зиготы [Heslop-Harrison, 1982; Кузнецов, Дмитриева, 2006].

Согласно нашим данным, после оплодотворения с формированием зародыша в женских сережках березы повислой во всех фракциях липидов происходила активизация метаболических процессов, которая сопровождалась значительным увеличением уровня ненасыщенных жирных кислот (рис. 2: А, Б, В, фаза IV). Особенно заметно это проявилось в нейтральных и фосфолипидах, где их доля превысила сумму насыщенных жирных кислот более чем в два раза (рис. 2: А, Б, фаза IV).

Коэффициент ненасыщенности липидов (К) у березы повислой в пестичных цветках (фаза I) в целом варьировал от 0,33 (в гликолипидах) до 0,71 (в фосфолипидах) (табл. 2). В дальнейшем жирнокислотный состав значительно изменился, и к периоду созревания семян во всех фракциях липидов значения К увеличились не менее чем в три раза и достигли максимальных величин (около 2,4) в нейтральной фракции (табл. 2: фаза IV).

Таблица 2. Коэффициент ненасыщенности (К) и индекс двойной связи (ИДС) отдельных фракций липидов в женских сережках

Фаза развития	К			ИДС		
	НЛ	ФЛ	ГЛ	НЛ	ФЛ	ГЛ
I – рецептивное состояние пестичных цветков	0,45	0,71	0,33	0,57	0,73	0,37
II – опыление, оплодотворение и рост зародыша за счет деления клеток	0,46	0,76	0,46	0,57	0,77	0,55
III – рост зародыша за счет растяжения клеток	0,68	1,25	0,54	0,73	0,95	0,56
IV – созревание семян	2,37	2,15	1,29	1,29	1,2	1,01

Наиболее полно степень ненасыщенности липидов и уровень изменения метаболизма жирнокислотного состава генеративных органов на разных стадиях развития характеризует индекс двойных связей (ИДС), поскольку он отражает не только сумму ненасыщенных жирных кислот, но и число двойных связей. В связи с этим величина ИДС не всегда совпадает со значениями коэффициента ненасыщенности. Например, в женских сережках по мере роста и развития зародыша (фазы I–III) во всех фракциях значения ИДС оказались несколько выше по сравнению с величиной К (табл. 2), однако к периоду созревания семян наблюдалась обратная картина: уровень К был почти в два раза выше по сравнению с ИДС. По всей вероятности, это связано как с физиологическими особенностями развития генеративных органов, так и с механизмами адаптации меристематических тканей цветков к действию отрицательных или низких положительных температур, которые часто наблюдаются в Карелии в весенне-летний период.

Анализ жирнокислотного состава отдельных фракций липидов женских сережек березы повислой показал следующее (табл. 3). Основным уровнем насыщенных жирных кислот во всех фракциях определяла пальмитиновая кислота $C_{16:0}$. Максимальное ее количество наблюдали во фракции фосфолипидов. В нейтральных и гликолипидах состав насыщенных жирных кислот был разнообразнее: кроме пальмитиновой почти 40 % в сумме составили стеариновая $C_{18:0}$, арахидиновая $C_{20:0}$ и бегеновая $C_{22:0}$ жирные кислоты (табл. 3).

Таблица 3. Концентрация насыщенных жирных кислот (средние данные по всем фазам) по фракциям в женских сережках березы повислой (в % от их суммы)

Жирные кислоты	Фракции липидов		
	НЛ	ФЛ	ГЛ
16:0	57,1 ± 5,2	88,2 ± 5,9	63,7 ± 6,0
18:0	12,1 ± 0,6	6,9 ± 0,2	11,3 ± 0,7
20:0	17,9 ± 1,8	1,9 ± 0,1	12,2 ± 1,1
22:0	12,9 ± 1,5	2,9 ± 0,3	12,9 ± 0,8

Примечание. 16:0 – пальмитиновая, 18:0 – стеариновая, 20:0 – арахидиновая, 22:0 – бегеновая

Существенные различия между фракциями липидов женских сережек выявлены в соотношении моно-, ди- и триеновых жирных кислот (рис. 3: А, Б, В). Так, в нейтральных липидах на всех этапах развития женских сережек доминирующими группами среди ненасыщенных жирных кислот были диеновые (от 60 до 80 % от суммы ЖК) (рис. 3: А). Триеновые жирные кислоты (до 11 %) были зафиксированы в пестичных цветках (до опыления) и на ранних этапах формирования зародыша, т. е. в период наиболее низких положительных (или отрица-

тельных) температур в весенний период. Моноеновые в нейтральных липидах равномерно присутствовали (около 20 % от суммы ЖК) на всех этапах развития женских генеративных органов с небольшим превышением (до 30 % от суммы ЖК) в период рецептивного состояния пестичных цветков (рис. 3: фаза I).

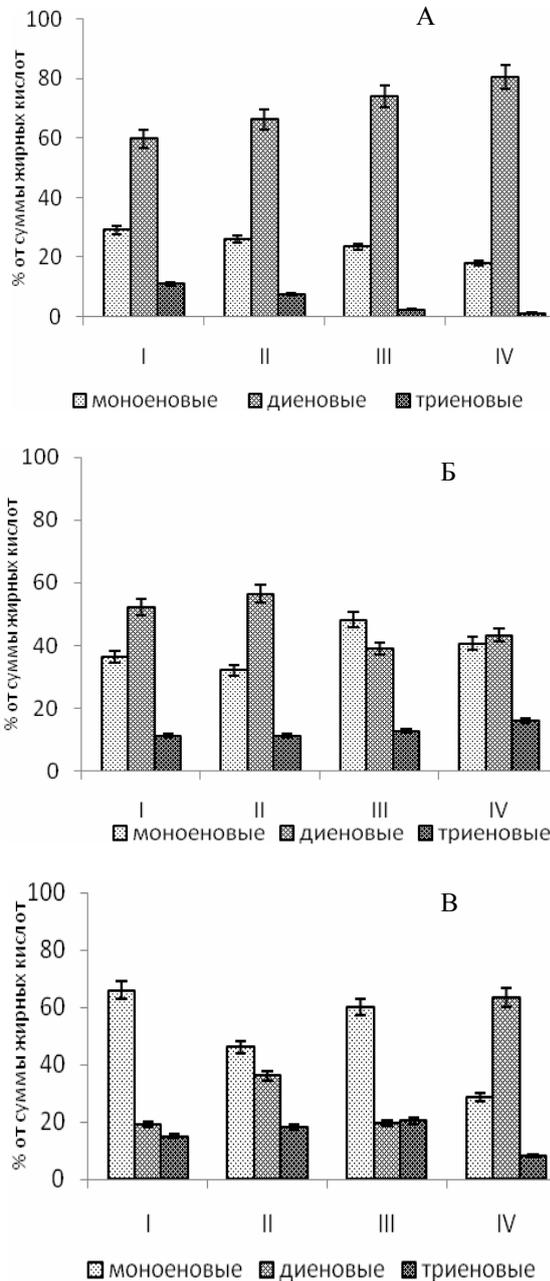


Рис. 3. Соотношение моно-, ди- и триеновых жирных кислот в нейтральных (А), фосфо- (Б) и гликолипидах (В) женских сережек березы повислой на разных фазах их развития

В фосфолипиды на первых этапах развития (I и II фазы) в женских сережках преобладали диеновые (около 55 % от суммы ЖК) и моноено-

вые (около 35 % от суммы ЖК) жирные кислоты (рис. 3: Б). Повышение температуры воздуха к началу лета вызвало гидрогенизацию двойных связей, в результате развитие зародыша сопровождалось снижением содержания диеновых жирных кислот в структуре фосфолипидов (фаза III): количество моно- и диеновых практически сравнялось. Следует отметить небольшое, но стабильное присутствие триеновых жирных кислот (около 12 % от суммы ЖК) во фракции фосфолипидов в период от рецептивного состояния пестичных цветков до созревания семян.

В гликолипидах в трех из четырех изученных фаз развития женских сережек наблюдали преимущественное содержание моноеновых (от 46 до 66 % от суммы ЖК) жирных кислот по сравнению с диеновыми (от 19 до 36 % от суммы ЖК) (рис. 3: В). Триеновые жирные кислоты здесь составили около 15 % от суммы ЖК. Однако на этапе созревания семян в гликолипидах отмечен обратный процесс: повышение диеновых жирных кислот (более 60 % от суммы ЖК) на фоне снижения моно- и триеновых.

Ненасыщенные жирные кислоты в женских сережках березы повислой содержали преимущественно 18 атомов углерода в цепи, различающихся по количеству и положению двойных связей (табл. 4). Концентрация олеиновой и линолевой жирных кислот была выше по сравнению с линоленовой, но их соотношение несколько различалось в зависимости от фракции липидов и фазы развития женских сережек. Так, в нейтральных липидах доминировала линолевая кислота (табл. 4), а в фосфо- и особенно в гликолипидах преобладание линолевой над олеиновой было минимальным (не более чем в 1,3 раза).

Таблица 4. Концентрация ненасыщенных жирных кислот (средние данные по всем фазам) по фракциям в женских сережках березы повислой (в % от их суммы)

Жирные кислоты	Береза повислая		
	НЛ	ФЛ	ГЛ
16:1 (n-7)	2,5 ± 0,1	5,4 ± 0,2	10,3 ± 1,1
18:1 (n-9)	20,4 ± 1,0	34,6 ± 4,1	35,4 ± 1,6
18:2 (n-6)	72,5 ± 5,2	46,8 ± 5,0	40,0 ± 4,1
18:3 (n-3)	2,6 ± 0,5	13,2 ± 1,4	14,3 ± 0,7

Примечание. 16:1 – пальмитолеиновая, 18:1 – олеиновая, 18:2 – линолевая, 18:3 – линоленовая

Различия, обнаруженные в содержании олеиновой кислоты ($C_{18:1}$) в отдельных фракциях липидов, по всей вероятности, обусловлены функциональным состоянием мембран [Лось, 2005] женских сережек березы повислой на разных этапах их развития, поскольку данная кислота является субстратом для синтеза ди- и триеновых (линолевой и линоленовой) жирных кислот. Например, максимальные количества

олеиновой кислоты были обнаружены во фракции гликолипидов (рис. 4: В), где до опыления она достигала более 50 % от суммы C_{18} жирных кислот. И это неслучайно, поскольку образование олеиновой кислоты у растений активно происходит в строме хлоропластов [Лось, 2001]. Во фракции нейтральных и фосфолипидов на этом этапе развития женских сережек олеиновая кислота составила около 30 % (рис. 4: А, Б).

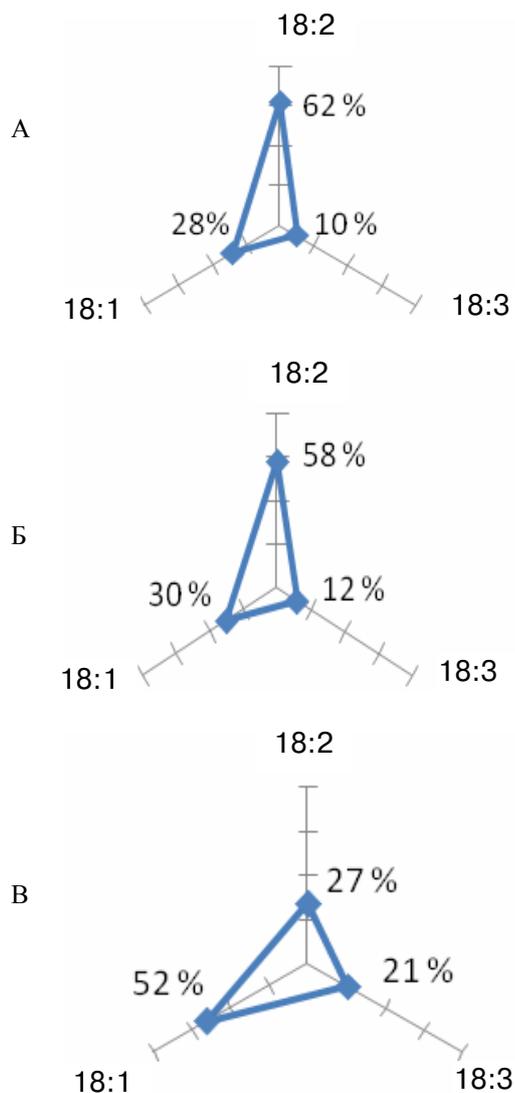


Рис. 4. Соотношение (в %) олеиновой ($C_{18:1}$), линолевой ($C_{18:2}$) и линоленовой ($C_{18:3}$) жирных кислот в нейтральных (А), фосфо- (Б) и гликолипидах (В) женских соцветий березы повислой до опыления

В фосфолипидах пестичных цветков (фаза I) преобладали линолевая (около 60 % от суммы ЖК) и олеиновая (около 30 % от суммы ЖК) жирные кислоты (рис. 4: Б). Повышение температуры воздуха к началу лета вызвало гидрогенизацию двойных связей жирных кислот, в результате созревание зародыша сопровожда-

лось снижением содержания диеновых жирных кислот в структуре фосфолипидов: количество олеиновой и линолевой жирных кислот практически сравнялось (рис. 5: Б).

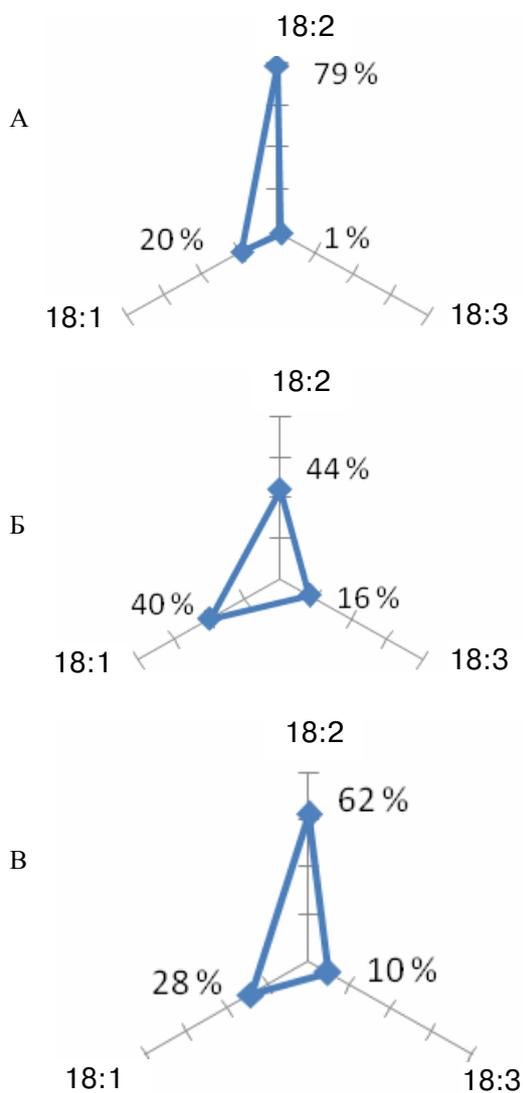


Рис. 5. Соотношение (в %) олеиновой ($C_{18:1}$), линолевой ($C_{18:2}$) и линоленовой ($C_{18:3}$) жирных кислот в нейтральных (А), фосфо- (Б) и гликолипидах (В) женских соцветий березы повислой на стадии созревания семян

Снижение доли олеиновой кислоты в нейтральных и гликолипидах пестичных цветков по мере их трансформации в плоды свидетельствует о повышении активности ацил-липидных $\omega 6$ и $\omega 3$ мембранных десатураз, ответственных за введение в углеводородную цепь жирных кислот второй и третьей двойной связи. В результате к фазе созревания семян в нейтральных и гликолипидах олеиновая кислота не накапливалась, а превращалась в линолевую (рис. 5: А, В), количество которой увеличилось на 17 и 35 % соответственно.

Таким образом, женские сережки березы повислой *Betula pendula* Roth. в условиях южной части Республики Карелия в весенне-летний период характеризовались довольно высоким содержанием липидов, представленных как нейтральными липидами, так и полярными (фосфо- и гликолипидами), однако их количество менялось в соответствии с фазами развития генеративных органов. До опыления в женских пестичных цветках происходило накопление насыщенных жирных кислот. По всей вероятности, это связано с тем, что пестичные цветки, как и пыльца [Ветчинникова и др., 2012], к моменту оплодотворения имеют низкую физиологическую активность. После оплодотворения формирование зародыша сопровождалось активизацией метаболических процессов, связанных с увеличением уровня ненасыщенных жирных кислот, содержащих преимущественно 18 атомов углерода в цепи с различным числом и положением двойных связей. Во всех фракциях содержание олеиновой и линолевой кислоты было выше по сравнению с линоленовой, но их соотношение несколько различалось в зависимости от фракции липидов и фазы развития женской сережки.

Исследования выполнены при частичной финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Отделения биологических наук РАН «Биологические ресурсы России: динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий».

Литература

- Ветчинникова Л. В., Серебрякова О. С., Ильинова М. К. Жирнокислотный состав липидов пыльцы основных представителей рода *Betula* L. // Труды КарНЦ РАН. Серия «Экспериментальная биология». Петрозаводск. 2012. Вып. 2. С. 56–62.
- Войников В. К. Митохондрии растений при температурном стрессе. Новосибирск: Академическое изд-во «Гео». 2011. 163 с.
- Ивантер Э. В., Коросов А. В. Введение в количественную биологию. Петрозаводск: ПетрГУ. 2003. 304 с.
- Кайгородова М. С. Экология цветения и опыления *Betula nana* L. на Полярном Урале // Ботанический журнал. 1975. Т. 60, № 10. С. 1466–1470.
- Каледа В. М. Биология плодоношения березы в условиях Новосибирской области // В кн.: Плодоношение лесных пород Сибири. Новосибирск: Наука. 1982. С. 117–129.
- Каледа В. М. Биология плодоношения березы повислой (*Betula pendula* Roth) в лесостепных районах Западной Сибири: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Красноярск, 1985. 20 с.
- Корчагина И. А. Особенности морфогенеза цветка *Betulaceae* // Ботанический журнал. Т. 58, № 7. 1973. С. 1037–1043.
- Кузнецов В. В., Дмитриева Г. А. Физиология растений. М.: Высш. шк., 2006. 742 с.
- Лось Д. А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // Успехи биологической химии. Т. 41. 2001. С. 161–198.
- Лось Д. А. Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений // Вестник РАН. Т. 75, № 4. 2005. С. 338–345.
- Полевой В. В. Физиология растений. 1989. Москва: Высшая школа. 464 с.
- Родионов В. С. Изменения в мембранных липидах растений при пониженных температурах // Липидный обмен древесных растений в условиях Севера. Петрозаводск: изд-во КФ АН СССР, 1983. С. 4–68.
- Шуляковская Т. А., Ветчинникова Л. В., Канючкова Г. К., Ильинова М. К. Содержание липидов и жирнокислотный состав их фракций в различные фазы развития почек и листьев *Betula pendula* Roth и *B. pubescens* Ehrh. // Раст. ресурсы. 2004. Т. 40, вып. 1. С. 69–75.
- Юсуфов А. Г. Значение вегетативного размножения в прогрессивной эволюции растений // Закономерности прогрессивной эволюции. Л., 1972. С. 393–399.
- Bonome L., Moreira S., Oliveira L., Sotero A. Metabolism of carbohydrates during the development of seeds of the Brazilian rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR. De Juss) Muell.-Arg.] // Acta Physiologica Plantarum. 2011. Vol. 33. Is. 1. P. 211–219.
- Famiani F., Casulli V., Baldicchi A. et al. Development and metabolism of the fruit and seed of the Japanese plum Ozark premier (*Rosaceae*) // Journal of Plant Physiology. 2012. Vol. 169. Is. 6. P. 551–560.
- Folch J., Lees M., Stanley G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226, N 1. P. 497–509.
- Heslop-Harrison J. Pollen-stigma interaction and cross-incompatibility in the grasses // Science. 1982. Vol. 215, N 4538, P. 1358–1364.
- Lyons J. M., Wheaton T. A., Pratt H. K. Relationship between the physical nature of mitochondrial membranes and chilling sensitivity in plants // Plant Physiol. 1964. Vol. 39, N 2. P. 262–268.
- Peoples M. B., Atkins C. A., Pate J. S., Murray D. R. Nitrogen Nutrition and Metabolic Interconversions of Nitrogenous Solutes in Developing Cowpea Fruits // Plant Physiol. 1985. Vol. 77. P. 382–388.
- Schaffer A. A., Petreikov M. Sucrose-to-Starch Metabolism in Tomato Fruit Undergoing Transient Starch Accumulation // Plant Physiol. 1997. Vol. 113 (3): 739–746.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Ветчинникова Лидия Васильевна

рук. группы биотехнологии
воспроизводства древесных растений,
ведущий научный сотрудник, д. б. н.
Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: vetchin@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 768160

Серебрякова Оксана Сергеевна

старший биолог
Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: 531521@mail.ru

Ильинова Мария Казимировна

научный сотрудник, к. б. н.
Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: iljinova@krc.karelia.ru

Vetchinnikova, Lidiya

Forest Research Institute,
Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: vetchin@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 768160

Serebryakova, Oksana

Forest Research Institute,
Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: 531521@mail.ru

Ilyinova, Maria

Forest Research Institute,
Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: iljinova@krc.karelia.ru

УДК 582.842.3:581.332

РАЗНООБРАЗИЕ ФОРМ ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЕРЕН И ИХ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ И ГИБРИДОВ КРЫЖОВНИКОВЫХ

О. А. Гаврилова¹, О. А. Тихонова²

¹Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН

²Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства
им. Н. И. Вавилова Россельхозакадемии

С помощью светового и сканирующего электронного микроскопов изучена пыльца 16 образцов 4 видов и 2 тетраплоидных гибридов из семейства крыжовниковых. Описаны и проиллюстрированы 2 морфологических типа пыльцы: первый – 4-5-бороздно-8-10-поровый и второй – 6-10-порово-орый, а также переходные формы пыльцевых зерен, обнаруженные у видов и гибридов. Увеличения размеров пыльцы у тетраплоидов не наблюдалось, но наряду с нормальными пыльцевыми зернами были обнаружены мелкоразмерные. У гибридов встречаются все переходные формы апертурных типов пыльцы от меридионально-бороздных (у крыжовников) к глобально-поровым (у смородин). Палиноморфологически подтверждается выделение семейства *Grossulariaceae* DC и разделение родов *Ribes* L. и *Grossularia* Hill внутри семейства.

Ключевые слова: пыльца; апертуры; экзина; морфологический тип; гибрид; *Grossulariaceae*; *Ribes*.

O. A. GavriloVA, O. A. Tikhonova. DIVERSITY OF POLLEN GRAIN SHAPES, AND THEIR DISTRIBUTION ACROSS SOME GROSSULARIACEAE SPECIES AND HYBRIDS

Pollen grains of 16 samples of 4 species and 2 tetraploid hybrids of the *Grossulariaceae* family were studied by light and scanning electron microscopy. Two morphological types of pollen were described and illustrated: 1st – 4-5-colpo-8-10-porate in genus *Grossularia*, and 2nd – 6-10-porate in genus *Ribes*, as well as transitional forms of pollen grains found in species and hybrids. No increase in the pollen size was detected in tetraploid hybrids, but small-sized grains were present alongside with normal grains. All transitional pollen aperture forms from meridionocolporate (gooseberry) to pantoporate (currants) were present in hybrids. Palynomorphological data support the isolation of the family *Grossulariaceae* DC and the subdivision of the genera *Ribes* L. and *Grossularia* Hill within the family.

Key words: pollen; apertures; exine; morphological type; hybrid; *Grossulariaceae*; *Ribes*.

Введение

Семейство крыжовниковых состоит из 150–200 видов, включаемых разными авторами в один род *Ribes* L. [Janczewski, 1907; Rehder, 1954; Weigend, 2007] или два рода – *Ribes* и *Grossularia* Hill [Berger, 1924; Пояркова, 1939]. Представители *Grossulariaceae* DC – кустарники, распространены в холодных и умеренных зонах Европы, Азии, в Северной Америке, Северной Африке и горных районах Южной Америки. В настоящей работе виды семейства представлены по системе Berger [1924].

Смородина и крыжовник являются распространенными ягодными растениями, широко культивируемыми в нашей стране и за рубежом. В формировании современного сортимента черной смородины, насчитывающего более 1200 сортов, в той или иной степени принимали участие лишь 10 видов рода *Ribes*. Подавляющее же большинство сортов получено на основе 2–3 таксонов. Современные сорта крыжовника получены с участием *G. reclinata* Mill. и нескольких американских диких видов.

Все виды рода *Ribes* диплоидны ($2n = 16$). Естественные межвидовые гибриды встречаются только у видов, входящих в одну секцию, гибридов на межсекционном, а тем более межподродовом уровне в природе не выявлено [Помология, 2009]. В селекции методом отдаленной гибридизации получены гибриды черной смородины с 26 видами из разных секций и подродов, в том числе тетраплоидные гибриды смородины с крыжовником, которые были созданы в середине XX века в Германии, Швеции и Венгрии. В настоящее время предложено рассматривать эти сорта в ранге новой ягодной культуры, присвоив ей название рибеллярия или латинское название *R. nigrolaria*.

Сорта *Jošta* и *Kroma* являются отдаленными межродовыми гибридами смородины и крыжовника ($2n = 32$), стерильность которых была преодолена с помощью методов экспериментальной полиплоидии.

Основной целью создания данных гибридов стала попытка решения частных проблем селекции этих культур: выведение бесшипного крыжовника и получение устойчивых к почковому клещу сортов черной смородины путем привнесения в геном последних гена *Se*, контролирующего это свойство.

Сорт *Jošta* был выведен Р. Бауэром в Германии, в Институте им. Макса Планка, от скрещивания (*R. nigrum* × *R. grossularia*) × (*R. nigrum* × *R. divaricatum*). Название его происходит от слияния первых букв немецкого названия смородины (*Johannisbeere*) и крыжовника (*Stachelbeere*).

Сорт *Kroma* получен Ф. Нильсоном на сельскохозяйственной станции в Альнарпе (Швеция). Исходными формами служили (*R. nigrum* × *Grossularia*) × (*R. nigrum* × *R. niveum*).

Оба гибрида самоплодны и удачно сочетают преимущества родительских форм – крупноплодность и бесшипность с устойчивостью к американской мучнистой росе и листовым пятнистостям, а также почковому клещу и переносимому им опасному микоплазменному заболеванию – реверсии (махровости). Их успешно выращивают в мягких климатических условиях Западной Европы. В нашей стране эти сорта не получили промышленного распространения и используются исключительно для целей селекции.

Наиболее полно пыльца крыжовниковых была изучена Агабабяном [1963], Huang Pu-hwa, Ye Wan-hui [1989] и Гавриловой [2009, 2010]. Сведения о морфологии пыльцы некоторых представителей семейства имеются в работах Куприяновой, Алешиной [1972], Verbeek-Reuvers [1977] и Hesse et al. [2009]. В указанных работах описаны и обсуждаются пыльцевые зерна конкретных видов, пыльцевые зерна некоторых межвидовых гибридов описаны в работе Тихоновой [2000], Бурменко и др. [2009]. Данных по межродовым гибридам нами не обнаружено.

В связи с этим целью нашего исследования явилось изучение пыльцы смородинно-крыжовниковых гибридов *Jošta* и *Kroma*, а также видов, принимавших участие в их создании. Были поставлены следующие задачи: детально описать пыльцевые зерна, дать их характеристику и выявить диагностические признаки пыльцы исследованных таксонов для целей систематики и филогении, спорово-пыльцевого анализа, а также проанализировать строение пыльцевых зерен гибридов и «родительских видов», описать разнообразие обнаруженных форм пыльцевых зерен для целей общей морфологии растений.

Материалы и методы

В работе использован палинологический материал из гербария и коллекций открытого грунта Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН, генофонда черной смородины и крыжовника ВНИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова, а также личные сборы авторов. Исследованы следующие образцы:

Grossularia reclinata (L.) Miller: 1) Новгородская обл., Хвойнинский р-н, п/о Кабожа, Гаврилова О. А., 10.05.2008; 2) Новгородская обл., Хвойнинский р-н, дер. Савкино, Гаврилова О. А., 09.05.2009; 3) коллекция открытого грунта Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН, Гаврилова О. А., 05.2008;

Grossularia divaricata (Dougl.) Cov. et Britt.: 4) Brith. Columbia, Canada, Vancouver Island, J. A. Calder, K. T. MacKay, N 29122, 15 V 1961; 5) 1 отд. Гл. бот. сада, А. Смирнова, Т 635/1633, 21 V 1924; 6) Павловская опытная станция ВИР (г. Павловск Ленинградской обл.), Пупкова Н. А. 22.05. 2012;

Grossularia nivea Sprach: 7) посадки СПб бот. сада; 8) Павловская опытная станция ВИР (г. Павловск Ленинградской обл.), Гаврилова О. А., 22.05.2012;

Ribes. nigrum L.: 9) Новгородская обл., Хвойнинский р-н, дер. Савкино, Гаврилова О. А. 10.05.2008; 10) посадки Новосибирск. бот. сада; 11) subsp. *europaeum* Jancz. Павловская опытная станция ВИР (г. Павловск Ленинградской обл.), Тихонова О. А. 05.1994; 12) subsp. *sibiricum* Wolf E. Павловская опытная станция ВИР (г. Павловск Ленинградской обл.), Тихонова О. А. 05.1994;

Ribes x Grossularia: Jošta – 13) Павловская опытная станция ВИР (г. Павловск Ленинградской обл.), Тихонова О. А. 05.1994; 14) Павловская опытная станция ВИР (г. Павловск Ленинградской обл.), 22.05. 2012; *Kroma* – 15) Павловская опытная станция ВИР (г. Павловск Ленинградской обл.), Тихонова О. А. 05. 1994; 16) Павловская опытная станция ВИР (г. Павловск Ленинградской обл.), 22.05.2012.

Для изучения с помощью светового микроскопа (СМ) пыльцевые зерна обрабатывались по стандартному ацетолитному методу [Erdtman, 1952]. Пыльцевые зерна фотографировались при 1000-кратном увеличении фотокамерой Canon 5D. Также использовалась оптика Номарского. Для составления описаний пыльцы были измерены не менее 20 зерен из каждого образца.

Исследования на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) JEOL JSM-6390 проводились в Центре коллективного пользования научным оборудованием БИН РАН.

Результаты

Для пыльцевых зерен исследуемых гибридов и родительских видов представлена характеристика их морфологического типа, структура поверхности и размеров.

G. reclinata (рис. 1: 1–4; рис. 2: 1–2). Пыльцевые зерна бороздно-поровые, сфероидальные, реже эллипсоидальные, в очертании с полюса округлые или округло-4-5-лопастные, с экватора округлые, реже овальные, полярная ось 25–39 мкм, экваториальный диаметр 20–35 мкм. Борозды в количестве 4–5, обычно широкие, шириной

в среднем 5 (от 3 до 7) мкм, меридионально направленные, закругленные на концах, в центре (по экватору) иногда сужающиеся, с нечеткими, рваными краями. Количество пор от 8 до 10. Обычно борозды параллельны друг другу, две поры расположены по концам борозды, ближе к полюсам. Мембрана борозд гранулярная. Поры округлые, в среднем 3 (от 2 до 5) мкм в диаметре, с четкими краями. Экзина толщиной 0,9–1,9 мкм, скульптура мезокольпиума неясная, гладкая или шероховатая.

При исследовании в СЭМ наблюдается почти гладкая, редко микроперфорированная поверхность мезокольпиума, обнаруживаются микроперфорации около 0,1 мкм в диаметре, иногда микроперфорации соединяются, располагаются в неглубоких складках, образуя извилистый рельеф поверхности. Борозды обычно широкие, погруженные, закругленные на концах, редко более или менее узкие. Мембрана борозд гранулярная, гранулы округлой или угловатой формы, 0,1–0,2 мкм в диаметре, располагаются на шероховатой поверхности борозды на расстоянии 0,1–0,9 мкм друг от друга. Края борозд неровные, извилистые или рваные. Поры округлые, края пор ровные.

Примечание: в образце № 2 обнаруживаются пыльцевые зерна с более узкими, шириной до 2 мкм, бороздами, часто расположенными под небольшим углом друг к другу. Количество пор внутри борозд от 1 до 3, поры размещены неравномерно.

G. divaricata (рис. 1: 13–14; рис. 3: 1–4). Пыльцевые зерна бороздно-поровые или слитнобороздно-поровые, сфероидальные, в очертании с полюса округло-4-5-лопастные, с экватора округлые, в среднем 25 (от 18 до 31) мкм в диаметре. Борозды в количестве 4–5, широкие, шириной в среднем 5 (от 3,3 до 7,5) мкм, в основном меридионально направленные, слабо закругленные на концах, с нечеткими, рваными краями. Количество пор от 8 до 10. Борозды расположены параллельно друг другу, с двумя порами почти на концах борозды, ближе к полюсам. Часто встречаются пыльцевые зерна с бороздами, расположенными под углом друг к другу, иногда сливающимися попарно вблизи полюсов, поры в количестве от 1 до 4 размещены неравномерно внутри борозды. Мембрана борозд гранулярная. Поры округлые, в среднем 4 (от 3 до 6) мкм в диаметре, с четкими краями. Экзина толщиной 0,9–1,8 мкм, скульптура мезокольпиума неясная, гладкая или шероховатая.

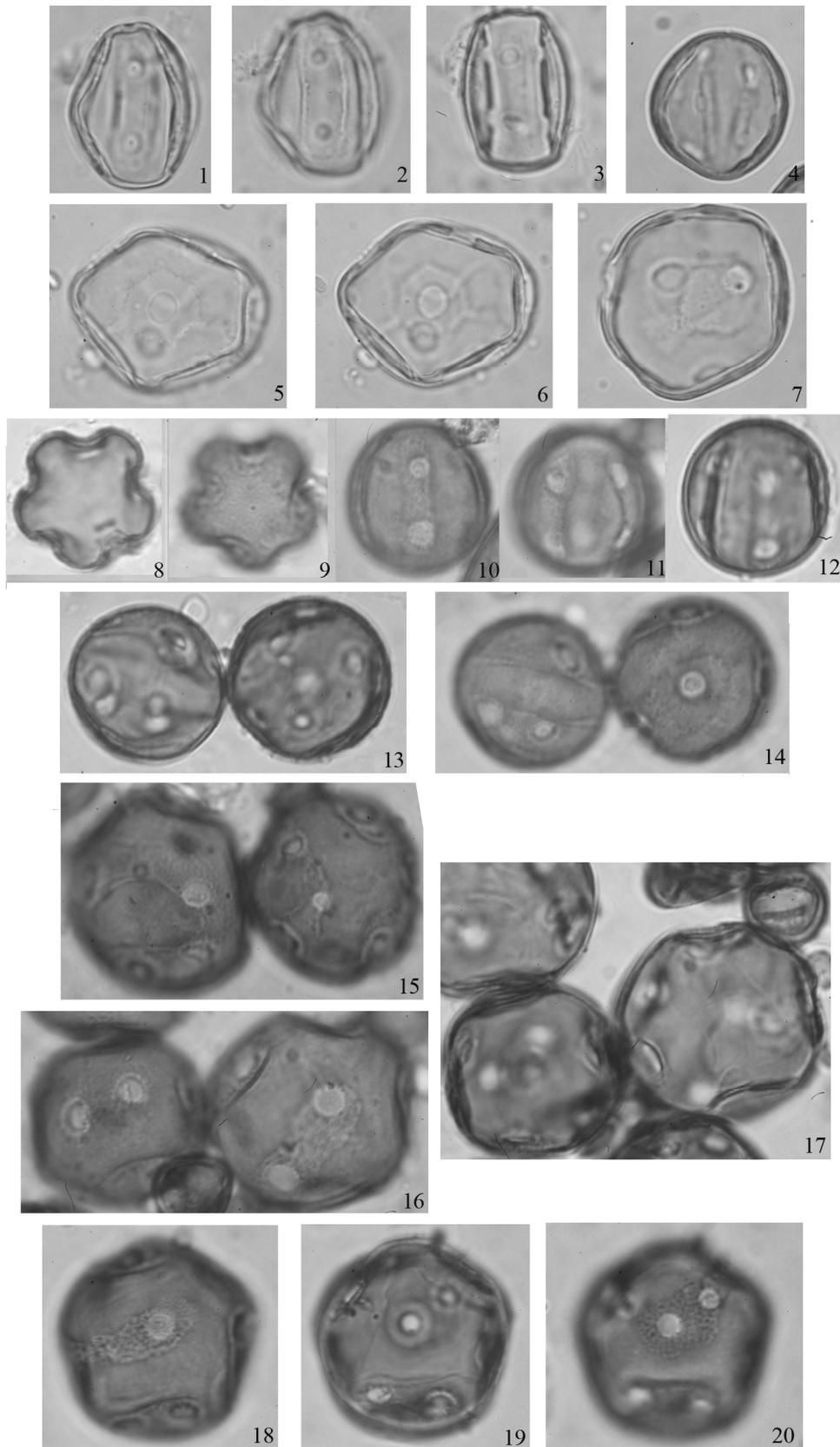


Рис. 1. Общий вид пыльцевых зерен крыжовниковых (СМ). 1-4 – *G. reclinata*; 5-7 – *R. nigrum*; 8-12 – *G. nivea*; 13-14 – *G. divaricata*; 15-17 – *Jošta*; 18-20 – *Kroma*; 8-9 – вид с полюса, 1-4 – вид с экватора, 10-12 – общий вид пыльцевых зерен. Масштабная линейка: –10 мкм

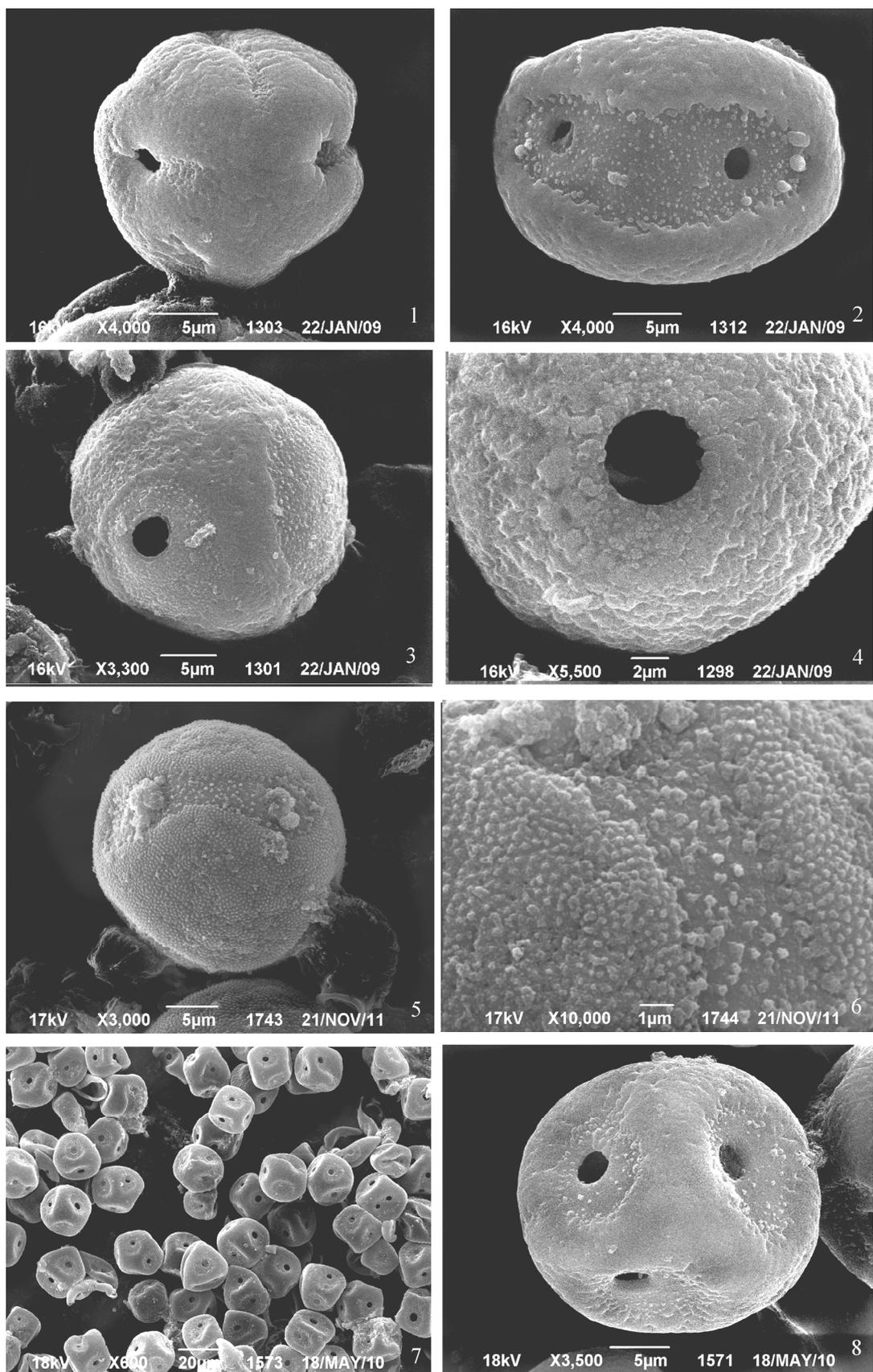


Рис. 2. Пыльцевые зерна крыжовниковых (СЭМ). 1–2 – *G. reclinata*; 3–4 – *R. nigrum*; 5–6 – *G. nivea*; 7–8 – *Kroma*; 1 – вид с полюса; 2, 5 – вид с экватора; 3, 8 – общий вид; 4, 6 – элементы поверхности; 7 – скопление пыльцевых зерен

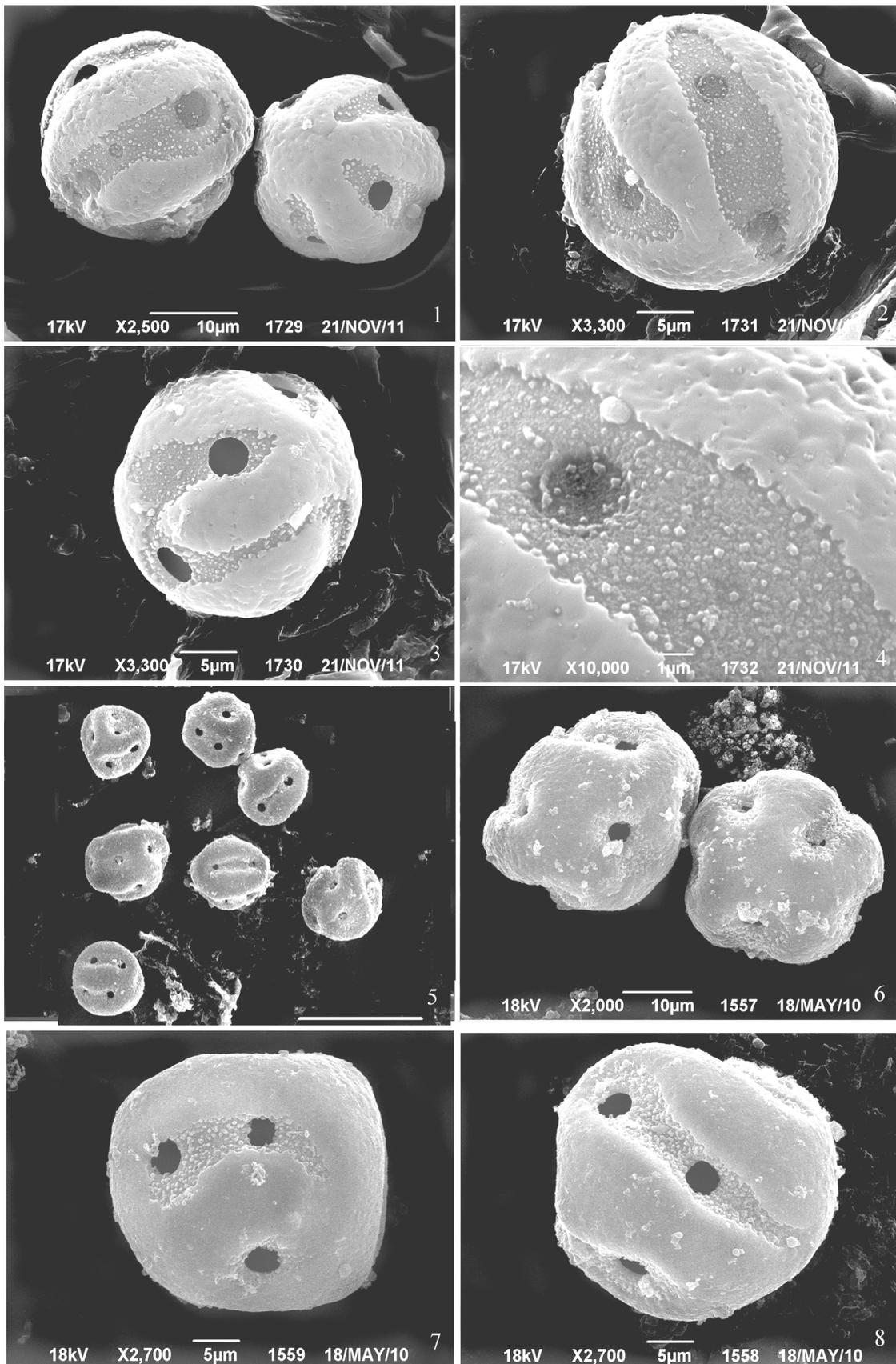


Рис. 3. Пыльцевые зерна крыжовниковых (СЭМ). 1–4 – *G. divaricata*; 5–8 – *Jošta*; 2, 3, 7, 8 – общий вид пыльцевого зерна ; 4 – элементы поверхности; 1, 5, 6 – несколько пыльцевых зерен

При исследовании в СЭМ наблюдается почти гладкая или микроперфорированная поверхность мезокольпиума, обнаруживаются микроперфорации около 0,1 мкм в диаметре, иногда микроперфорации сливаются, образуя извилистый рельеф поверхности. Борозды обычно широкие, погруженные, слегка закругленные на концах. Мембрана борозд гранулярная, гранулы округлой формы, 0,1–0,2 мкм в диаметре, располагаются на шероховатой поверхности борозды более или менее плотно, на расстоянии 0,1–0,7 мкм друг от друга. Края борозд неровные, извилистые или рваные. Поры округлые, края пор ровные.

Примечание: в образце № 6 диаметр пыльцевых зерен в среднем больше на 6 мкм, чем в образцах №№ 4 и 5. Диаметр пор и ширина борозд больше в среднем на 0,5–1 мкм.

G. nivea (рис. 1: 8–12; рис. 2: 5–6). Пыльцевые зерна бороздно-поровые, в очертании с полюса округлые или округло-4-5-лопастные, с экватора округлые, в диаметре в среднем 27 (от 22 до 31) мкм. Борозды в количестве 4 (очень редко 5), широкие, шириной в среднем 4 (от 3 до 5,5) мкм, меридионально направленные, закругленные на концах, с нечеткими, рваными краями. Количество пор обычно 8 (очень редко 10). Борозды параллельны друг другу, две поры расположены на концах борозд ближе к полюсам. Мембрана борозд гранулярная. Поры округлые, в среднем 4,2 (от 3,1 до 5,3) мкм в диаметре, с четкими краями. Мембрана пор почти гладкая. Экзина толщиной 0,9–1,8 мкм, скульптура мезокольпиума неясная, шероховатая.

При исследовании в СЭМ наблюдается микрошиповатая поверхность мезокольпиума, редко обнаруживаются микроперфорации около 0,1 мкм в диаметре, микрошипики 0,1–0,2 мкм по высоте и в диаметре, довольно плотно и регулярно расположены на расстоянии 0,1–0,3 мкм друг от друга. Борозды обычно широкие, погруженные, закругленные на концах. Мембрана борозд гранулярная, гранулы угловатой формы, 0,1–0,3 мкм в диаметре, располагаются на шероховатой поверхности борозды на расстоянии 0,2–0,9 мкм друг от друга. Края борозд неровные, извилистые или рваные. Поры округлые, края пор ровные.

Ribes nigrum (рис. 1: 5–7; рис. 2: 3–4). Пыльцевые зерна орово-поровые, сфероидальные, в очертании округлые или округло-угловатые, в среднем 34 (от 29 до 40) мкм в диаметре. Поры в количестве 6–10, округлые, глобально расположенные, в среднем 4,8 (от 2,9 до 6) мкм в диаметре, с четкими краями. Поры окружены эктоапертурной областью округлой, удлиненной, угловатой или неправильной формы с нечеткими,

рваными краями, 5–12 мкм в диаметре, редко эктоапертурная область охватывает две поры. Мембрана эктоапертуры гранулярная. Экзина толщиной 1,1–1,7 мкм, скульптура мезопориума неясная, шероховатая.

При исследовании в СЭМ наблюдается почти гладкая или микроперфорированная поверхность мезопориума, обнаруживаются микроперфорации около 0,1 мкм в диаметре, часто микроперфорации сливаются, образуя извилистый рельеф поверхности. Эктоапертурная область главным образом округлой формы, погруженная. Мембрана эктоапертуры гранулярная, гранулы округлой формы, около 0,1 мкм в диаметре, располагаются плотно или на расстоянии 0,1–0,4 мкм друг от друга. Часто пора расположена в центре эктоапертурной области. Очень редко эктоапертурные области охватывают пору лишь по краям. Иногда встречается эктоапертурная область без поры. Края эктоапертур неровные, извилистые или рваные. Поры округлые, края пор более или менее ровные.

Примечание: пыльцевые зерна subsp. *sibiricum* (образец № 12) крупнее пыльцы из других образцов в среднем на 2–3 мкм.

Kroma (рис. 1: 18–20; рис. 2: 7–8). Пыльцевые зерна главным образом порово-оровые или слитнобороздно-поровые, сфероидальные, в очертании с полюса и с экватора округлые, в среднем 32 (от 26 до 45) мкм в диаметре. Поры в количестве от 6 до 12 расположены более или менее равномерно по всему пыльцевому зерну, окружены эктоапертурной областью округлой, угловатой или бороздовидной формы, ширина бороздовидных областей около 5 мкм (иногда до 13 мкм). Эктоапертурные области с нечеткими, извилистыми, рваными краями, охватывают от 1 до 4 пор, располагаются как параллельно, так и под углом до 90° друг к другу. Поры внутри эктоапертур также неравномерно размещены. Мембрана борозд гранулярная. Поры округлые, с четкими краями, в среднем 4,5 (от 2,6 до 6,2) мкм в диаметре. Экзина толщиной 1,1–2,0 мкм, скульптура мезокольпиума неясная, гладкая или шероховатая.

При исследовании в СЭМ наблюдается почти гладкая или слабо микроперфорированная поверхность мезопориума, обнаруживаются микроперфорации около 0,1 мкм в диаметре, иногда микроперфорации сливаются, образуя извилистый рельеф поверхности. Эктоапертурная область округлой, удлиненной, неправильной, угловатой или бороздовидной формы, погруженная. Мембрана эктоапертуры гранулярная, гранулы округлой формы, около 0,1 мкм в диаметре, располагаются плотно или на расстоянии 0,3–0,9 мкм друг от друга. Края эктоапертур

неровные, извилистые или рваные. Поры округлые, края пор более или менее ровные.

Примечание: в образцах встречаются мелкие пыльцевые зерна от 11 до 28 мкм в диаметре с мелкими, около 2 мкм в диаметре, порами.

Jošta (рис. 1: 15–17; рис. 3: 5–8). Пыльцевые зерна главным образом слитнобороздно-поровые, сфероидальные, в очертании с полюса и с экватора округлые, в среднем 35 (от 30 до 45) мкм в диаметре. Поры в количестве от 6 до 12 расположены в бороздах по всему пыльцевому зерну, окружены эктоапертурными областями, чаще всего бороздovidной формы, ширина бороздovidных областей 7 мкм (от 5 до 13 мкм). Эктоапертурные области разной формы, с нечеткими, извилистыми, рваными краями, охватывают от 2 до 4 пор, могут располагаться под углом до 90° друг к другу, часто сливаясь между собой. Поры внутри эктоапертур расположены неравномерно. Мембрана борозд гранулярная. Поры округлые, с четкими краями, в среднем 4,5 (от 2,7 до 5,7) мкм в диаметре. Экзина толщиной 1,1–2,1 мкм, скульптура мезокольпиума неясная, шероховатая.

При исследовании в СЭМ наблюдается почти гладкая или микроперфорированная поверхность мезопориума, обнаруживаются микроперфорации около 0,1 мкм в диаметре. Эктоапертурная область главным образом бороздovidной формы, погруженная. Мембрана эктоапертуры гранулярная, гранулы округлой формы, около 0,2 мкм в диаметре, плотно расположенные. Края эктоапертур неровные, извилистые или рваные. Поры округлые, края пор более или менее ровные.

Примечание: в образцах встречаются мелкие пыльцевые зерна от 13 до 28 мкм в диаметре с мелкими, около 2 мкм в диаметре, порами.

Таким образом, у исследованных представителей обнаружены два морфологических типа пыльцевых зерен: бороздно-поровый (*Grossularia*) и порово-оровый (*Ribes*). Прослеживаются все переходные формы от меридионально-бороздных к глобально-поровым. У большинства изученных таксонов в каждом образце обнаруживаются разные формы пыльцевых зерен, которые мы условно объединили в следующие пять групп:

1) Бороздно-поровые. Борозды меридионально направлены и параллельны друг другу, в бороздах по 2 поры (рис. 1: 1–3, 8–12; рис. 2: 2, 5).

2) Отклонения бороздно-поровых. Борозды в основном меридионально направлены, часто не параллельны, а расположены под углом друг к другу, борозды часто сливаются, 1-2-3 поры в борозде (рис. 1: 4, 13–14; рис. 2: 1; рис. 3: 1–3, 8).

3) Отклонения бороздно-поровых и порово-оровых. Эктоапертурные области одновременно округлой, угловатой, неправильной или бороздovidной формы, охватывают от 1 до 4 пор, располагаются как параллельно, так и под углом до 90° друг к другу. Поры внутри эктоапертур также неравномерно размещены. У пыльцевого зерна присутствует по крайней мере одна борозда (рис. 1: 15–17; рис. 3: 6–7).

4) Отклонения порово-оровых. Эктоапертурные области округлой, угловатой, удлиненной, неправильной формы, охватывают от 1 до 3 пор, расположение пор неравномерное (рис. 1: 7, 18–20).

5) Порово-оровые. Одна пора в центре эктоапертурной области, расположение пор глобальное, равномерно по всему пыльцевому зерну (рис. 1: 5–6; рис. 2: 3, 8).

Распределение форм пыльцы у исследованных таксонов представлено в таблице.

Обсуждение

В соответствии с общепринятой палинологической терминологией борозда – это вытянутая апертура, соотношение длины которой к ширине больше 2 [Токарев, 2002], у поры указанное соотношение меньше 2. У пыльцевых зерен представителей крыжовниковых обнаружены сложные апертуры, состоящие из эктоапертуры и эндоапертуры [Гаврилова, 2009]. Части сложной апертуры классифицируются Токаревым [2002] следующим образом: борозда – это эктоапертура, т. е. апертура в эктэксине, ора – эндоапертура, превышающая по своим размерам эктоапертуру, порой может называться как эктоапертура, так и эндоапертура. В нашем случае эндоапертуры (поры) всегда меньше эктоапертур (борозд или пор), таким образом, сложные типы апертур крыжовниковых мы называем бороздно-поровыми, в соответствии с терминологией Токарева [2002] и порово-оровыми, отмечая при этом, что апертуры сложные. Последний тип сложных апертур встречается редко, и у Токарева [2002] нет подходящего термина для его обозначения. Мы приводим перевод термина Эрдтмана [Erdtman, 1952], впоследствии используемого Punt et al. [2007], pororate – порово-оровый – тип сложной апертуры, чаще всего округлой формы, у которой очертания эндопоры и эктопоры не соответствуют друг другу. Часто такие апертурные типы цветковых называют просто поровыми, упуская при этом сложность апертур [Punt et al., 2007]. Так, при описании пыльцы всех крыжовниковых морфологический тип поровые или рассеянно-многoporовые использовали Агабабян [1963],

Куприянова, Алешина [1972], Hesse et al. [2009], Бурменко и др. [2009]. Ряд исследователей [Verbeek-Reuvers, 1977; Huang Pu-hwa, Ye Wan-hui, 1989] разделяли тип *Grossularia* и тип *Ribes*, обращая внимание на равномерность расположения борозд и пор внутри борозд, тип *Grossularia* авторы называли зональнобороздным.

Нами описаны два морфологических типа пыльцевых зерен у родов *Grossularia* и *Ribes*. По палиноморфологическим данным подтверждается выделение этих родов в отдельное семейство и правомерность подразделения родов внутри семейства [Гаврилова, 2009, 2010]. В настоящей работе впервые исследованы пыльцевые зерна еще двух видов крыжовников, их пыльца также относится к бороздно-поровому типу *Grossularia* (табл.). Выявлены диагностические характеристики пыльцы этих видов: у пыльцевых зерен *G. divaricata* борозды часто сливаются между собой вблизи полюсов, поры неравномерно расположены внутри борозд (рис. 1: 13–14; рис. 3: 1–4), у пыльцевых зерен *G. nivea* впервые для крыжовниковых обнаружена микрошиповатая поверхность мезокольпиума (рис. 2: 5–6).

По размерам пыльцевые зерна всех исследованных таксонов варьируют от 25 до 45 мкм в диаметре и относятся к пыльцевым зернам среднего размера [Токарев, 2002]. Пыльца смородины и тетраплоидных гибридов (от 26 до 45 мкм в диаметре) в среднем чуть больше, чем пыльца крыжовников (от 18 до 39 мкм в диаметре). Hossain et al. [1990] описали увеличение размеров пыльцевых зерен и пор у амфидиплоидных гибридов рода *Brassica* по сравнению с диплоидными родительскими видами. Увеличение размеров пыльцы тетраплоидных гибридов крыжовниковых (по сравнению с диплоидными «родительскими» формами) не наблюдается. Диаметр пор у гибридов крыжовниковых тоже не увеличивается и составляет в среднем 4–5 мкм в диаметре. Однако у гибридов обнаруживается большое число мелких (недоразвитых?) пыльцевых зерен около 11 мкм в диаметре, с мелкими эктоапертурами и порами около 2 мкм в диаметре (рис. 1: 17).

Количество пор у тетраплоидных гибридов в действительности чуть больше (до 12 у гибридов, у видов обычно не больше 10). Увеличение числа пор у тетраплоидов описано еще на примере пыльцы ржи [Попова, 1971]. Увеличение или уменьшение числа пор триплоидных гибридов берез показано в работе Karlsdottir et al. [2008]. При изучении пантопоратной пыльцы межвидовых гибридов и родительских форм амарантусов обнаружено, что количество пор у

пыльцы гибридов среднее между количеством пор у пыльцевых зерен родительских форм [Franssen et al., 2001].

Изучение морфологии пыльцы гибридов ранее проводили главным образом на образцах, родительские формы которых имели однотипные пыльцевые зерна [Olsson, 1974; Srivastava, 1978; Sorensen, 1989; Hossain et al., 1990; Franssen et al., 2001; Datta et al., 2006; Vafadar et al., 2010]. Поэтому авторы сравнивали в основном количественные характеристики пыльцы – размеры пыльцевых зерен, величину их полярной оси и экваториального диаметра, размер пор, размер ячеек на поверхности экзины. При изучении культиваров и их гибридов *Cajanus cajan* [Srivastava, 1978] существенных различий в размерах пыльцевых зерен не обнаружено, однако автор отмечает близость размеров пыльцевых зерен к мужскому родительскому культивару, по размерам ячеек экзины гибриды занимают промежуточное положение. На примере гибридов F_1 и F_2 рода *Linaria* отмечено небольшое уменьшение размеров пыльцевых зерен по сравнению с родительскими [Olsson, 1974]. Пыльцевые зерна пяти видов и гибридов первого и второго поколения рода *Pachyrhizus* были изучены Sorensen [1989]. Морфологические характеристики пыльцы, такие как размеры и симметрия зерен, длина борозд, – всегда средние у F_1 гибридов, сетчатость и размер ячеек на мезокольпиуме, сетчатость апокольпиума, особенности края борозд (т. е. характеристики тектума) сохраняются у F_2 гибридов. Автор предлагал использовать метод палиноморфологии для определения возможных родительских видов растения, указывая, что для этих целей качественные (тектальные) особенности пыльцы *Pachyrhizus* важнее, чем количественные.

При изучении пыльцы гибридов, родительские формы которых имели один апертурный тип, но разные структуры поверхностей, отмечен переходный тип поверхностей [Sorensen, 1989; Datta et al., 2006; Vafadar et al., 2010]. Имеются также данные и о том, что поверхность экзины может быть однотипной с одной из родительских форм [Datta et al., 2006; Гаврилова, Никитин, 2012].

Подробное исследование морфологии пыльцы гибрида *Mecopopsis x cookei*, у которого родительские формы имели разные апертурные типы и особенности поверхности экзины [Henderson, 1972], показало, что пыльца имеет апертурный тип одного из родителей (пыльцевые зерна родительских форм 3-бороздные и безапертурные, у гибрида – 3-бо-

роздные), а характеристики шиповатого текстура гибрида по размерам шипов являются промежуточными между родительскими формами. Размеры пыльцы гибрида – средние между родительскими видами.

В нашем случае у гибридов крыжовниковых выявлены ранее никем не отмеченные особенности: у гибридов представлены все переходные формы пыльцы от одного апертурного родительского типа к другому. Таким образом, гибриды – достаточно информативный и довольно удобный объект для изучения развития пыльцы с точки зрения детерминации апертур. Однако соотношение и распределение форм у двух изученных нами гибридов различно: у *Kroma* встречаются пыльцевые зерна типа смородин и все варианты отклонений (табл.: формы 2–5), а у *Jošta* формы крыжовникового типа, характерные для двух родительских видов, и их отклонения (табл.: формы 2–3).

Распределение форм пыльцевых зерен, обнаруженных у изученных видов и гибридов крыжовниковых

Группа	Формы	Таксон					
		<i>G. recinata</i>	<i>R. nigrum</i>	<i>G. nivea</i>	<i>Kroma</i>	<i>G. divaricata</i>	<i>Jošta</i>
1	Бороздно-поровые	+		+			
2	Отклонения бороздно-поровых	+			+	+	+
3	Отклонения бороздно-поровых и порово-орových				+		+
4	Отклонения порово-орových		+		+		
5	Порово-орových		+		+		

У видов, участвовавших в формировании гибрида *Jošta*, поверхности экзины мезокольпиума-мезопориума однотипны – шероховатые, микроперфорированные, соответственно, у гибрида тип поверхности такой же. В образовании гибрида *Kroma*, помимо видов с шероховатой, микроперфорированной поверхностью пыльцы, участвовал вид *G. nivea* с микрошипиковатой поверхностью, однако эта особенность совсем не передалась гибриду.

Таким образом, в результате нашего исследования выявлены новые формы пыльцы крыжовниковых – спиральнобороздные и новый для семейства тип поверхности мезокольпиума – микрошипиковатый. У пыльцы гибридов представлены все формы переходов апертурных типов от меридионально-бороздных к глобально-поровым. Многообразие форм пыльцевых зерен в каждом из образцов является дополнительной характеристикой гибридов.

У тетраплоидов не выявлено увеличения размера пыльцы, но отмечено наличие мелкозернистых пыльцевых зерен. Поверхность пыльцы гибридов не всегда отражает особенности экзины родительских форм. Подтверждается выделение семейства и разделение родов по палиноморфологическим признакам.

Авторы выражают благодарность научному сотруднику отдела ГР плодовых культур ВИР Н. А. Пупковой за предоставленный палинологический материал по роду *Grossularia* Hill из генофонда крыжовника Павловской опытной станции ВИР и ведущему сотруднику Центра коллективного пользования научным оборудованием БИН РАН Л. А. Карцевой за проведение работ на СЭМ.

Литература

Агабабян В. Ш. К палиноморфологии рода *Ribes* L. // Известия АН Арм. ССР. Сер. «Биол. науки». 1963. Т. 16, № 4. С. 93–98.

Бурменко Ю. В., Сорокопудов В. Н., Колесников Б. А. и др. Дополнение к морфологии пыльцы сем. *Grossulariaceae* Dumort // Вестник КрасГАУ. 2009. № 1. С. 25–31.

Гаврилова О. А. Морфология пыльцы представителей *Grossulariaceae* и некоторые вопросы систематики семейства // Проблемы эволюции и систематики культурных растений: материалы Междунар. науч. конф. к 120-летию со дня рождения Е. Н. Синской (СПб., 9–11 дек. 2009 г.). СПб., 2009. С. 164–168.

Гаврилова О. А. Морфологические типы пыльцевых зерен *Grossulariaceae* как таксономический признак // Материалы XII Московского совещания по филогении растений, посвященного 250-летию со дня рождения Георга-Франца-Гофмана. М. 2010. С. 228–231.

Гаврилова О. А., Никитин В. В. Палинологическая характеристика восточноевропейских представителей рода *Viola* (*Violaceae*) по данным сканирующей электронной микроскопии // Бот. журн. 2012. Т. 97, № 8. С. 100–115.

Куприянова Л. А., Алешина Л. А. Пыльца и споры растений флоры Европейской части СССР. Л.: Наука, 1972. С. 149–150.

Пожидаев А. Е. Структура многообразия морфологического признака на примере расположения апертур пыльцы цветковых и естественная упорядоченность биологического многообразия, или Что такое многообразие (способы описания и интерпретации) // Тр. Зоол. института РАН. Приложение № 1. 2009. С. 150–182.

Помология. Т. 4: Смородина. Крыжовник. Орел: Изд-во ВНИИСПК, 2009. С. 11–14.

Полова И. С. Морфологические типы пыльцевых зерен у тетраплоидных форм озимой ржи // Изв. СО АН СССР. Сер. «Биол. науки». 1971. Вып. 3. С. 62–65.

Пояркова А. И. Подсем. Ribesioideae / Флора СССР / Ред. В. Л. Комаров. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1939. С. 226–270.

Токарев П. И. Морфология и ультраструктура пыльцевых зерен. М.: КМК, 2002. 51 с.

Тихонова О. А. Особенности биологии и селекционная ценность генофонда черной смородины в условиях Северо-Запада России: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. СПб., 2000. 18 с.

Berger A. A taxonomic review of currant and gooseberries // Techn. Bull. State Agr. Exper. Stat. Geneva. 1924. N 109. 118 p.

Datta K., Chaturvedi M., Ram T. Pollen exine ornamentation in the F₂ generation of an interspecific hybrid of *Chorisia* (Bombacoideae, Malvaceae) in relation to inheritance pattern // Grana. 2006. Vol. 45, N 2. 2006. P. 109–114.

Erdtman G. Pollen morphology and plant taxonomy: Angiosperms. Stockholm, 1952. 539 p.

Franssen A. S., Skinner D. Z., Al-Khatib K., Horak M. I. Pollen morphology differences in *Amaranthus* species and interspecific hybrids // Weed Science, 2001. Vol. 49, N 6, P. 732–737.

Henderson D. M. The hybrid pollen of *Meconopsis x cookei*. // Grana. 1972. Vol. 12, N 1. P. 52–56

Hesse M., Halbritter H., Zetter R. et al. Pollen terminology. An illustrated handbook. Wien; New York: Springer, 2009. 261 p.

Hossain M. M., Inden H., Asahira T. Pollen morphology of interspecific hybrid of *Brassica oleracea* and *B. campestris* // Hort. Science. 1990. Vol. 25, N 1. P. 109–111.

Huang Pu-hwa, Ye Wan-hui. Pollen morphology of *Ribes* L. and its taxonomic significance // Acta Phytotaxonomica Sinica. 1989. Vol. 27, N 5. P. 378–385.

Janczewski E. Monographie des groseilliers *Ribes* L. // Mem. de la Soc. Phys. et d'hist. nat. de Geneva, 1907. Vol. 35, f. 3. P. 200–516.

Karlsdottir L., Hallsdottir M., Thorsson A. Th., Anamthawat-Jonsson K. Characteristics of pollen from natural triploid *Betula* hybrids // Grana. 2008. Vol. 47, N 1. P. 52–59.

Olsson U. A biometric study of the pollen morphology of *Linaria vulgaris* (L.) Miller and *L. repens* (L.) Miller (*Schrophulariaceae*) and their hybrid progeny in F₁ and F₂ generations // Grana. 1974. Vol. 14, Issue 2–3. P. 92–99.

Punt W., Hoen P. P., Blackmore S. et al. Glossary of pollen and spore terminology // Rev. Palaeobot. Palynol. 2007. Vol. 143, N 1–2. P. 1–81.

Rehder A. Manual of cultivated trees and shrubs. Toronto: MacMillan and Co. 1954. 996 p.

Sorensen M. Pollen morphology of species and interspecific hybrids in *Pachyrhizus* Rich ex DC (*Fabaceae: Phaseoleae*) // Rev. Palaeobot. Palynol. 1989. Vol. 61, N 1. P. 319–339

Srivastava V. Pollen morphology of *Cajanus cajan* (L.) Willd. (*Leguminosae*) cultivars and their hybrids // Grana. 1978. Vol. 17, N 2. P. 107–109.

Vafadar M., Attar F., Maroofi H., Mirtadzadini M. Pollen morphology of *Amygdalus* L. (*Rosaceae*) in Iran // Acta Soc. Bot. Poloniae, 2010. Vol. 79, N 1. P. 63–71.

Verbeek-Reuvers A. A. M. L. The Northwest European Pollen Flora, 12 *Grossulariaceae* // Rev. Palaeobot. Palynol. 1977. Vol. 24, N 3. P. 107–116.

Weigend M. *Grossulariaceae* DC // K. Kubitzki. The Families and Genera of Vascular Plants. Berlin: Springer, 2007, P. 168–176.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Гаврилова Ольга Анатольевна

научный сотрудник
Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН
ул. Проф. Попова, 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197376
эл. почта: olgabin@rambler.ru
тел.: (812) 2344512

Тихонова Ольга Анатольевна

ведущий научный сотрудник
ГНУ ВНИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова
Россельхозакадемии
ул. Большая Морская, 42, Санкт-Петербург,
Россия, 190000
эл. почта: o.tikhonova@vir.nw.ru
тел.: (812) 2344512

Гаврилова, Olga

Komarov Botanical Institute of RAS
2, Prof. Popov St., 197376 St. Petersburg, Russia
e-mail: olgabin@rambler.ru
tel.: (812) 2344512

Tikhonova, Olga

Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry,
Russian Academy of Agricultural Sciences
42 Bol'shaya Morskaya St.,
190000 St. Petersburg, Russia
e-mail: o.tikhonova@vir.nw.ru
tel.: (812) 2344512

УДК 546.26:54.3:54-148:577.352.3

ОКИСЛЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА В ВОДНЫХ НАНОДИСПЕРСИЯХ УГЛЕРОДА

**А. С. Горюнов¹, А. Г. Борисова¹, С. П. Рожков¹, Г. А. Суханова¹,
Н. Н. Рожкова²**

¹Институт биологии Карельского научного центра РАН

²Институт геологии Карельского научного центра РАН

Окислительное воздействие углеродных нанодисперсий на белок исследовано путем рассмотрения особенностей спонтанного окисления гемоглобина (автоокисления) в водных дисперсиях трех видов наноуглерода – фуллерена C₆₀, наноалмазов, шунгитового наноуглерода (ShC). Показано, что в отличие от наноалмазов C₆₀ и ShC выступают в отношении гемоглобина как прооксиданты, поскольку их присутствие способно инициировать ускорение реакции окисления гемового железа гемоглобина и устойчивый переход значительной части гемоглобина из окси- в мет-форму. Предполагается, что вероятным механизмом оксидантного действия углеродных наночастиц в водной дисперсии на гемоглобин является их влияние на процесс протонирования дистального гистидина, но не на равновесие мономер-димер-тетрамер в гемоглобине.

Ключевые слова: фуллерен; шунгитовый наноуглерод; наноалмаз; наночастица; нанодисперсия; белок; гемоглобин; автоокисление.

**A. S. Goryunov, A. G. Borisova, S. P. Rozhkov, G. A. Sukhanova,
N. N. Rozhkova. HEMOGLOBIN OXIDATION IN CARBON AQUEOUS
NANODISPERSIONS**

The oxidative effect of carbon nanodispersions on protein has been studied through comparative examination of the spontaneous transition of hemoglobin oxy-form with the heme iron in reduced state Fe(II) into the physiologically inactive met-form with the heme iron in oxidized state Fe(III) (autooxidation) in aqueous dispersions of three nanocarbon types – fullerene C₆₀, nanodiamonds, and shungite nanocarbon (ShC). Unlike nanodiamonds, C₆₀ and ShC have been shown to act as prooxidants in hemoglobin solution since their presence can provide for acceleration of the oxidation reaction of the heme iron in hemoglobin and for steady transition of a considerable part of hemoglobin from the oxy- to the met-form. The effect of carbon nanoparticles on the process of protonation of distal histidine, but not on the monomer-dimer-tetramer equilibrium of hemoglobin in aqueous dispersion has been suggested as a probable mechanism of the oxidation activity of the nanoparticles in the protein.

Key words: fullerene; shungite nanocarbon; nanodiamond; nanoparticles; nanodispersion; protein; hemoglobin; autooxidation.

Введение

Углеродные наноматериалы, в том числе в форме наночастиц и нанодисперсий, находят все более широкое применение в различных сферах человеческой деятельности от производства продукции бытового, гигиенического и промышленного назначения до научных исследований [Panessa-Warren et al., 2009; Alpatova et al., 2010]. К настоящему времени накоплено большое количество данных о биологическом действии наноматериалов. Среди обнаруженных эффектов – влияние диспергированных наноструктур на водные организмы, воздействие на процессы легочного дыхания и кожные реакции, расщепление ДНК раковых клеток, способность вызывать некроз и апоптоз, а также обуславливать пролиферацию и дифференциацию стволовых клеток [Savolainen, Vainio, 2011; Turco et al., 2011; Uo et al., 2011]. В связи с этим вопрос о молекулярных механизмах биологической активности наночастиц при взаимодействии наноматериалов с живыми системами, особенно в водных дисперсиях – как среде, в которой только и может проявляться такая активность, становится все более актуальным. Один из важнейших механизмов действия биологически активных веществ обусловлен их окислительно-восстановительными свойствами. Известно, что углеродные материалы способны эффективно влиять на окислительные процессы в присутствии воды и кислорода воздуха [Лазаров, Ангелова, 1991]. Свойства фуллеренов C_{60} , как одной из форм нанougлерода, исследованы в многочисленных работах в связи с их вероятной токсичностью [Yamago et al., 1995; Nakamura et al., 1996; Nakajima et al., 1996; Isobe et al., 2006; Xia et al., 2006] и окислительной активностью [Chiang et al., 1995; Yu et al., 1997; Gharbi et al., 2005]. При этом оказалось, что C_{60} может способствовать генерации активных форм кислорода (АФК) спонтанно и за счет фотоактивации (главным образом ультрафиолетовой), возможно, в результате появления пар электрон-«дырка», благодаря поверхностным дефектам и включениям [Arbogast et al., 1991, 1992]. Однако это происходит только в органических неполярных растворителях. Кроме того, фуллерены способны выступать как акцепторы электронов. В водной же среде – водных суспензиях агрегатов C_{60} (аqui/ nC_{60}) – ни синглетного кислорода, ни супероксид-радикала обнаружено не было [Hotze et al., 2008]. В то же время имеются данные, свидетельствующие, что aqui/ nC_{60} оказывают окислительное воздействие на клетки и их компоненты [Fang et al., 2007; Lyon et al., 2008; Lyon, Alvarez, 2008]. Механизм этого воздействия ос-

тается неясным. Целью настоящей работы было сравнительное изучение окислительного воздействия водных дисперсий различных форм нанougлерода – C_{60} , наноалмазов, шунгитового нанougлерода – на молекулу гемоглобина (Hb) для выяснения механизма этого воздействия. Особенностью предлагаемого подхода является то, что в качестве предмета исследования выступает не собственное окислительное воздействие углеродных наночастиц на белок, а их влияние на уже имеющий место в системе окислительно-восстановительный процесс – спонтанное превращение Hb в окси-форме с железом гема в восстановленном состоянии Fe(II) в физиологически неактивную мет-форму Hb с железом гема в окисленном состоянии Fe(III) в водной среде (т. н. автоокисление Hb).

Материалы и методы

Работа проведена с использованием приборной базы Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН.

Исследовался нанougлерод в форме водных нанодисперсий фуллерена C_{60} , ультрадисперсных наноалмазов детонационного синтеза (наноалмазов) и шунгитового углерода (ShC). Водная нанодисперсия фуллеренов представляет собой дисперсию нанокластеров – гидратированных комплексов из нескольких десятков молекул C_{60} диаметром 0,7 нм. Размер нанокластеров молекул фуллерена в водной нанодисперсии (аqui/ nC_{60}) – 70–100 нм.

Шунгитовый нанougлерод [Buseck et al., 1992; Buseck, 2002] в водной дисперсии представлен наночастицами (90–100 нм), построенными из многослойных наноглобул <10 нм, которые в свою очередь образованы базовыми структурными элементами – непланарными графеновыми фрагментами размером <1 нм. Эти фрагменты являются стабилизаторами наноглобул в водной среде, а также формируют электронную и пространственную структуру наночастиц шунгитового углерода [Рожкова, 2011]. Нанокластеры (наночастицы) шунгитового углерода стабилизированы в устойчивых водных дисперсиях и агрегированы при конденсации дисперсии.

Использовались водные коллоидные нанодисперсии фуллерена (аqui/ nC_{60}), приготовленные по методике Г. В. Андриевского [Andrievsky et al., 1995], и нанодисперсии шунгитового углерода, полученные по аналогичной методике [Рожков и др., 2007; Rozhkova et al., 2007; Рожкова, 2011].

Водные нанодисперсии алмазов были получены с использованием ультразвукового сонолиза при концентрации углерода до 0,18 мг/мл [Osawa, 2008]. Размер первичных наноалмазов – $4,6 \pm 0,8$ нм. Они образуют ассоциаты – кластеры наноалмазов (наночастицы) размерами от 90 нм.

В качестве модели биологического объекта – вероятной мишени воздействия углеродных наноматериалов – использовали молекулы кислород-связывающего белка Hb человека (Hb A, молекулярная масса 68 кД, размер ~6 нм), полученного по стандартной методике из крови взрослого человека.

Дисперсии наночастиц в различных концентрациях добавлялись в раствор Hb и выдерживались заданное время. Спонтанное окисление (автоокисление) Hb в водном растворе и в нанодисперсиях углерода оценивалось по уровню равновесия структуры Hb между окисленной и восстановленной (мет – окси, $Fe^{3+} - Fe^{2+}$) формами. Уровень равновесия определялся спектрофотометрически в ультрафиолетовом-видимом диапазоне в зависимости от концентрации наноуглерода, диспергированного в водном растворе белка, с тем чтобы охарактеризовать эффекты, связанные с проявлением окислительных свойств трех форм наноуглерода. Спектры поглощения гемоглобина регистрировались на спектрофотометре Specord M40 в диапазоне длин волн 350–650 нм.

Концентрации окси- и метгемоглобина рассчитывали на основании уравнений для спектрофотометрического анализа смесей гемоглобинов [Venesh et al., 1973], основанного на данных по поглощению при длинах волн 560, 576, 630 нм. Кинетика спонтанного окисления Hb рассматривалась при температуре 43 °С и фиксированных значениях pH в интервале 5–8. Температура поддерживалась с использованием водного термостата. Для перевода Hb в раствор с заданным значением pH раствор белка пропускали через колонку 1,5x50 см, наполненную гелем Sefadex G-25. В экспериментах использовались следующие буферные системы: 1) 0,01M натрий-фосфатный буфер, pH 7,9; 2) 0,1M натрий-ацетатный буфер, pH 5,2.

После колонки получали высокоочищенный препарат Hb. Чтобы убедиться, что полученный Hb находится в окси-форме, регистрировали полные оптические спектры поглощения (250–650 нм) раствора Hb. По кинетическим кривым $\ln N = \ln N_0 - K \cdot t$, где N_0 и N – концентрации Hb в начальный момент времени t_0 и момент времени t соответственно, может быть рассчитана константа скорости реакции K автоокисления Hb [Борисова, Горюнов, 2007; Борисова, 2008].

Фактором, ограничивающим время наблюдения автоокисления, также является денатурация Hb, поскольку наблюдение проводилось при температуре 43 °С. Отсутствие денатурации контролировалось методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (Nano DSC, TA-Instruments).

Результаты и обсуждение

Обратимое, но прочное связывание молекулярного кислорода с гемовым железом $Fe(II)$ – основа функционирования Hb. Однако оксигенированная форма Hb может спонтанно окисляться до физиологически неактивной метформы $Fe(III)$, поэтому метаболизм эритроцитов главным образом направлен на поддержание Hb в ферро-состоянии $Fe(II)$. Скорость реакции автоокисления зависит от pH среды, температуры, а также от присутствия восстановителей и окислителей.

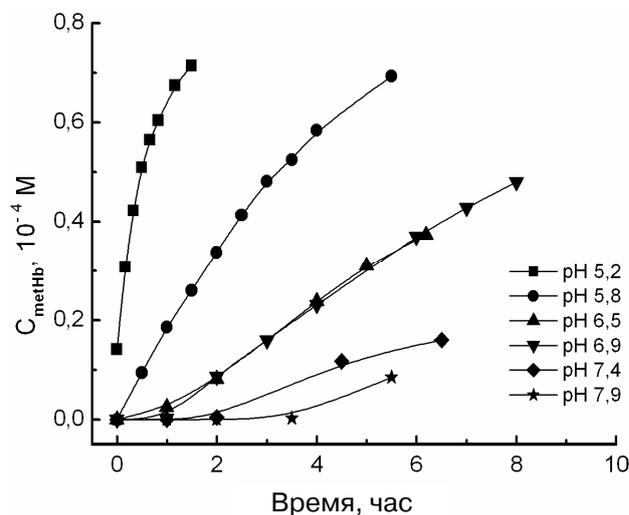


Рис. 1. Зависимости концентрации окисленного гемоглобина (метгемоглобина) ($C_{метHb}$) от времени при различных pH белкового раствора, отражающие кинетику реакции спонтанного окисления гемоглобина (автоокисления). Исходная концентрация оксигемоглобина 1,5 мг/мл

Зависимости концентрации мет Hb в реакционной среде от времени, отражающие кинетику окисления железа гема, представлены на рисунке 1. Окси Hb окисляется достаточно быстро в условиях повышенной температуры, и особенно быстро – при низких значениях pH раствора. Кинетические кривые снимались за разные промежутки времени, поскольку регистрация кинетики проводилась до достижения начальных стадий насыщения или до момента, когда форма кривой однозначно указывала на недостижимость насыщения, что в большой степени зависит от pH. Так, в среде с pH 5,2 уже в начальный

момент измерения содержится некоторое количество окисленного Hb. Начиная от физиологических значений pH порядка 7,4 спонтанное окисление Hb идет медленнее, так что в течение нескольких часов наблюдения мет-форма Hb в растворе вообще не регистрируется.

На рисунке 2 (а, б) представлены кинетические зависимости в условиях, когда в среду был добавлен коллоид фуллерена (aq/nC_{60}); для сравнения взяты значения pH 5,2 и 7,9. Видно, что во всех случаях концентрация окисленного Hb в присутствии C_{60} существенно повышается, причем в прямой зависимости от концентрации C_{60} . Тем самым проявляется прооксидантное действие aq/nC_{60} . Происходит это не только за счет ускорения автоокисления, но и за счет того, что присутствие фуллерена в реакционной среде вызывает окисление некоторой части Hb в начальный момент времени – еще до начала прогрева реакционной смеси.

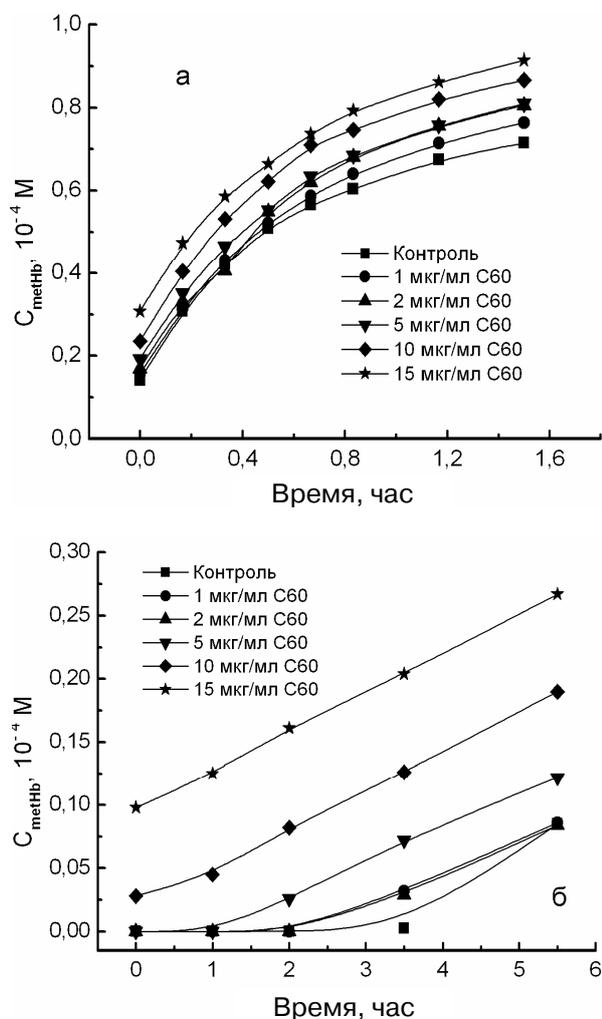


Рис. 2. Кинетические кривые окисления гемоглобина в нанодисперсиях фуллерена C_{60} (aq/nC_{60}) различных концентраций при pH 5,2 (а) и pH 7,9 (б). Исходная концентрация оксигемоглобина 1,5 мг/мл

По величине эффекта при двух значениях pH различий не наблюдается: концентрация мет Hb увеличивается на $0,5\text{--}0,7 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ в обоих случаях. Однако при низких значениях pH форма и наклон кинетических кривых практически не зависят от концентрации фуллерена. При pH 5,2 все зависимости имеют одинаковый вид: это кривые, выходящие на насыщение, с большей скоростью окисления Hb на начальных отрезках времени и меньшей – на последующих, что указывает на снижение скорости окисления со временем наблюдения, в то время как при повышении pH имеет место зависимость от концентрации – при pH 7,9 формы зависимостей различны для разных концентраций C_{60} . При повышении концентрации фуллерена форма кривых изменяется и становится практически прямолинейной, наклон кривых, отражающий скорость окисления, также изменяется. При отсутствии C_{60} окисления не наблюдается в течение первых 3,5 ч наблюдения, и лишь в дальнейшем происходит умеренное – до $0,06 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ мет Hb – окисление. При 1 и 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ C_{60} окисление, регистрируемое через 3,5 ч, уже весьма значительно, что однозначно указывает на ускорение процесса окисления железа гема даже в присутствии малых количеств aq/nC_{60} . При 5, 10 и 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ C_{60} наблюдается тот же эффект, что и при pH 5,2, с той лишь разницей, что при pH 7,9 даже для 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ C_{60} величина эффекта соответствует уровню контроля, имеющему место при pH 5,2. Кроме того, факт, что зависимости при pH 7,9 для 5, 10 и 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ C_{60} имеют характер, близкий к линейному, означает, что скорость окисления не меняется со временем.

Все эти особенности, очевидно, связаны не столько с влиянием aq/nC_{60} на кинетику окисления Hb, сколько с различиями в характере процесса окисления при двух значениях pH, поскольку амплитуды эффектов при pH 5,2 и pH 7,9 близки. Кроме того, при pH 7,9 окисление происходит столь медленно, что количество окисленного мет Hb невозможно зарегистрировать в течение нескольких часов наблюдения как в контроле, так и при малых концентрациях aq/nC_{60} . В присутствии же 5–15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aq/nC_{60} это количество существенно возрастает, и эффект становится заметен. И все же при pH 7,9 скорость окисления даже в присутствии aq/nC_{60} остается малой, что и не позволяет проявиться какому-либо насыщению, как это происходит при pH 5,2.

Кривые при pH в интервале от 5,2 до 7,9 имеют форму, промежуточную между кривыми при pH 5,2 и pH 7,9, поэтому соответствующие результаты здесь не приведены.

На рисунке 3 (а, б) представлены кинетические кривые спонтанного окисления Hb для случая, когда в водном растворе вместе с белком присутствовал диспергированный шунгитовый нанокристалл углерода (ShC). Для сравнения взяты значения pH 5,2 и 7,9. Характер зависимостей для ShC в значительной степени аналогичен тому, который наблюдается для фуллерена и по величине эффекта, и по форме кривых. Некоторые же различия состоят в наклоне кривых и, соответственно, скорости реакции окисления Hb. Это позволяет предполагать и аналогию механизма воздействия нанодисперсий этих двух форм углерода на процесс окисления Hb.

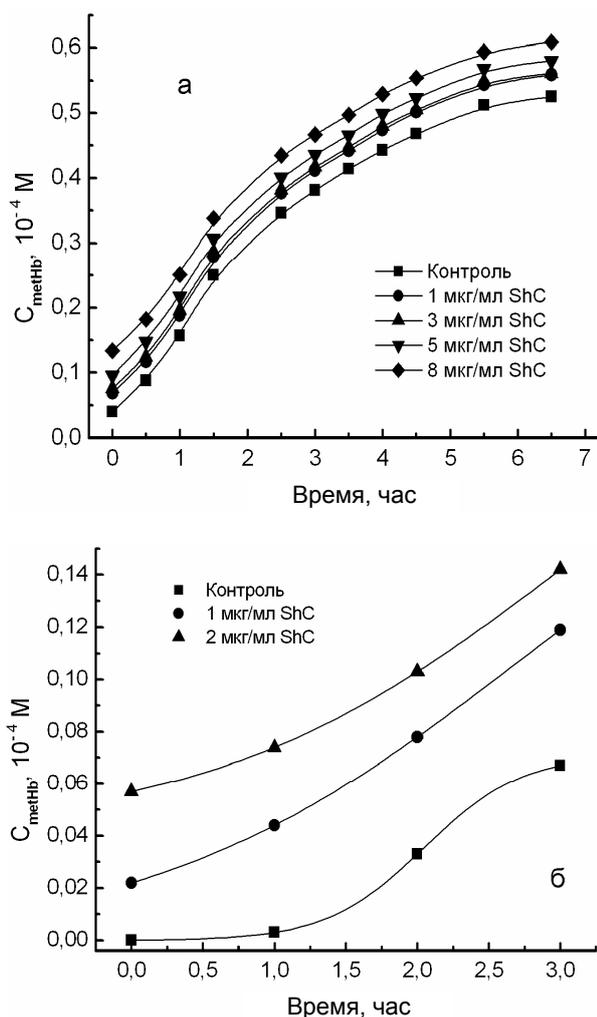


Рис. 3. Кинетические кривые окисления гемоглобина в нанодисперсиях шунгитового углерода (ShC) различных концентраций при pH 5,2 (а) и pH 7,9 (б). Исходная концентрация оксигемоглобина 1,5 мг/мл

На рисунке 4 показаны данные о кинетике окисления Hb в водных дисперсиях нанокристаллов углерода (НА) при pH 5,2. В этом случае зависимость вида кривых и скорости автоокисления от концентрации НА оказалась крайне слабо выра-

женной: наклон и форма кривых практически не зависели от концентрации нанокристаллов углерода в дисперсии, т. е. как концентрация окисленного Hb в начальный момент времени, так и скорость реакции окисления очень мало менялись при изменении концентрации этой формы нанокристалла углерода. В отличие от aqC_{60} и ShC присутствие нанокристаллов углерода в реакционной среде не вызывало и мгновенного окисления части Hb при внесении нанокристалла углерода в белковый раствор. Данные, полученные при других значениях pH, здесь не приводятся, поскольку они свидетельствуют об отсутствии какого-либо влияния нанокристаллов углерода на процесс окисления Hb.

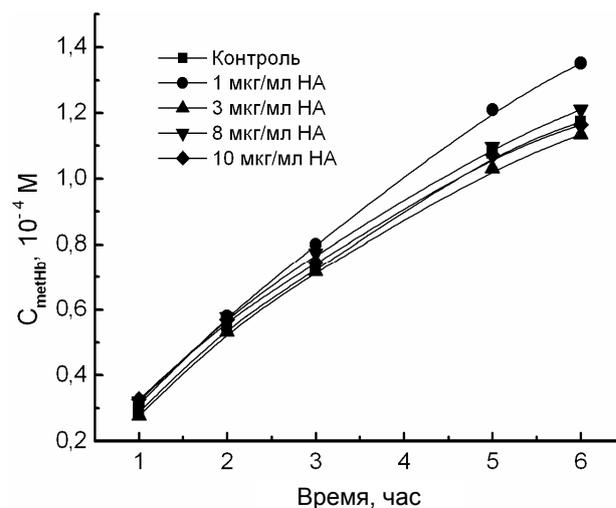


Рис. 4. Кинетические кривые окисления гемоглобина в дисперсиях нанокристаллов углерода различных концентраций при pH 5,2. Исходная концентрация оксигемоглобина 1,5 мг/мл

Таким образом, присутствие в белковом растворе двух из трех исследованных форм нанокристалла углерода – aqC_{60} и ShC – приводит к тому, что концентрация окисленного Hb существенно повышается концентрационно-зависимым образом за счет того, что наличие этих форм нанокристалла углерода в реакционной среде вызывает окисление некоторой части Hb уже в процессе их внесения в раствор. Более того, даже при высоких pH (физиологических и выше), когда автоокисление почти не наблюдается, присутствие aqC_{60} и ShC в растворе способно инициировать ускорение реакции окисления гемоглобина, а вместе с ней и весьма устойчивый процесс перехода значительной части окси Hb в мет Hb, т. е. в данном случае и aqC_{60} , и ShC выступают как прооксиданты.

Известно, что спонтанное окисление (автоокисление) Hb протекает как реакция окисления железа и восстановления кислорода до супероксид-аниона с превращением окси Hb в мет Hb.

Она сопровождается нуклеофильным вытеснением супероксид-аниона входящей молекулой воды и требует протонирования имидазольной группы дистального гистидина, т. е. происходит с участием H^+ . Поэтому при понижении pH автоокисление облегчается [Benesh et al., 1973], что объясняет типичный характер изменения вида зависимости концентрации окисленного Hb от времени при разных pH (рис.1). Это позволяет предположить, что две из трех рассматриваемых нами форм наноуглерода обладают свойством способствовать процессу протонирования дистального гистидина Hb в водной дисперсии, и это свойство играет важную роль в механизме окислительного воздействия нанодисперсии углерода на вводимый в нее Hb.

С другой стороны, известно, что способность Hb к автоокислению существенно зависит от степени агрегации гемоглобина: димеры и отдельные субъединицы значительно более подвержены автоокислению [Benesh et al., 1973]. При этом имеются данные о том, что наночастицы способны воздействовать на степень агрегации белка в растворе [Nel et al., 2009] и тем самым на скорость автоокисления. В то же время полученные нами ранее данные по гель-фильтрации белков в нанодисперсиях углерода [Goryunov et al., 2011] показывают, что Hb, в отличие, например, от сывороточного альбумина, не образует сколько-нибудь устойчивых комплексов с наночастицами углерода. Это, скорее всего, означает, что и влияние наночастиц на агрегацию данного белка не может быть существенным, тем более и сам Hb не относится к белкам со склонностью к агрегации. Кроме того, равновесие димер-тетрамер или мономер-тетрамер в гемоглобине не может устанавливаться мгновенно. Это активационный процесс, характеризующийся своей кинетикой. Он неизбежно должен был бы проявиться, во-первых, в отличии формы кинетических кривых контрольных образцов и образцов, содержащих наноуглерод, при любых значениях pH, чего в эксперименте обнаружено не было. Во-вторых, окисления некоторой части гемоглобина уже в начальный момент времени также не могло бы наблюдаться. Поэтому влияние нанодисперсии углерода на автоокисление Hb через воздействие на его агрегацию является маловероятным механизмом эффекта.

Другой возможный механизм токсичности водной дисперсии C_{60} (aqu/nC_{60}) по отношению к биологическим системам может быть связан с тем, что водная нанодисперсия C_{60} способна инициировать независимые от активных форм кислорода окислительные повреждения [Fang et al., 2007; Lyon et al., 2008; Lyon, Alvarez,

2008], которые приводят к изменению электропотенциала клеточной мембраны, нарушению клеточного дыхания и окислению белка. Последнее проявляется в снижении количества SH-групп белка, что свидетельствует о влиянии на процессы с участием протонов, на процессы водородного обмена между интерьером белковой глобулы и свободным растворителем. Это может играть важную роль и в процессе протонирования дистального гистидина, который находится в интерьере молекулы Hb.

Различие в эффекте наноалмазов и двух других типов наноуглерода, вероятно, связано с тем, что наноалмаз является нанокристаллом, тогда как фуллерены и базовый структурный элемент шунгитового наноуглерода являются молекулярными структурами. Это может обуславливать различную степень их вовлечения в процессы с участием протонов в водной среде.

Таким образом, наиболее вероятным механизмом прооксидантного действия углеродных наночастиц на гемоглобин в водной дисперсии является влияние на процесс протонирования дистального гистидина, а механизмом их прооксидантного действия вообще является способность влиять на процессы с участием протонов в водной среде.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант № 13-03-00422).

Литература

- Борисова А. Г., Горюнов А. С. Гемоглобины позвоночных: сравнительный анализ физико-химических свойств // Труды КарНЦ РАН. 2007. Вып. 11. С. 10–14.
- Борисова А. Г. Сравнительный анализ различных гемоглобинов: автоокисление и спектральные свойства // Журн. эвол. биохим. физиол. 2008. Т. 44, № 4. С. 449–450.
- Лазаров Л., Ангелова Г. Структура и реакции углей. София: Издательство Болгарской АН, 1991. 231 с.
- Рожков С. П., Ковалевский В. В., Рожкова Н. Н. Фуллеренсодержащие фазы, получаемые из водных дисперсий наночастиц углерода // Журн. физ. химии. 2007. Т. 81, № 6. С. 1089–1096.
- Рожкова Н. Н. Наноуглерод шунгитов. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2011. 100 с.
- Alpatova A. L., Shan W., Babica P., Upham B. L., Rogensues A. R., Masten S. J., Drown E., Mohanty A. K., Alocilja E. C., Tarabara V. V. Single-walled carbon nanotubes dispersed in aqueous media via non-covalent functionalization: effect of dispersant on the stability, cytotoxicity, and epigenetic toxicity of nanotube suspensions // Water Res. 2010. Vol. 44, N 2. P. 505–520.
- Andrievsky G. V., Kosevich M. V., Vovk O. M., Shelkovsky V. S., Vashenko L. A. On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1995. Vol. 12. P. 1281–1282.

- Arbogast J. W., Darmanyan A. P., Foote C. S., Rubin Y., Diederich F. N., Alvarez M. M., Anz S. J., Whetten R. L. Photophysical properties of C₆₀ // J. Phys. Chem. 1991. Vol. 95, N 1. P. 11–12.
- Arbogast J. W., Foote C. S., Kao M. Electron-transfer to triplet C₆₀ // J. Am. Chem. Soc. 1992. Vol. 114, N 6. P. 2277–2279.
- Benesh R. E., Benesh R., Yung S. Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures // Analytical Biochem. 1973. Vol. 55, N 1. P. 245–248.
- Buseck P. R., Tsipursky S. J., Hettich R. Fullerenes from the geological environment // Science. 1992. Vol. 257, N 5067. P. 215–217.
- Buseck P. Geological Fullerenes: review and analysis // Earth and Planetary Science Letters. 2002. Vol. 203, N 3–4. P. 781–792.
- Chiang L. Y., Lu F. J., Lin J. T. Free-radical scavenging activity of water-soluble fullereneols // J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1995. Vol. 12. P. 1283–1284.
- Fang J., Lyon D. Y., Wiesner M. R., Dong J., Alvarez P. J. Effect of a fullerene water suspension on bacterial phospholipids and membrane phase behavior // Environ. Sci. Technol. 2007. Vol. 41, N 7. P. 2636–2642.
- Gharbi N., Pressac M., Hadchouel M., Szwarc H., Wilson S. R., Moussa F. Fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity // Nano Lett. 2005. Vol. 5, N 12. P. 2578–2585.
- Goryunov A. S., Rozhkov S. P., Borisova A. G., Sukhanova G. A. Interaction and properties of blood proteins in shungite nanocarbon dispersions // Nanobiophysics: fundamental and applied aspects: abstr. 2nd Internat. conference. (Kyiv, 6–9.10.2011) P. 66.
- Hotze E. M., Labille J., Alvarez P., Wiesner M. R. Mechanisms of photochemistry and reactive oxygen production by fullerene suspensions in water // Environ. Sci. Technol. 2008. Vol. 42, N 11. P. 4175–4180.
- Isobe H., Tanaka T., Maeda R., Noiri E., Solin N., Yudasaka M., Iijima S., Nakamura E. Preparation, purification, characterization, and cytotoxicity assessment of water-soluble, transition-metal-free carbon nanotube aggregates // Angew. Chem., Int. Ed. 2006. Vol. 45, N 40. P. 6676–6680.
- Lyon D. Y., Brunet L., Hinkal G. W., Wiesner M. R., Alvarez P. J. Antibacterial activity of fullerene water suspensions (nC₆₀) is not due to ROS-mediated damage // Nano Lett. 2008. Vol. 8, N 5. P. 1539–1543.
- Lyon D. Y., Alvarez P. J. Fullerene water suspension (nC₆₀) exerts antibacterial effects via ROS-independent protein oxidation // Environ. Sci. Technol. 2008. Vol. 42, N 21. P. 8127–8132.
- Nakajima N., Nishi C., Li F. M., Ikada Y. Photo-induced cytotoxicity of water-soluble fullerene // Fullerene Sci. Technol. 1996. Vol. 4, N 1. P. 1–19.
- Nakamura E., Tokuyama H., Yamago S., Shiraki T., Sugiura Y. Biological activity of water-soluble fullerenes. Structural dependence of DNA cleavage, cytotoxicity, and enzyme inhibitory activities including HIV-protease inhibition // Bull. Chem. Soc. 1996. Vol. 69, N 8. P. 2143–2151.
- Nel A. E., Mädler L., Velegol D., Xia T., Hoek M. V. H., Somasundaran P., Klaessig F., Castranova V., Thompson M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface // Nature Materials. 2009. Vol. 8, N 7. P. 543–557.
- Osawa E. Monodisperse single nanodiamonds particulates // Pure Appl. Chem. 2008. Vol. 80, N 7. P. 1365–1379.
- Panessa-Warren B. J., Maye M. M., Warren J. B., Crosson K. M. Single walled carbon nanotube reactivity and cytotoxicity following extended aqueous exposure // Environ Pollut. 2009. Vol. 157, N 4. P. 1140–1151.
- Rozhkova N. N., Gribanov A. V., Khodorkovskii M. A. Water mediated modification of structure and physical chemical properties of nanocarbons // Diamond Relat. Mater. 2007. Vol. 16, N 12. P. 2104–2108.
- Savolainen K., Vainio H. Health risks of engineered nanomaterials and nanotechnologies // Duodecim. 2011. Vol. 127, N 11. P. 1097–1104.
- Turco R. F., Bischoff M., Tong Z. H., Nies L. Environmental implications of nanomaterials: are we studying the right thing? // Curr. Opin. Biotechnol. 2011. Vol. 22, N 4. P. 527–532.
- Uo M., Akasaka T., Watari F., Sato Y., Tohji K. Toxicity evaluations of various carbon nanomaterials // Dent. Mater. J. 2011. Vol. 30, N 3. P. 245–263.
- Xia T., Kovoichich M., Brant J., Hotze M., Sempf J., Oberley T., Sioutas C., Yeh J. I., Wiesner M. R., Nel A. E. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm // Nano Lett. 2006. Vol. 6, N 8. P. 1794–1807.
- Yamago S., Tokuyama H., Nakamura E., Kikuchi K., Kananiishi S., Sueki K., Nakahara H., Enomoto S., Ambe F. In-Vivo Biological Behavior of a Water-Miscible Fullerene ¹⁴C Labeling, Absorption, Distribution, Excretion and Acute Toxicity // Chem. Biol. 1995. Vol. 2, N 6. P. 385–389.
- Yu C., Bhonsle J. B., Wang L. Y., Lin J. G., Chen B.-J., Chiang L. Y. Synthetic aspects and free-radical scavenging efficiency of polyhydroxylated C₆₀ // Fullerene Sci. Technol. 1997. Vol. 5, N 7. P. 1407–1421.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Горюнов Андрей Сергеевич

ведущий научный сотрудник, к. ф.-м. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: goryunov@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769810

Goryunov, Andrey

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: goryunov@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769810

Борисова Александра Григорьевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: borisova@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769810

Рожков Сергей Павлович

ведущий научный сотрудник, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: rozhkov@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769810

Суханова Галина Антоновна

главный физик
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: sukhanova@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769810

Рожкова Наталья Николаевна

заведующая лабораторией, к. т. н.
Институт геологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: rozhkova@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 780189

Borisova, Alexandra

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: borisova@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769810

Rozhkov, Sergey

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: rozhkov@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769810

Sukhanova, Galina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: sukhanova@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769810

Rozhkova, Natalia

Institute of Geology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: rozhkova@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 780189

УДК 575.827.2

ДЕЙСТВИЕ ЕСТЕСТВЕННОГО ОТБОРА НА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫЕ ЛОКУСЫ АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ (*SALMO SALAR* L.)

К. Ю. Зуева¹, М. Ю. Озеров¹, А. Е. Веселов², К. Р. Приммер¹

¹Департамент биологии, подразделение генетики и физиологии,
Университет Турку, Финляндия

²Институт биологии Карельского научного центра РАН

Исследование генетических основ иммунного ответа и, в частности, генетических механизмов, обуславливающих устойчивость или восприимчивость организмов к патогенам, является нетривиальной задачей, требующей особого подхода к выбору объектов и методики исследования. В данной работе мы сравнили действие естественного отбора на иммунокомпетентные и нейтральные локусы атлантического лосося (*Salmo salar* L.). Было показано, что направленный отбор действует с большей интенсивностью на генетические маркеры, связанные с иммунной функцией, чем на нейтральные маркеры. Действие патоген-индуцированного отбора подтверждается также наличием корреляции между частотами аллелей иммунных локусов (EST-маркеры и MHCII) и чувствительностью к паразиту *Gyrodactylus salaris*, а также соленостью и температурой воды. Все маркеры были информативны, что подтверждает применимость EST-локусов для изучения действия естественного отбора, а также свидетельствует в пользу обоснованности использования неравномерной интенсивности отбора в популяциях как «маркера» для поиска генов, кодирующих иммунный ответ организма-хозяина.

Ключевые слова: естественный отбор, эволюция, иммуногенетика, атлантический лосось.

K. Yu. Zueva, M. Yu. Ozerov, A. E. Veselov, C. R. Primmer. NATURAL SELECTION AFFECTING IMMUNE-RELATED LOCI IN ATLANTIC SALMON (*SALMO SALAR* L.)

Revealing the genetic basis of immune response and, particularly, the genetic mechanisms of pathogen resistance or susceptibility is a challenging task, which requires a careful choice of model species and methodology. We compared natural selection pressure affecting immune-relevant and neutral markers of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). The genetic loci associated with immune function were under stronger selective pressure compared to neutral markers. Pathogen-driven selection is additionally indicated by the existing correlation between immune loci (EST-markers and MHCII) allele frequencies and population susceptibility to the parasite *Gyrodactylus salaris*, along with water salinity and temperature. All immune markers were informative, indicating EST-loci might be used for studies of natural selection. Importantly, natural selection itself might be used as a “marker” while searching for genes responsible for host immune response.

Key words: natural selection, evolution, immunogenetics, Atlantic salmon.

Введение

Большинство организмов постоянно находятся под воздействием целого ряда патогенов, в частности паразитов. Устойчивость к паразиту является необходимым условием выживания популяции или же вида-хозяина в целом, в силу чего гены, кодирующие факторы иммунных реакций, а также сцепленные с ними локусы (иммунные локусы) находятся под более интенсивным воздействием естественного отбора, нежели нейтральные маркеры [Lanfegors et al., 2001; Landry, Bernatchez, 2001; Dionne et al., 2007; Fumagalli et al., 2009]. Большинство работ в этом направлении связано с изучением генов главного комплекса гистосовместимости (МНС). МНС содержит гены, обуславливающие определенные стадии иммунного ответа у позвоночных животных, и находится под интенсивным действием естественного отбора [Piertney, Oliver, 2006; Aguilar et al., 2004]. Тем не менее для детального понимания динамики заболеваний и степени, с которой естественный отбор влияет на иммунитет, необходим анализ более широкого спектра иммунных маркеров помимо МНС [Acevedo-Whitehouse, Cunningham, 2006].

Объектом нашего исследования является атлантический лосось (*Salmo salar* L.). Этот вид лососевых рыб интересен с точки зрения исследований патоген-индуцированного отбора и взаимоотношений паразит-хозяин по нескольким причинам. Прежде всего, атлантический лосось является ценным промысловым видом и имеет первостепенное значение с экономической точки зрения. В то же время этот вид достаточно уязвим и требует мер по его сохранению [Asplund et al., 2004]. К настоящему времени атлантический лосось исчез или находится под угрозой исчезновения во многих частях его первоначального ареала. Поэтому популяции северо-запада России и Эстонии, а именно бассейнов Балтийского, Белого и Баренцева морей, чрезвычайно ценны для сохранения этого вида на территории Европы. К факторам, угрожающим лососю, можно отнести чрезмерный вылов, загрязнение водоемов, а также заражение паразитами, например, чрезвычайно опасным представителем плоских червей *Gyrodactylus salaris* (Monogenea). Европейские популяции атлантического лосося характеризуются разной восприимчивостью к *G. salaris*. Одно из возможных объяснений кроется в истории последнего оледенения и последующей реколонизации региона. [Olafsdóttir et al., 2007; Rogers, 2007]. Устойчивость к паразиту у балтийского лосося и почти полная резистентность к нему у ладож-

ской популяции могли возникнуть во время последнего ледникового максимума (приблизительно 26 т. л. н.) как адаптация к совместному существованию в пресноводных рефугиумах [Kuusela et al., 2007, 2009]. Баренцевоморские и беломорские популяции возникли в результате реколонизации этих бассейнов лососем из восточных и западных частей Атлантического океана и, соответственно, остались восприимчивы к паразиту [Asplund et al., 2004; Tonteri et al., 2009]. Эти данные позволяют предположить, что *G. salaris* может быть одним из направляющих факторов отбора по иммунным локусам, действующего с разной интенсивностью в разных по происхождению популяциях. Кроме того, на отбор по иммунным участкам ДНК могут оказывать влияние и характеристики окружающей среды, т. к. с ними связана жизнеспособность паразита. Например, выживаемость *G. salaris* падает пропорционально росту солености [Bakke, 2002]. Температура также является важным фактором, т. к. видовое разнообразие паразитов увеличивается с севера на юг [Guernier et al., 2004; Tonteri et al., 2010].

Не менее важен и тот факт, что для лососевых рыб на данный момент наработано большое количество молекулярных данных, например EST-гены (короткие последовательности комплементарной ДНК, расположенные рядом или в кодирующих частях генома); некоторые из них связаны с иммунным ответом [Vasemagi et al., 2005; Tonteri et al., 2008].

В настоящей работе мы продолжили исследование, начатое Анни Тонтери (Anni Tonteri) с соавторами [Tonteri et al., 2010]. В нем рассматривался вопрос, испытывают ли 18 микросателлитных локусов, сцепленных с иммунными генами, более интенсивное давление естественного отбора по сравнению с нейтральными маркерами (без известной функции). Кроме того, была изучена степень корреляции характеристик окружающей среды с иммунными маркерами, в сравнении с нейтральными локусами. Как и предполагалось, было показано, что отбор оказывает более выраженное действие на иммунные локусы; также была выявлена корреляция частот аллелей иммунных локусов с температурой воды и географической широтой. Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что несущие иммунную функцию участки ДНК находятся под более интенсивным действием естественного отбора, нежели нейтральные маркеры. Тем не менее эти результаты нуждаются в дополнительной проверке, желательно с использованием большей выборки, что и стало целью настоящего исследования.

В данной работе мы увеличили число анализируемых популяций лосося до 17 (включая 8 популяций, исследованных Tonteri et al., 2010). Изученные популяции лосося нерестятся в реках северо-западной России и Эстонии и значительно различаются по степени чувствительности к *Gyrodactylus salaris*. Помимо этого водные бассейны также отличаются по солености и температуре. В сравнении с предыдущим исследованием были дополнительно проанализированы такие характеристики, как температура воды в зимний период (январь) и температура воздуха летом (июль) и зимой (январь). Кроме того, чтобы выявить локусы, значительно отклоняющиеся от остальных по степени действия на них естественного отбора, мы использовали метод, основанный на иерархическом анализе [Excoffier et al., 2009].

Корреляция напряженности естественного отбора с функциями генов – чрезвычайно важная и интересная область исследований. Целью данной работы являлось выяснение зависимости напряжения естественного отбора от

функции использованных маркеров. Ее раскрытие позволит внести важный вклад в понимание межпопуляционных различий, обусловленных чувствительностью атлантического лосося к паразиту *Gyrodactylus salaris*.

Материалы и методы

Пробы и генетические маркеры

Всего было изучено 417 особей атлантического лосося, воспроизводящегося в 17 реках бассейнов Ладожского озера, Балтийского, Белого и Баренцева морей (рис. 1). Пробы молоди были собраны с помощью электролова (Fa-2, Норвегия) в период с 1997 по 2005 гг. Методика выделения ДНК описана в работе А. Тонтери с соавторами [Tonteri et al., 2005, 2009].

Всего было исследовано 19 микросателлитных маркеров, включая 12 иммунных и 7 нейтральных локусов (табл. 2). Для десяти маркеров связь с иммунной системой была показана ранее [Tonteri et al., 2008]. Иммунокомпетентный

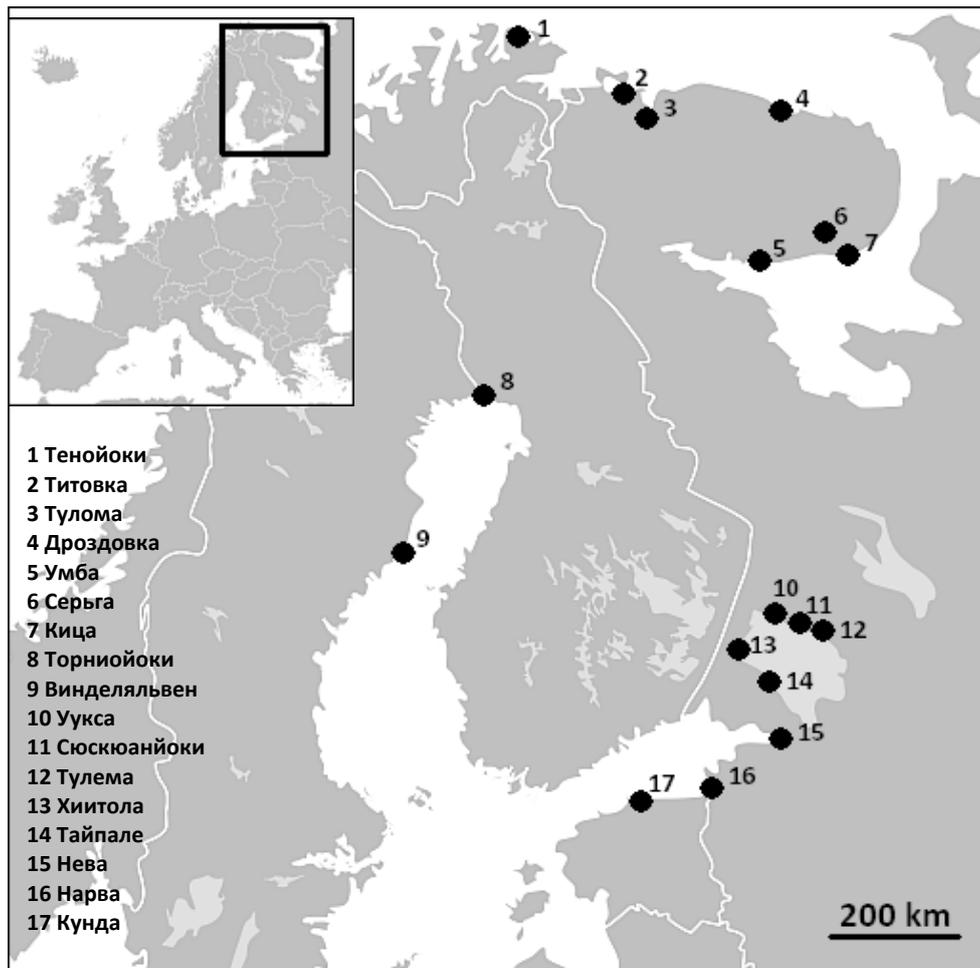


Рис. 1. Географическое местоположение исследованных популяций.

локус EST22 был найден и описан А. Вяссемяги с соавторами [Vasemägi et al., 2005]. Кроме того, в анализ был включен один минисателлитный MHCII-маркер [Stet et al., 2002]. Девять новых популяций (Тулема, Хиитола, Уукса, Кунда, Нарва, Нева, Титовка, Дроздовка и Умба) были изучены по 12 иммунным локусам. Детальная информация о нейтральных локусах приведена в работе А. Тонтери [Tonteri et al., 2009].

Методы амплификации и последующего анализа микросателлитных локусов на секвенаторе ABI Prism 3130x1 (Applied Biosystems) описаны ранее [Tonteri et al., 2008; Vasemägi et al., 2005]. Генотипы по нейтральным локусам для всех популяций, а также по иммунным локусам для восьми популяций (реки Сюскюанйоки, Тайпале, Торнийоки, Винделяльвен, Тенойоки, Тулома, Кица, Серьга) были также получены в ходе предыдущих исследований [Tonteri et al., 2005, 2007; Ozerov et al., 2010].

Анализ данных

Степень генетического полиморфизма оценивалась по общему числу аллелей (A), числу аллелей, усредненному по минимальной выборке (AR), показателям наблюдаемой (H_O) и

ожидаемой (H_E) гетерозиготности по каждому локусу, подсчитанным с использованием программы Fstat 2.93 [Goudet, 1995].

Все используемые маркеры были проверены на отклонение от генетического равновесия по Харди-Вайнбергу (ХВ) и на отсутствие неравновесия по сцеплению с помощью программы Genepop 4.0 [Raymond, Rosset, 1995].

Исследованные популяции характеризуются разным географическим положением и разным уровнем чувствительности к *Gyrodactylus salaris* (табл. 1). Основываясь на данных различиях, мы объединили все популяции в три группы: 1) Баренц-беломорские, 2) Балтийские и 3) Ладожские. Пресноводный лосось Ладожского озера (реки Сюскюанйоки, Тайпале, Хиитола, Тулема и Уукса) практически не восприимчив к паразиту [Kuusela et al., 2009], проходные популяции Балтийского моря (реки Нева, Нарва, Кунда, Торнийоки, Винделяльвен) показывают средний уровень восприимчивости [Bakke, 1990; 1992; 2004]. Наконец, восприимчивость проходных популяций Баренцева и Белого морей (Тенойоки, Титовка, Тулома, Дроздовка, Умба, Кица, Серьга) к *G. salaris* чрезвычайно высокая [Bakke, 1990, 1992, 2004; Kudersky et al., 2003], что позволило объединить их в группу «Баренц-беломорские».

Таблица 1. Популяции атлантического лосося, параметры окружающей среды, показатели генетического разнообразия

Популяции	Группа	Координаты		Смертность, %	Соленость ‰	Т, °С, вода июль	Т, °С, вода январь	Т, °С, воздух июль	Т, °С, воздух январь	N	A	H_E	H_O
Тулема	Ладожские	61°21'	31°50'	0	0	14,3	1,4	16	-9	32	4,2	0,40	0,38
Хиитола	Ладожские	61°10'	29°52'	0	0	14,3	1,4	16	-8	35	4,2	0,40	0,39
Уукса	Ладожские	61°29'	31°36'	0	0	14,3	1,4	16	-9	28	6,2	0,35	0,40
Сюскюанйоки*	Ладожские	61°39'	31°16'	0	0	14,3	1,4	16	-9	26	3,4	0,34	0,34
Тайпале*	Ладожские	60°37'	30°30'	0	0	14,3	1,4	16	-8	29	4,7	0,39	0,40
Кунда	Балтийские	59°31'	26°32'	10	5	17,1	0,7	17	-5	29	5,1	0,37	0,37
Нарва	Балтийские	59°28'	28° 2'	10	4	17,1	0,7	17	-7	31	3,3	0,41	0,44
Нева	Балтийские	59°55'	30°14'	10	2	17,9	2	17	-8	25	4,8	0,47	0,46
Торнийоки*	Балтийские	65°48'	24° 8'	10	3	16,1	1	15	-7	19	5,2	0,47	0,46
Винделяльвен*	Балтийские	63°44'	20°19'	10	5	14,4	1	15	-10	26	5,3	0,46	0,47
Титовка	Баренц-беломорские	69°35'	32° 5'	98	25	7,5	3,5	10	-6	30	4,9	0,56	0,55
Дроздовка	Баренц-беломорские	68°21'	38°19'	98	25	7,5	3,5	8	-8	39	3,2	0,51	0,49
Умба	Баренц-беломорские	66°38'	34°22'	98	26	13	0	13	-11	41	4,2	0,51	0,51
Кица*	Баренц-беломорские	66°29'	36°53'	98	26	13	0	12	-11	33	4,7	0,56	0,54
Серьга*	Баренц-беломорские	66°36'	36°34'	98	26	13	0	12	-11	21	4,9	0,55	0,47
Тенойоки*	Баренц-беломорские	70°31'	28°22'	98	25	7,5	3,5	10	-4	16	5,6	0,51	0,48
Тулома*	Баренц-беломорские	69°16'	33°30'	98	25	7,5	3,5	10	-6	32	3,9	0,58	0,53

Примечание. * – популяции, использованные также в работе А. Тонтери с соавторами [Tonteri et al., 2010], смертность в присутствии паразита *G. salaris* (в процентах от общего числа зараженных особей), N – число особей, A – среднее число аллелей на локус в популяции, H_E – ожидаемая гетерозиготность, H_O – наблюдаемая гетерозиготность

Методы определения, находится ли локус под влиянием естественного отбора, использованные в данной работе, опираются на предположение, что степень генетической дифференциации между популяциями (*FST*) повышена для локусов, на которые отбор действует с разной интенсивностью в разных популяциях [Beaumont, Nichols, 1996; Beaumont, Balding, 2004]. Первый использованный тест основан на алгоритме Байеса с применением цепей Маркова и реализован в программе *BAYESFST* [Beaumont, Balding, 2004]. Анализ был проведен как для всей выборки в целом, так и для каждой из трех групп популяций. Реализованный в *BAYESFST* алгоритм позволяет выявить локусы, подвергшиеся как направленному, так и балансирующему отбору. Однако было показано, что положительные результаты по балансирующему отбору не всегда достаточно достоверны [Beaumont, Balding, 2004]. Также используемая в программе *BAYESFST* модель может приводить к ложноположительным результатам, в случае если анализируемые особи принадлежат популяциям, представляющим собой некую иерархическую структуру или имеющим общую историю [Excoffier et al., 2009]. Чтобы преодолеть упомянутые трудности и уменьшить число ложноположительных результатов, мы также использовали метод, основанный на иерархической островной модели популяций [Slatkin, Voelm, 1991], реализованный в программе *ARLEQUIN 3.5* [Excoffier, Lischer, 2010]. Иерархическая структура нашей выборки следующая. Три группы проб, каждая из которых

состоит из проб отдельных популяций: 1) Ладожские (Сюскоянойки, Тайпале, Хиитола, Тулема и Уукса), 2) Балтийские (Нева, Нарва, Кунда, Торнойоки, Винделяльвен), 3) Баренц-беломорские (Тенойоки, Титовка, Тулома, Дроздовка, Умба, Кица, Серьга).

При проверке гипотезы о том, что некоторые факторы окружающей среды (табл. 1) могут влиять на отбор, мы использовали метод пространственного анализа (the spatial analysis method, SAM) [Joost et al., 2007]. Данный тест основан на множественных логистических регрессиях, которые позволяют провести анализ корреляции между частотами аллелей локуса и заданной характеристикой среды. Затем мы сравнивали количество аллелей, показавших корреляцию с данной переменной, между иммунными и нейтральными маркерами, используя тест Хи-квадрат.

Информация об уровне смертности при гидроактилизе у разных популяций атлантического лосося была получена из ранее опубликованных работ [Kuusela et al., 2007; Bakke et al., 2004]. Данные по солености, средней температуре воды и воздуха взяты из открытых источников [www.nodc.noaa.gov; www.gks.ru].

Результаты

Среди иммунных локусов среднее количество аллелей на локус (*A_M*) составило 2,9; от 1,5 (*Ssa1006*) до 6,3 (*MHCII*) (табл. 2). Показатели наблюдаемой (*H_o*) гетерозиготности изменялись от 0,02 (*Ssa1006*) до 0,64 (*MHCII*), тогда как ожи-

Таблица 2. Микросателлитные локусы и показатели генетической изменчивости

Локусы	Количество локусов	<i>A_T</i>	<i>A_M</i>	<i>A_R</i>	<i>H_E</i>	<i>H_o</i>
Нейтральные	7	153	7,5	6,2	0,81	0,71
<i>Ssa171</i>		20	7,9	9,3	0,79	0,70
<i>Ssa197</i>		32	10,3	13,4	0,92	0,81
<i>Ssa85</i>		24	8,7	11,8	0,89	0,82
<i>SSOSL311</i>		30	10,8	14,9	0,93	0,89
<i>SSOSL438</i>		13	4,6	5,4	0,67	0,57
<i>SSOSL85</i>		28	7,3	10,4	0,86	0,71
<i>Ssa412</i>		6	3,1	3,5	0,59	0,49
Иммунные	12	88	2,9	2,6	0,39	0,30
<i>Ssa1002</i>		9	2,7	2,5	0,44	0,40
<i>Ssa1003</i>		8	3,5	3,2	0,59	0,42
<i>Ssa1004</i>		5	2,1	2,1	0,32	0,21
<i>Ssa1005</i>		3	2,0	2,0	0,35	0,33
<i>Ssa1006</i>		7	1,5	1,1	0,02	0,02
<i>Ssa1007</i>		6	2,0	1,8	0,17	0,16
<i>Ssa1008</i>		5	2,7	2,3	0,49	0,36
<i>Ssa1009</i>		4	2,4	1,9	0,25	0,18
<i>Ssa1010</i>		4	2,2	2,1	0,26	0,18
<i>Ssa1011</i>		5	2,8	2,6	0,51	0,47
<i>MHCII</i>		13	6,3	6,0	0,85	0,64
<i>Est22</i>		19	4,3	3,2	0,478	0,235
Всего локусов	19	241	4,6	5,2	0,55	0,45

Примечание. *A_T* – общее число аллелей в локусе, *A_M* – среднее число аллелей в локусе на популяцию, *H_E* – ожидаемая гетерозиготность, *H_o* – наблюдаемая гетерозиготность, *A_R* – число аллелей, усредненное по минимальной выборке. Жирным шрифтом выделены средние значения генетической изменчивости по нейтральным, иммунным и всем локусам

даемая (H_E) гетерозиготность составила от 0,02 до 0,85 (те же локусы). Усредненные показатели по всем локусам составили: $H_O = 0,30$ и $H_E = 0,39$. Для нейтральных маркеров среднее число аллелей на локус (A_M) составило 7,5 – в пределах от 3,1 (Ssa171) до 10,8 (SSOSL311). Значения наблюдаемой гетерозиготности (H_O) изменялись от 0,49 (SSOSL438) до 0,89 (SSOSL311), среднее 0,71. Ожидаемая гетерозиготность изменялась в пределах 0,59–0,93, при среднем значении 0,80. Число аллелей, усредненное по минимальной выборке (A_R), для иммунных локусов составило 2,6 и 6,2 для нейтральных. Средняя наблюдаемая гетерозиготность по всем локусам в пределах одной популяции (H_O) колебалась от 0,34 (Сюскюанйоки) до 0,55 (Титовка), а ожидаемая гетерозиготность (H_E) – от 0,34 (Сюскюанйоки) до 0,58 (Тулома) (табл. 1).

Два локуса (EST22 и MHCII) отклонялись от генетического равновесия по Харди-Вайнбергу. Однако это отклонение было достоверно только для двух популяций (Умба и Кица). После повторного проведения теста без этих популяций все локусы находились в состоянии генетического равновесия по Харди-Вайнбергу, в связи с чем мы не стали исключать локусы EST22 и MHCII из последующего анализа. Анализ по всем популяциям, с применением коррекции Бонферрони для множественных тестов, показал неравновесие по сцеплению для девяти пар маркеров (из 171). Каждая из девяти сцепленных пар локусов наблюдалась в разных популяциях, и, таким образом, это не могло достоверно повлиять на результаты межпопуляционного и межрегионального анализа.

Было показано, что шесть локусов (SsaI004, SsaI010, SSOSL311, Ssa171, SSOSL85, EST22) находятся под влиянием отбора по результатам по крайней мере одного из двух тестов (табл. 3).

Тест BAYESFST выявил пять локусов, на которые действует отбор (для четырех локусов – с вероятностью 99 %): два из них нейтральные, подверженные балансирующему отбору (SSOSL311, Ssa171), и три – иммунные (SsaI004, SsaI010, EST22), подверженные направленному отбору (рис. 2). Иерархический метод, примененный в ARLEQUIN 3.5, также выявил локусы, находящиеся под действием естественного отбора: один иммунный локус (SsaI004) с вероятностью 99 % (направленный отбор) и три локуса с вероятностью 95 % (один нейтральный под действием балансирующего отбора (SSOSL311), один иммунный (SsaI010) и один нейтральный (SSOSL85) под действием направленного отбора) (рис. 3). Объединенные данные двух тестов показали признаки усиленного действия направленного отбора на два

иммунных (16,7 % от общего числа) и один нейтральный локусы (14,3 %). Однако данные различия между типами локусов при объединении двух тестов статистически не достоверны, $P = 0,64$ (табл. 3).

Таблица 3. Количество локусов, находящихся под влиянием естественного отбора по результатам двух тестов

Локусы	BAYESFST, %	Иерархический тест, %	Оба теста, %
Иммунные	3 SsaI004 (P 0,01) SsaI010 (P 0,01) Est22 (P 0,01)	25,0 2 SsaI004 (P 0,01) SsaI010 (P 0,05)	16,7 2 SsaI004 (P 0,01) SsaI010 (P 0,01)
Нейтральные	2 SSOSL311 (P 0,01) Ssa171 (P 0,05)	28,6 2 SSOSL311 (P 0,05) SSOSL85 (P 0,05)	14,3 1 SSOSL311 (P 0,01)
Хи ² , значение P	0,57	0,04	0,64

Примечание. Жирным шрифтом выделены локусы, находящиеся под действием направленного отбора. Достоверность различия количества иммунных и нейтральных локусов, находящихся под действием естественного отбора, была протестирована с помощью метода Хи²

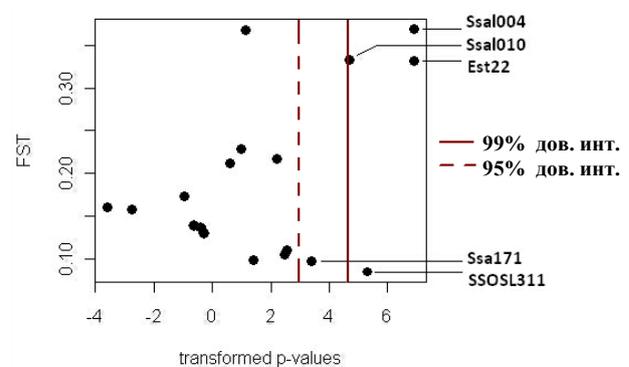


Рис. 2. Результаты теста, основанного на модели Байеса (BAYESFST), для объединенной Ладужской, Баренц-беломорской и Балтийской выборки. На рисунке представлены значения F_{ST} и соответствующие значения вероятностей P для каждого маркера (черные точки). Вертикальные линии обозначают 95-процентный (левая) и 99-процентный (правая) доверительные интервалы.

Анализ пространственных характеристик (SAM тест) выявил, что число иммунных аллелей, коррелирующих со смертностью, соленостью, географической долготой, а также с температурой воды и температурой воздуха в июле, достоверно выше, чем число нейтральных аллелей (табл. 4).

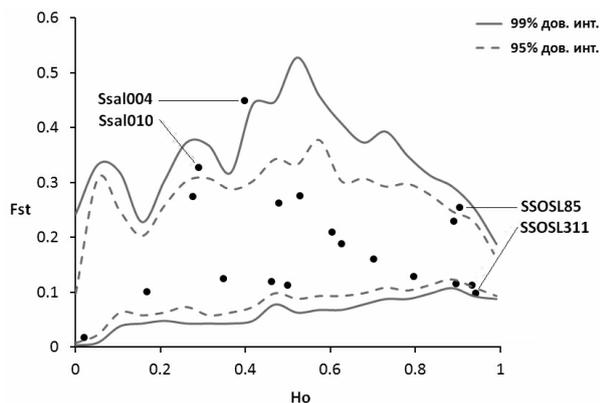


Рис. 3. Результаты иерархического теста (Arlequin 3.5). На оси нанесены значения генетической дифференциации (F_{ST}) и наблюдаемой гетерозиготности (H_o) для каждого маркера (черные точки). Кривые отражают 99-процентный (внешняя пара, сплошная линия) и 95-процентный (внутренняя пара, пунктирная линия) доверительные интервалы.

Таблица 4. Корреляция молекулярных маркеров и параметров окружающей среды

Локусы	Смертность	Соленость	Широта	Долгота
Иммунные	17 [19,3]	17 [19,3]	15 [17]	14 [15,9]
Нейтральные	11 [7,1]	11 [7,2]	14 [9,1]	8 [5,2]
χ^2 , P-значения	0,005	0,005	0,070	0,006
Локусы	Температура воды (июль)	Температура воды (январь)	Температура воздуха (июль)	Температура воздуха (январь)
Иммунные	10 [11,4]	0	15 [17]	4 [4,5]
Нейтральные	6 [3,9]	8 [5,2]	13 [8,5]	9 [5,9]
χ^2 , P-значения	0,025	0,029	0,046	0,658

Примечание. В таблице указаны число и процент [в скобках] аллелей, коррелирующих с характеристиками окружающей среды

Обсуждение

В целом результаты нашей работы подтверждают высказанные ранее гипотезы о том, что локусы, связанные с генами, кодирующими факторы иммунного ответа, подвергаются влиянию естественного отбора более интенсивно, нежели нейтральные [Lanfjors et al., 2001; Landry, Bernatchez, 2001; Dionne et al., 2007; Fumagalli et al., 2009]. Однако при объединении результатов двух проведенных тестов не было выявлено достоверно большего количества иммунных локусов, подверженных усиленному действию отбора, по сравнению с нейтральными, что противоречит данным, полученным ранее

[Tonteri et al., 2010]. Тем не менее подобная тенденция существует (16,7 % иммунных локусов подвержены действию отбора, по сравнению с нейтральными – 14,3 %). Более того, те локусы, которые в нашей работе находились за пределами доверительного интервала по результатам одного из двух тестов (Ssa1004, Ssa1010, SSOSL311, EST22, Ssa171), также были выявлены ранее (Tonteri et al., 2010) (рис. 2). Кроме того, мы применили алгоритм BAYESFST отдельно для трех групп популяций (Баренц-беломорские, Ладожские, Балтийские). Для Баренц-беломорских было показано, что отбор усиленно действует на локус EST22, в Ладожских – на локусы SSOSL85 и SSOSL311, в Балтийских – на локусы SSOSL311 и Ssa197. Таким образом, два локуса (Ssa197, SSOSL85) не были выявлены при объединении всех популяций для проведения тестов, а некоторые локусы (Ssa1004, Ssa1010, Ssa171) достоверно выходили за пределы доверительного интервала только при применении неструктурированной модели популяции для теста. С другой стороны, один из локусов, претерпевающий усиленное действие отбора (Ssa1002) и достоверно выходящий за пределы доверительного интервала согласно результатам предыдущего анализа (Tonteri et al., 2010), не был выявлен в ходе наших исследований.

Наблюдаемые различия в результатах, полученных с помощью разных тестов, можно объяснить следующим образом. В целом естественный отбор может приводить к генетической дифференциации между популяциями. Частоты аллелей локусов, находящихся под влиянием балансирующего отбора, будут равными между различными популяциями, в то время как частоты аллелей локусов, находящихся под сильным локальным действием направленного отбора, будут значительно изменяться между популяциями [Cavalli-Sforza, Edwards, 1967; Lewontin, Krakauer, 1973]. Данное заключение легло в основу тестов, сравнивающих степень генетической изменчивости внутри популяции и степень дифференциации между популяциями [Beaumont, Balding, 2004]. Предположительно, генетические различия между популяциями по локусам, претерпевающим давление направленного отбора, будут довольно сильными [Beaumont, Balding, 2004]. Таким образом, если генетическое различие по определенному маркеру сильно отличается от ожидаемого при нейтральной модели, можно предположить, что данный маркер находится под влиянием естественного отбора [Oleksyk et al.,

2010]. Описанный метод позволяет рассчитать значения *FST* исходя из нейтральной модели структуры популяции и построить ожидаемое распределение данных значений, основанное на первоначальных частотах аллелей. Этот подход был применен в программе *BAYESFST*. Тем не менее было показано, что использование данного метода приводит к достаточно большому числу ложноположительных результатов, если анализируемые выборки были отобраны из иерархически организованной популяции [Excoffier et al., 2009]. С увеличением числа исследуемых популяций точность расчета показателя *FST* должна увеличиваться, а границы доверительного интервала – сужаться. Так, если какие-то из анализируемых популяций не являются независимыми, т. е. их дивергенция произошла относительно недавно, доверительные интервалы, вычисленные исходя из гипотезы о том, что генетические расстояния между популяциями равны, будут слишком узкими, и часть локусов будет ложно признана отклоняющимися от ожидаемых значений [Excoffier et al., 2009]. Это доказывает важность применения иерархического метода, учитывающего внутривидовую структуру. Результаты нашей работы согласуются с описанной теорией, т. к. некоторые локусы, для которых ранее было показано влияние отбора (*SSOSL311*, *Ssa1010*, *EST22*), не вошли в 99-процентный доверительный интервал после применения иерархического теста. Тем не менее даже после удвоения выборки в нашей работе полученные результаты согласуются с результатами предыдущего анализа (Tonteri et al., 2010). Это позволяет предположить, что локусы, для которых показано действие отбора, действительно испытывают усиленное влияние естественного отбора.

С другой стороны, наше исследование не выявило корреляции между интенсивностью отбора и функциональной ролью маркера. Но принимая во внимание, что мы анализировали только 7 нейтральных маркеров по сравнению с 62 в предыдущей работе [Tonteri et al., 2010], отсутствие корреляции, скорее всего, связано с недостатком выборки нейтральных маркеров. Также в своей работе А. Тонтери с соавторами [Tonteri et al., 2010] использовали дополнительный тест (*lnRH*) [Schlötterer, 2002; Kauer et al., 2003], основанный на предположении, что для локусов, находящихся под влиянием отбора, характерен более низкий уровень генетического разнообразия, чем для нейтральных. Таким образом, различия в результатах также могут объясняться использованием разных аналитических методов.

SAM тест выявил, что иммунные локусы чаще коррелируют со степенью чувствительности к *G. salaris* (с уровнем смертности в результате заражения), нежели нейтральные, что может являться признаком патоген-индуцированного отбора. Факт, что подобная корреляция наблюдается и с соленостью воды, подтверждает данное предположение. По одним данным, увеличение солености воды до 5 ‰ не влияет на рост и жизнеспособность паразита *G. salaris* [Soleng, Bakke, 1997]. По другим – увеличение солености вплоть до изоосмотической точки (немногом менее 7,5 ‰) может даже увеличивать жизнеспособность паразита, за счет уменьшения его затрат на поддержание осмотического баланса [Harris et al., 1998, цит. по Bakke, 2002]. Таким образом, в солоноватой воде паразит может выживать даже на неподходящем хозяине. По-видимому, такая ситуация имеет место в Балтийском море, где *G. salaris* может выживать на радужной форели при солености около 5 ‰ [Malmberg, 1989]. При увеличении солености (7,5–33 ‰) время жизни паразита сокращается [Soleng, Bakke, 1997]. В то же время в пресной воде (Ладожское озеро) паразит присутствует постоянно, и поэтому Ладожские популяции атлантического лосося постоянно сталкиваются с необходимостью противостоять ему. Это может выражаться в высокой напряженности иммунной системы рыбы и, как результат, в низкой чувствительности к паразиту.

Балтийские популяции лосося характеризуются средним уровнем восприимчивости к *G. salaris*. Одно из возможных объяснений этого следующее: паразит постоянно присутствует в реках («пресноводные» условия), но когда лосось скатывается в Балтийское море, часть паразитов умирает из-за повышения солености, и популяция лосося освобождается из-под гнета патогена, что ослабляет действие отбора на иммунные локусы. В результате мы видим различия в корреляции между иммунными локусами и соленостью при сравнении пресноводных и морских популяций. Тем не менее данное объяснение не может быть применено к Баренц-беломорским популяциям, так как они, вероятно, никогда не сталкивались с *G. salaris* в естественных условиях. Кроме вызванных человеком случаев, в результате которых вся инфицированная популяция погибала или находилась на критически низком уровне воспроизводства [Bakke, 1990, 1992, 2004; Kudersky et al., 2003]. Безусловно, необходимы более детальные исследования уровня восприимчивости к *G. salaris* лосося из зон с разной соленостью и географическим положением.

В предыдущем исследовании значения корреляции иммунных локусов и температуры воды были близки к достоверным. Проведенный нами анализ подтверждает данную тенденцию: $P = 0,025$ и $0,029$ для температуры воды в июле и январе. Кроме того, когда мы объединили данные по температуре воды и воздуха, различия между зимним и летним сезонами также стали достоверными: иммунные маркеры коррелировали с летней температурой [$P = 0,002$], но не с зимней [$P = 0,082$]. Многие исследования показывают, что количество паразитов, так же как и общее видовое разнообразие, увеличивается с повышением температуры, что справедливо как для водных [Dionne et al., 2007], так и для наземных [Moysa-Laraño, 2010] экосистем. Необходимость противостоять более разнообразным и многочисленным паразитам может приводить к более выраженной эволюции иммунных систем видов-хозяев, что в нашем случае выражается в наличии корреляции между иммунными локусами и температурой.

Интересным наблюдением можно считать тот факт, что не была выявлена корреляция между иммунными локусами и географической широтой, вопреки результатам А. Тонтери [Tonteri et al., 2010]. Напротив, была показана корреляция данных маркеров с географической долготой. Зависимость частоты иммунных аллелей от географической широты вполне ожидаема, т. к. температура воды и воздуха растет при движении с севера на юг. Например, для атлантического лосося у берегов Канады генетическая изменчивость МНС-генов увеличивается с ростом температуры вдоль широтного градиента в ответ на давление патоген-индуцированного отбора [Dionne et al., 2007]. Возможно, объяснение полученных нами результатов кроется в географическом расположении использованных для анализа популяций. Для целей текущего исследования мы добавили к предыдущей выборке три популяции из южных районов Балтийского моря (Нева, Нарва, Кунда), нарушив тем самым имевшийся ранее широтный характер распределения значений солёности, температуры и смертности. Однако, принимая во внимание, что мы анализировали только 7 нейтральных локусов против 62 в предыдущем исследовании [Tonteri et al., 2010], разница в полученных результатах может объясняться недостатком нейтральных маркеров в анализе. Таким образом, корреляция иммунных локусов с географической долготой ставится нами под сомнение, и на данный момент остается неясным, что является основным параметром, с которым коррелируют иммунные маркеры, – температура воды или же географическая широта.

Заключение

Представленные в данной работе результаты подтверждают предположение, что связанные с иммунным ответом локусы находятся под усиленным действием естественного отбора, по сравнению с маркерами, не несущими ярко выраженной иммунной функции. Наличие связи между иммунными локусами и солёностью, температурой воды, а также чувствительностью к паразиту *Gyrodactylus salaris* также свидетельствует о действии патоген-индуцированного отбора. Основываясь на данных выводах, становится возможным использовать неравномерную интенсивность отбора в популяциях как маркер для поиска генов, связанных с иммунным ответом. Более того, такой подход применим ко всему геному и способствует поиску ранее неизвестных иммунокомпетентных локусов. В настоящей работе как EST-маркеры, так и МНСII-локус были информативны, что еще раз свидетельствует в пользу применимости широкого спектра локусов для изучения влияния естественного отбора на участки генома, связанные с иммунным ответом.

Работа выполнена в рамках программы Отделения биологических наук «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» по теме «Разработка экспертной системы “Лососевые популяции и нерестовые реки Восточной Фенноскандии” на основе ГИС-технологий».

Литература

- Acevedo-Whitehouse K., Cunningham A. Is MHC enough for understanding wildlife immunogenetics? // Trends in Ecology & Evolution. 2006. Vol. 21. P. 433–438.
- Aguilar A., Roemer G., Debenham S., Binns M., Garcelon D., Wayne K. High MHC diversity maintained by balancing selection in an otherwise genetically monomorphic mammal // PNAS. 2004. Vol. 101. P. 3490–3494.
- Asplund T., Veselov A. J., Primmer C. R., Bakhmet I., Potutkin A., Titov S., Zubchenko A., Studenov I., Kaluzhchin S., Lumme J. Geographical structure and postglacial history of mtDNA haplotype variation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) among rivers of the White and Barents Sea basins // Ann. Zool. Fennici. 2004. Vol. 41. P. 465–475.
- Bakke T., Jansen P., Hansen L. Differences in the host resistance of Atlantic salmon *Salmo salar* L., stocks to the monogenean *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 // Journal of Fish Biology. 1990. Vol. 37. P. 571–581.
- Bakke T. A., Harris P. D., Jansen P. A., Hansen L. P. Host specificity and dispersal strategy in gyrodactylid monogeneans, with particular reference to *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) // Diseases of Aquatic Organisms. 1992. Vol. 13, N 1. P. 63–74.

- Bakke T., Harris P. D., Cable J. Host specificity dynamics: observations on gyrodactylid monogeneans // International Journal for Parasitology. 2002. Vol. 32. P. 281–308.
- Bakke T. A., Harris P. D., Hansen H., Cable J., Hansen L. P. Susceptibility of Baltic and East Atlantic salmon *Salmo salar* stocks to *Gyrodactylus salaris* (Monogenea) // Diseases of Aquatic organisms. 2004. Vol. 58. P. 171–177.
- Beaumont M., Nichols R. A. Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure // Proceedings of the Royal Society of London. 1996. Vol. 263. P. 1619–1626.
- Beaumont M., Balding D. Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans // Molecular Ecology. 2004. Vol. 13, N 4. P. 969–980.
- Cavalli-Sforza L. L., Edwards A. W. F. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures // American Journal of Human Genetics. 1967. Vol. 19. P. 233–257.
- Dionne M., Miller K., Dodson J., Caron F., Bernatchez L. Clinical variation in MHC diversity with temperature: evidence for the role of host-pathogen interaction on local adaptation in Atlantic salmon // Evolution. 2007. Vol. 61. P. 2154–2164.
- Excoffier L., Hofer T., Foll M. Detecting loci under selection in a hierarchically structured population // Heredity. 2009. Vol. 103. P. 285–298.
- Excoffier L., Lisher H. Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Molecular Ecology Resources. 2010. Vol. 10, N 3. P. 564–567.
- Fumagalli M., Cagliani R., Pozzoli U., Riva S., Comi G., Menozzi G., Bresolin N., Sironi M. Widespread balancing selection and pathogen-driven selection at blood group antigen genes // Genome Resources. 2009. Vol. 19. P. 199–212.
- Goudet J. FSTAT [Version 1.2]: A Computer Program to Calculate F-Statistics // Heredity. 1995. Vol. 86. P. 485–486.
- Guernier V., Hochberg M. E., Guégan J.-F. Ecology Drives the Worldwide Distribution of Human Diseases // PLoS Biology. 2004. 2, N 6: e141. doi:10.1371/journal.pbio.0020141.
- Joost S., Bonin A., Bruford M. W., Despres L., Conord C., Erhardt G., Taberlet P. A spatial analysis method [SAM] to detect candidate loci for selection: towards a landscape genomics approach to adaptation // Genetics. 2007. Vol. 127. P. 627–629.
- Kauer M. O., Dieringer D., Schlötterer C. A microsatellite variability screen for positive selection associated with the «out of Africa» habitat expansion of *Drosophila melanogaster* // Genetics. 2003. Vol. 165. P. 1137–1148.
- Kudersky L. A., Ieshko E., Schulman B. Distribution range formation history of the monogenean *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 – a parasite of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus, 1758) // Atlantic salmon: biology, conservation and restoration. 2003. Petrozavodsk, P. 76–83.
- Kuusela J., Zietara M. S., Lumme J. Hybrid origin of Baltic salmon-specific parasite *Gyrodactylus salaris*: a model for speciation by host switch for hemiclinal organisms // Molecular Ecology. 2007. Vol. 16, N 24. P. 5234–5245.
- Kuusela J., Holopainen R., Meinilä M., Anttila P., Koski P., Zietara M. S., Veselov A. J., Primmer C. R., Lumme J. Clonal structure of salmon parasite *Gyrodactylus salaris* on a coevolutionary gradient on Fennoscandian salmon (*Salmo salar*) // Ann. Zool. Fennici. 2009. Vol. 46. P. 21–33.
- Landry C., Bernatchez L. Comparative analysis of population structure across environments and geographical scales at major histocompatibility complex and microsatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar*) // Molecular Ecology. 2001. Vol. 10, N 10. P. 2525–2539.
- Langefors A., Lohm J., Grahn M., Andersen Q., Schantz T. Association between major histocompatibility complex class II B alleles and resistance to *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon // Proc. R. Soc. Lond. 2001. Vol. 268. P. 479–485.
- Lewontin R., Krakauer J. Distribution of gene frequency as a test of the theory of the selective neutrality of polymorphisms // Genetics. 1973. Vol. 74, N 1. P. 175–195.
- Malmberg G. Salmonid transports, culturing and *Gyrodactylus* infections in Scandinavia / Eds. Bauer O. E. Parasites of freshwater fishes of North-West Europe. Institute of Biology, USSR, Academy of Sciences, Karelian Branch, Petrozavodsk, 1989. P. 88–104.
- Moya-Laraco J. Can Temperature and Water Availability Contribute to the Maintenance of Latitudinal Diversity by Increasing the Rate of Biotic Interactions? // The Open Ecology Journal. 2010. Vol. 3. P. 1–13.
- Olafsdýttir G. A., Snorrason S. S., Ritchie M. G. Postglacial intra-lacustrine divergence of Icelandic threespine stickleback morphs in three neovolcanic lakes // Journal of Evolutionary Biology. 2007. Vol. 20. P. 1870–1881.
- Oleksyk T., Smith M., O'Brien S. Genome-wide scans for footprints of natural selection // Phil. Trans. R. Soc. B. 2010. Vol. 365. P. 185–205.
- Ozerov M. Y., Veselov A. J., Lumme J., Primmer C. R. Genetic structure of freshwater Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) populations from the lakes Onega and Ladoga of northwest Russia and implications for conservation // Conservation Genetics. 2010. Vol. 11. P. 1711–1724.
- Piertney S. B., Oliver M. K. The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex // Heredity. 2006. Vol. 96. P. 7–21.
- Raymond M., Rousset F. GENEPOP [Version 1.2]: Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism // Heredity. 1995. Vol. 86, № 3. P. 248–249.
- Rogers A. D. Evolution and biodiversity of Antarctic organisms: a molecular perspective // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2007. Vol. 362. P. 2191–2214.
- Schlötterer C. A microsatellite-based multilocus screen for the identification of local selective sweeps // Genetics. 2002. Vol. 160. P. 753–763.
- Slatkin M., Voelm L. F_{ST} in a Hierarchical Island Model // Genetics. 1991. Vol. 127. P. 627–629.
- Soleng A., Bakke T. Salinity tolerance of *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea): laboratory studies // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1997. Vol. 54, N 8. P. 1837–1864.

Stet R. J., de Vries B., Mudde K., Hermsen T., van Heerwaarden J., Shum B. P., Grimholt U. Unique haplotypes of co-segregating major histocompatibility class II A and class II B alleles in Atlantic salmon (*Salmo salar*) give rise to diverse class II genotypes // Immunogenetics. 2002. Vol. 54, N 5. P. 320–331.

Tonteri A., Titov S., Veselov A. J., Zubchenko A., Koskinen M., Lesbarrères D., Kaluzchin S., Bakhmet I., Lumme J., Primmer C. R. Phylogeography of anadromous and non-anadromous Atlantic salmon (*Salmo salar*) from northern Europe // Ann. Zool. Fennici. 2005. Vol. 41. P. 1–22.

Tonteri A., Veselov A. J., Titov S., Lumme J., Primmer C. R. The effect of migratory behavior on genetic diversity and population divergence: a comparison of anadromous and freshwater Atlantic salmon *Salmo salar* // Journal of Fish Biology. 2007. Vol. 70. P. 381–398.

Tonteri A., Vasemägi A., Lumme J., Primmer C. R. Use of differential expression data for identification of

novel immune relevant expressed sequence tag-linked microsatellite markers in Atlantic salmon (*Salmo salar*) // Molecular Ecology Resources. 2008. Vol. 8. P. 1486–1490.

Tonteri A., Veselov A. J., Zubchenko A., Lumme J., Primmer C. R. Microsatellites reveal clear genetic boundaries among Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations from the Barents and White seas, northwest Russia // Canadian Journal of Fisheries And Aquatic Sciences. 2009. Vol. 66. P. 717–735.

Tonteri A., Vasemägi A., Lumme J., Primmer C. R. Beyond MHC: signals of elevated selection pressure on Atlantic salmon (*Salmo salar*) immune-relevant loci // Molecular ecology. 2010. Vol. 10. P. 1365–294.

Vasemägi A., Nilsson J., Primmer C. R. Seventy-five EST-linked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) microsatellite markers and their cross-amplification in five salmonid species // Molecular Ecology Notes. 2005. Vol. 5. P. 282–288.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Зуева Ксения Юрьевна

аспирантка
Департамент биологии,
подразделение генетики и физиологии
Итайнен Питкакату, 4, 20700
Университет Турку,
Турку Финляндия
эл. почта: ksezue@utu.fi
тел.: +35823335808

Озеров Михаил Юрьевич

научный сотрудник., к. б. н.
Департамент биологии,
подразделение генетики и физиологии
Итайнен Питкакату, 4, 20700
Университет Турку,
Турку, Финляндия
эл. почта: mikoze@utu.fi
тел.: +358468121565

Веселов Алексей Елпидифорович

главный научный сотрудник, д. б. н., профессор
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, г. Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия 185910
эл. почта: veselov@krc.karelia.ru
тел.: +79114093805

Приммер Крейг Роберт

профессор
Департамент биологии,
подразделение генетики и физиологии
Итайнен Питкакату 4, 20700
Университет Турку,
Турку, Финляндия
эл. почта: craig.primmer@utu.fi
тел.: +35823335571

Zueva, Ksenia

Department of Biology, Division of Genetics and Physiology
4 Itäinen Pitkätatu, 20700
University of Turku,
Turku Finland
e-mail: ksezue@utu.fi
tel.: +358 2 333 5808

Ozerov, Mikhail

Department of Biology, Division of Genetics and Physiology
4 Itäinen Pitkätatu, 20700
University of Turku,
Turku Finland
e-mail: mikoze@utu.fi
tel.: +358468121565

Veselov, Alexey

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: veselov@krc.karelia.ru
tel.: +358 2 333 5808

Primmer, Craig

Department of Biology, Division of Genetics and Physiology
4 Itäinen Pitkätatu, 20700
University of Turku,
Turku Finland
e-mail: craig.primmer@utu.fi
tel.: +358 2 333 5808

УДК 581.1:633.16:546.48

ВЛИЯНИЕ ВОЗРАСТА ЛИСТА НА УСТОЙЧИВОСТЬ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА РАСТЕНИЙ К КАДМИЮ

Н. М. Казнина, А. Ф. Титов, Г. Ф. Лайдинен, Ю. В. Батова

Институт биологии Карельского научного центра РАН

В условиях лабораторного опыта на примере ячменя (*Hordeum vulgare* L.) изучено влияние возраста листа на устойчивость фотосинтетического аппарата (ФСА) растений к повышенному содержанию кадмия (100 мкМ) в корнеобитаемой среде. После 4-дневной экспозиции на растворе с металлом у молодого листа при наибольшей концентрации в нем кадмия снижается содержание зеленых пигментов, замедляется скорость электронного транспорта, уменьшается фотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла, однако благодаря функционированию защитных механизмов интенсивность фотосинтеза поддерживается на уровне контроля. В зрелом листе, где количество металла оказалось наименьшим, ингибирующее действие кадмия на активность ФСА не проявляется, а интенсивность фотосинтеза повышается. В стареющем листе при довольно значительном содержании в нем металла большинство изученных параметров ФСА уменьшаются и скорость фотосинтеза замедляется. Сделан вывод о том, что различия в ответной реакции ФСА на действие кадмия у листьев разного возраста связаны с разным содержанием в них металла и со структурно-функциональными изменениями, происходящими в клетках и тканях в процессе онтогенеза листа, что, по-видимому, является одним из механизмов металлоустойчивости растений, функционирующим на уровне целого организма.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare* L., возраст листа, фотосинтетический аппарат, кадмий.

N. M. Kaznina, A. F. Titov, G. F. Laidinen, Yu. V. Batova. EFFECT OF LEAF AGE ON THE CADMIUM RESISTANCE OF THE PLANT PHOTOSYNTHETIC APPARATUS

The effect of leaf age on the resistance of the plant photosynthetic apparatus (PSA) to high cadmium content (100 µm) in the root medium was studied in a laboratory experiment with barley (*Hordeum vulgare* L.) as the study object. After 4 days of exposure to the cadmium-bearing solution, a young leaf, where the metal concentration was the highest, demonstrated a decline in green pigment content, reduced electron transport rate and photochemical quenching of chlorophyll fluorescence, but the rate of photosynthesis remained at the control level owing to protective mechanisms. In a mature leaf, where cadmium content was the lowest, no inhibiting effect of the metal on PSA was observed, and the rate of photosynthesis increased. In an ageing leaf, where the metal content was quite high, most of the investigated PSA parameters declined and photosynthesis slowed down. We conclude that the distinctions between leaves of different age in the way their PSA responded to cadmium were related to the metal content in them and to the structural and functional modifications that take place in the cells and tissues during the leaf ontogeny. Presumably, this response is a mechanism of the plant metal resistance which involves the whole plant.

Key words: *Hordeum vulgare* L., leaf age, photosynthetic apparatus, cadmium.

Введение

Одним из самых важных отличий растений от животных является их способность к постоянно-му росту и новообразованию органов в течение всего онтогенеза [Полевой, Саламатова, 1991]. Наиболее отчетливо это прослеживается на листьях, формирование которых происходит постепенно по мере роста растения. При этом листья разного возраста, находящиеся на одном растении, заметно отличаются друг от друга целым рядом структурных и функциональных характеристик, определяющих интенсивность проходящих в них метаболических процессов [Мокронос, 1981]. В частности, по мере роста и развития листа изменяются его анатомо-морфологическая и мезоструктура [Мокронос, 1981], ультраструктура пластид [Skorzynska-Polit, Baszynski, 1997], содержание фотосинтетических пигментов [Greer, Halligan, 2001; Zhang et al., 2008], скорость электронного транспорта [Бухов, 1997], активность ферментов, участвующих в темновой фазе фотосинтеза [Zima, Sestak, 1979], интенсивность самого процесса [Miller et al., 2000; Xie, Luo, 2003].

Известно также, что структурно-функциональные различия, связанные с возрастом листа, оказывают определенное влияние и на устойчивость ФСА к неблагоприятным факторам внешней среды [Брагина и др., 2004; Xu et al., 2008]. При этом предполагается, что изменение в стрессовых условиях активности ФСА у листьев разного возраста является одним из важных механизмов адаптации растений, действующим не только на клеточном, но и на органном и организменном уровнях организации [Нестеренко и др., 2001]. Однако экспериментальных данных, подтверждающих это, крайне мало.

Учитывая вышеизложенное, целью данной работы явилось изучение влияния возраста листа на устойчивость ФСА растений к одному из наиболее сильных стрессовых воздействий химической природы – повышенному содержанию кадмия в корнеобитаемой среде.

Материалы и методы

Исследования проведены с использованием приборно-аналитической базы Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН.

В качестве объекта исследований использовали растения ячменя сорта Зазерский 85 (*Hordeum vulgare* L.), которые выращивали в условиях контролируемой среды в песчаном субстрате при температуре воздуха 20–22 °С, освещенности 10 клк и фотопериоде 14 ч.

При достижении растениями фазы начала 3-го листа их переносили в пластиковые контейнеры (объемом 2 л) на питательный раствор Кнопа с добавлением микроэлементов (контроль). В опытном варианте к питательному раствору добавляли 100 мкМ кадмия в форме сульфата. Через 4 сут экспозиции в этих условиях после разворачивания у растений 3-го листа определяли содержание кадмия в корне, побегах и листьях разного возраста: стареющего (1-го от основания побега), зрелого (2-го от основания побега, закончившего рост) и молодого (3-го от основания побега, продолжающего рост), а также фотосинтетическую активность листьев.

Количественное определение кадмия в корнях, стеблях и листьях растений проводили методом инверсионной вольтамперометрии с использованием полярографа АВС-1.1 («Вольта», Россия). О состоянии ФСА листьев разного возраста судили по следующим показателям: площадь листовой пластинки, содержание зеленых и желтых пигментов, доля хлорофиллов в светособирающих комплексах, эффективность работы фотосистемы II (ФС II) и скорость фотосинтеза. Площадь листовой пластинки рассчитывали по формуле $S = 0,66ld$, где l – длина листа (см), d – ширина листа (см) [Аникиев, Кутузов, 1961]. Содержание хлорофиллов (a и b) и каротиноидов определяли спектрофотометрически, экстрагируя их 80%-м ацетоном. Долю хлорофиллов, находящихся в светособирающих комплексах, от их общего количества рассчитывали по Лихтентайлеру [Lichtenthaler, 1987]. Квантовую эффективность ФС II (F_v/F_m), скорость электронного транспорта (ETR), а также коэффициенты фотохимического (qP) и нефотохимического (NPQ) тушения флуоресценции хлорофилла определяли в листьях, адаптированных к темноте, с помощью флуориметра MINI-PAM (Walz, Германия). Интенсивность фотосинтеза оценивали с помощью установки для исследования CO_2 -газообмена HCM-1000 (Walz, Германия).

Повторность в пределах одного варианта опыта варьировала в зависимости от показателя от 5 до 20 растений, каждый опыт повторяли трижды. В таблицах и на рисунке представлены средние значения и их стандартные ошибки. О достоверности различий судили с помощью критерия Стьюдента при $P < 0,05$.

Результаты

Анализ содержания кадмия в корнях, стеблях и листьях разного возраста у растений ячменя показал, что основная часть (80 % от общего количества) поступившего в растение

металла задерживалась в корнях (табл. 1). Однако некоторое его количество попадало в надземные органы и распределялось там следующим образом (в порядке убывания): стебель > молодой лист > стареющий лист > зрелый лист.

Таблица 1. Содержание кадмия в органах ячменя после 4-суточной экспозиции растений на растворе с кадмием (100 мкМ)

Орган	Содержание кадмия, мкг/г сырого веса	% от общего количества
Корень	42,8 ± 1,41	79,6
Стебель	7,59 ± 0,16	14,1
Лист стареющий	1,22 ± 0,05	2,3
Лист зрелый	0,70 ± 0,03	1,3
Лист молодой	1,45 ± 0,03	2,7

Наиболее высокое содержание кадмия в молодом листе опытных растений, по сравнению со зрелым и стареющим листьями, соответствовало и более значительному снижению (по отношению к контролю) в нем зеленых пигментов (табл. 2). В несколько меньшей степени содержание хлорофилла снижалось в стареющем листе, тогда как в зрелом листе достоверных изменений данного показателя не наблюдалось. Отметим также, что только в молодом листе увеличивалась доля хлорофиллов, находящихся в ССК. Отрицательное влияние кадмия на содержание каротиноидов не выявлено. Более того, в молодом листе оно даже несколько увеличивалось.

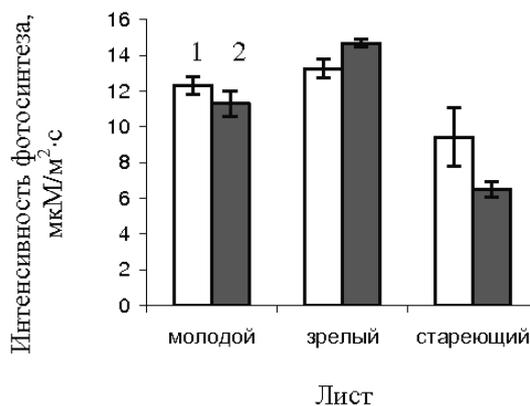
Таблица 2. Содержание фотосинтетических пигментов в листьях ячменя разного возраста после 4-суточной экспозиции растений на растворе с кадмием (100 мкМ)

Лист	Содержание пигментов, мг/г сырого веса				Содержание chl в ССК, %
	chl a	chl b	chl a+b	car	
Контроль					
Молодой	1,027 ± 0,002	0,316 ± 0,003	1,343 ± 0,002	0,329 ± 0,001	51,3 ± 0,5
Зрелый	1,174 ± 0,002	0,420 ± 0,002	1,594 ± 0,003	0,332 ± 0,001	60,2 ± 0,6
Стареющий	0,791 ± 0,002	0,231 ± 0,001	1,022 ± 0,002	0,326 ± 0,001	49,6 ± 0,3
Опыт					
Молодой	0,953 ± 0,001*	0,294 ± 0,002*	1,247 ± 0,002*	0,341 ± 0,002*	53,9 ± 0,2*
Зрелый	1,170 ± 0,004	0,421 ± 0,001	1,591 ± 0,004	0,331 ± 0,001	61,2 ± 0,4
Стареющий	0,735 ± 0,004*	0,231 ± 0,001	0,966 ± 0,006*	0,325 ± 0,002	50,1 ± 0,3

Примечание. Здесь и в табл. 3: * – различия с контролем достоверны при P < 0,05

Таблица 3. Некоторые показатели флуоресценции хлорофилла в листьях ячменя разного возраста после 4-суточной экспозиции растений на растворе с кадмием (100 мкМ)

Лист	Показатели флуоресценции хлорофилла			
	Fv/Fm	ETR	qP	NPQ
Контроль				
Молодой	0,744 ± 0,006	71,60 ± 2,09	0,906 ± 0,020	0,642 ± 0,023
Зрелый	0,714 ± 0,018	54,18 ± 1,50	0,735 ± 0,029	0,583 ± 0,020
Стареющий	0,707 ± 0,005	43,07 ± 1,98	0,750 ± 0,016	0,562 ± 0,004
Опыт				
Молодой	0,739 ± 0,005	66,26 ± 2,18*	0,848 ± 0,008*	0,886 ± 0,027*
Зрелый	0,731 ± 0,005	56,48 ± 0,86	0,725 ± 0,016	0,530 ± 0,041
Стареющий	0,713 ± 0,016	37,10 ± 1,85*	0,660 ± 0,011*	0,578 ± 0,085



Интенсивность фотосинтеза листьев ячменя разного возраста после 4-суточной экспозиции растений на растворе с кадмием (100 мкМ):

1 – контроль; 2 – опыт

Известно, что состояние ФСА растений в стрессовых условиях можно также оценить по изменению показателей эффективности работы ФС II [Нестеренко, Сидько, 1980]. В наших опытах в присутствии кадмия в зрелом листе изученные параметры флуоресценции хлорофилла не изменялись. В молодом и стареющем листьях отмечено некоторое замедление (на 7 и 14 % соответственно по сравнению с контролем) скорости электронного транспорта и снижение (на 6 и 12 %) фотохимического тушения флуоресценции хлорофилла (табл. 3). Причем в молодом листе одновременно с этим увеличивалось (на 38 % по отношению к контролю) нефотохимическое тушение, чего не происходило в стареющем листе.

Влияние кадмия на интенсивность фотосинтеза также во многом зависело от возраста листа (рис.). Так, в молодом листе после 4-суточной экспозиции растений на растворе с металлом достоверных различий с контролем в скорости процесса не наблюдалось, в зрелом листе интенсивность фотосинтеза несколько увеличивалась (на 11 % по сравнению с контролем), а в стареющем листе, напротив, уменьшалась (на 31 %).

Обсуждение

Проведенное исследование показало, что возраст листьев оказывает заметное влияние как на накопление в них кадмия, так и на устойчивость ФСА растений ячменя к его токсическому действию.

Наибольшее количество кадмия выявлено в молодом листе, в меньшей степени металл накапливается в стареющем листе, а в зрелом листе его содержание оказалось самым низким. Аналогичное распределение кадмия между разновозрастными листьями ранее было обнаружено у растений кукурузы в присутствии металла в концентрации 25 мкМ [Lagriffoul et al., 1998]. Очевидно, высокая концентрация кадмия в молодом листе обусловлена его сильной аттрагирующей способностью, в результате чего металл поступает в него не только по ксилеме из корня, но и по флоэме [Page et al., 2006]. Относительно высокое содержание кадмия в стареющем листе, возможно, объясняется активно функционирующими механизмами детоксикации металла, поскольку этот лист, наряду с корнем и стеблем, выполняет барьерную функцию [McКенна et al., 1993]. В результате в зрелом листе оказывается наименьшее количество кадмия, что важно с точки зрения сохранения высокой активности его ФСА, поскольку на изученной фазе развития растений именно этот лист служит основным донором ассимилятов [Сытник и др., 1978].

Полученные результаты также показали, что реакция ФСА на действие кадмия зависит не только от количества металла в листьях, но и от их возраста. Так, у **молодого листа**, при наиболее высоком по сравнению с другими листьями содержании в нем кадмия, в большей степени снижается количество зеленых пигментов, замедляется скорость электронного транспорта, уменьшается фотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла. Однако интенсивность фотосинтеза сохраняется при этом на уровне контрольного варианта. Как известно, негативное

влияние кадмия на показатели фотосинтетической активности в значительной степени связано с его действием на структуру мембран хлоропластов [Skórzyńska-Polić, Baszynski, 1997], биосинтез хлорофилла [Molas, 1997] и активность фотосистем [Vassilev et al., 2004; Казнина и др., 2010]. Однако нельзя не учитывать и возрастные особенности молодого, не закончившего свой рост листа, у которого пластидный аппарат еще окончательно не сформирован, в клетках мезофилла содержится меньшее по сравнению с более зрелыми листьями количество хлоропластов с не полностью развитой системой мембран [Сытник и др., 1978; Мокроносов, 1981]. Это также может быть одной из причин уменьшения активности ФСА в присутствии кадмия. Поддержание же относительно высокого уровня фотосинтеза при этом можно, по крайней мере отчасти, объяснить возрастанием доли хлорофиллов, находящихся в ССК, что способствует усилению светособирающей функции пигментного аппарата [Шерстнева и др., 2007], а также повышением нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла, позволяющим избежать фотоповреждения ФС II при снижении фотохимического тушения [Лепедуш и др., 2005]. В защите от фотоповреждения заметную роль играют и каротиноиды [Choundhury, Behera, 2001], увеличение содержания которых наблюдалось в наших экспериментах в молодом листе. Необходимо также отметить, что поддержание интенсивности фотосинтеза на уровне контрольного варианта в молодом растущем листе может быть связано и с высокой активностью темновой фиксации CO₂ [Мокроносов, 1981; Cabello et al., 2006].

Зрелый лист, закончивший свой рост, обладает наибольшей интенсивностью всех фотосинтетических процессов [Мокроносов, 1981; Einig et al., 1999; Xie, Luo, 2003]. Высокое содержание хлорофиллов в нем обусловлено большим числом полностью сформированных и активно функционирующих хлоропластов [Lieth, Pasian, 1990]. Помимо этого зрелый лист обладает хорошо развитым устьичным аппаратом и довольно низким устьичным сопротивлением диффузии CO₂, что обеспечивает ему более высокий уровень газообмена даже в неблагоприятных условиях внешней среды [Малкина, 1976; Xie, Luo, 2003]. Указанные структурно-функциональные особенности зрелого листа, а также гораздо меньшее (по сравнению с другими листьями) количество в нем кадмия, по-види-

тому, и явились основными причинами отсутствия негативного влияния металла на активность ФСА. Обнаруженное же при этом некоторое усиление интенсивности фотосинтеза, связанное, например, с увеличением активности ферментов темновой фазы, в частности РБФК/О [Monnet et al., 2001], можно расценивать как защитно-приспособительную реакцию растения в ответ на повышение концентрации токсичных ионов в корнеобитаемой среде.

У **стареющего листа**, также как и у молодого, после 4-суточной экспозиции на растворе с кадмием уменьшается количество хлорофилла, замедляется скорость электронного транспорта, снижается коэффициент фотохимического тушения хлорофилла. Однако в отличие от молодого листа скорость фотосинтеза замедляется. Поскольку содержание кадмия в стареющем листе несколько меньше, чем в молодом, можно предположить, что замедление интенсивности фотосинтеза связано в этом случае с возрастными изменениями, происходящими в листе на начальных этапах старения. К ним, в частности, относятся разрушение гранулярной структуры и уменьшение размеров хлоропластов и их количества [Smart, 1994], уменьшение синтеза РБФК/О и снижение ее активности [Suzuki et al., 1987; Niinemets et al., 2005], деформация устьиц [Kołodziejek et al., 2006] и уменьшение устьичной проводимости [Constable, Ranson, 1980; Cabello et al., 2006]. Кроме того, известно, что кадмий не только непосредственно влияет на параметры функционирования ФСА, о чем было сказано выше, но и вызывает ускорение всех процессов, связанных со старением листьев [Skorynska-Polít, Baszynski, 1997; Krupa, Moniak, 1998; Vassilev et al., 1998].

Таким образом, в результате проведенного исследования выявлено заметное влияние возраста листа на устойчивость ФСА растений ячменя к кадмию. При этом у молодого растущего листа при наибольшем содержании в нем кадмия уменьшается ряд показателей фотосинтетической активности, однако благодаря функционированию защитных механизмов (в частности, возрастанию доли хлорофиллов, находящихся в ССК, увеличению содержания каротиноидов и повышению нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла) интенсивность фотосинтеза поддерживается на уровне растений контрольного варианта. В зрелом листе, являющемся на изученной фазе развития растений основным донором ассимилятов, количество

металла оказалось наименьшим. При этом ингибирующего действия кадмия на активность ФСА не наблюдается. Более того, в присутствии металла интенсивность фотосинтеза в этом листе несколько повышается. В стареющем листе при довольно значительном содержании в нем металла большинство изученных параметров ФСА уменьшаются, а скорость фотосинтеза замедляется.

На наш взгляд, выявленные различия в ответной реакции ФСА на действие кадмия у листьев разного возраста, связанные, с одной стороны, с разным количеством поступившего в них металла, а с другой – со структурно-функциональными изменениями, происходящими в клетках и тканях в процессе онтогенеза листа, можно отнести к механизмам металлоустойчивости, функционирующим на уровне целого организма, которые дополняют и усиливают клеточные механизмы устойчивости и способствуют тем самым росту и развитию растений в неблагоприятных условиях окружающей среды.

Литература

- Аникиев В. В., Кутузов Ф. Ф. Новый способ определения площади листовой поверхности у злаков // Физиология растений. 1961. Т. 8, № 3. С. 375–377.
- Брагина Т. В., Пономарева Ю. В., Дроздова И. С. и др. Фотосинтез и темновое дыхание листьев разного яруса проростков кукурузы при частичном затоплении // Физиология растений. 2004. Т. 51, № 3. С. 383–389.
- Бухов Н. Г. Старение листа. Выявление участков, лимитирующих фотосинтез, с помощью коэффициентов тушения флуоресценции хлорофилла и редокс-изменений Р700 в листьях // Физиология растений. 1997. Т. 44, № 3. С. 352–360.
- Казнина Н. М., Титов А. Ф., Лайдинен Г. Ф., Батова Ю. В. Влияние кадмия на некоторые физиологические показатели растений ячменя в зависимости от их возраста // Труды КарНЦ РАН. 2010. № 2. С. 27–31.
- Лепедуш Х., Вильевач М., Цезар В., Любешич Н. Оценка функционального состояния фотосинтетического аппарата у хвой ели с признаками хлороза на слабом и сильном свете по измерениям флуоресценции хлорофилла *in vivo* // Физиология растений. 2005. Т. 52, № 2. С. 191–197.
- Малкина И. С. Изменение световых кривых фотосинтеза с возрастом листа клена остролистного // Физиология растений. 1976. Т. 23, № 2. С. 247–253.
- Мокронос А. Т. Онтогенетический аспект фотосинтеза. М.: Наука, 1981. 196 с.
- Нестеренко Т. В., Сидько Ф. Я. Индукция флуоресценции листьев пшеницы в их онтогенезе // Физиология растений. 1980. Т. 27, № 2. С. 336–340.
- Нестеренко Т. В., Шихов В. Н., Тихомиров А. А. Термоиндукция флуоресценции хлорофилла и возрастное состояние листьев высших растений //

Физиология растений. 2001. Т. 48, № 2. С. 282–291.

Полевой В. В., Саламатова Т. С. Физиология роста и развития растений. Л.: Изд-во ЛГУ, 1991. 239 с.

Сытник К. М., Мусатенко Л. И., Богданова Т. Л. Физиология листа. Киев: Наук. думка, 1978. 392 с.

Шерстнева О. А., Маслова Т. Г., Мамушина Н. С., Тютерева Е. В., Зубкова Е. К. Фотосинтетический аппарат и светозависимые превращения ксантофиллов в листьях эфемероидов на разных этапах онтогенеза растений // Ботанический журнал. 2007. Т. 92, № 1. С. 72–80.

Cabello P., Agüera E., de la Haba P. Metabolic changes during natural ageing in sunflower (*Helianthus annuus*) leaves: expression and activity of glutamine synthetase isoform are regulated differently during senescence // *Physiol. Plant.* 2006. Vol. 128. P. 175–185.

Choundhury N. K., Behera R. K. Photoinhibition of photosynthesis: role of carotenoids in photoprotection of chloroplast constituents // *Photosynthetica.* 2001. Vol. 39. P. 481–488.

Constable G. A., Ranson H. M. Effect of leaf position, expansion and age on photosynthesis, transpiration and water use of cotton // *Austral. J. Plant Physiol.* 1980. Vol. 28. P. 373–382.

Einig W., Mertz A., Hampp R. Growth rate, photosynthetic activity and leaf development of Brazil pine seedlings (*Araucaria angustifolia* [Bert.] O.Ktze.) // *Plant Ecology.* 1999. Vol. 143. P. 23–28.

Greer D. H., Halligan E. A. Photosynthetic and fluorescence light responses for kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) leaves at different stages of development on vines grown at two different photon flux densities // *Austral. J. Plant Physiol.* 2001. Vol. 28. P. 373–382.

Kołodziejek I., Wałęza M., Mostowska A. Morphological, histochemical and ultrastructural indicators of maize and barley leaf senescence // *Biologia Plantarum.* 2006. Vol. 50, N 4. P. 565–573.

Krupa Z., Moniak M. The stage of leaf maturity implicates the response of the photosynthetic apparatus to cadmium toxicity // *Plant Sci.* 1998. Vol. 138. P. 149–156.

Lagriffoul A., Mocquot B., Mench M., Vangronsveld J. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.) // *Plant and soil.* 1998. Vol. 200. P. 241–250.

Lichtenthaler H. K. Chlorophylls and carotenoids – pigments of photosynthetic biomembranes // *Methods in enzymology.* 1987. Vol. 148. P. 350–382.

Lieth J. H., Pasián C. C. A model for photosynthesis of rose leaves as a function of photosynthetically active radiation, leaf temperature and leaf age // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1990. Vol. 115. P. 486–491.

McKenna I. M., Chaney R. L., Williams F. M. The effect of cadmium and zinc interactions on the accumulation and tissue distribution of zinc and

cadmium in lettuce and spinach // *Environ. Pollut.* 1993. Vol. 79. P. 113–120.

Miller A., Schlaghauer C., Spalding M., Rodermeil S. Carbohydrate regulation of leaf development: prolongation of leaf senescence in Rubisco antisense mutants of tobacco // *Photosynth. Res.* 2000. Vol. 63. P. 1–8.

Molas J. Changes in morphological and anatomical structure of cabbage (*Brassica oleracea* L.) outer leaves and in ultrastructure of their chloroplasts caused by an *in vitro* excess of nickel // *Photosynthetica.* 1997. Vol. 34, N 4. P. 513–522.

Monnet F., Vaillant N., Vernay P., Coudret A., Sallanon H., Himi A. Relationship between PSII activity, CO₂ fixation, and Zn, Mn and Mg contents of *Lolium perenne* under zinc stress // *J. Plant Physiol.* 2001. Vol. 158. P. 1137–1144.

Niinemets Ü., Cescatti A., Rodeghiero M., Tosens T. Leaf internal diffusion conductance limits photosynthesis strongly in older leaves of Mediterranean evergreen broad-leaves species // *Plant Cell Environ.* 2005. Vol. 28. P. 1552–1566.

Page V., Weisskopf U., Feller U. Heavy metals in white lupin: uptake, root-to-shoot transfer and redistribution within the plant // *New Phytol.* 2006. Vol. 171. P. 329–341.

Skórzyńska-Polit E., Baszyński T. Differences in sensitivity of the photosynthetic apparatus in Cd-stressed runner bean plants in relation to their age // *Plant Sci.* 1997. Vol. 128, N 1. P. 11–21.

Smart C.M. Gene expression during leaf senescence // *New Phytol.* 1994. Vol. 126. P. 419–448.

Suzuki S., Nakamoto H., Ku M. S. B., Edwards G. E. Influence of leaf age on photosynthesis, enzyme activity and metabolite levels in wheat // *Plant Physiol.* 1987. Vol. 84. P. 1244–1248.

Vassilev A., Tsonev T., Yordanov I. Physiological response of barley plants (*Hordeum vulgare* L.) to cadmium contamination in soil during ontogenesis // *Environ. Pollut.* 1998. Vol. 103. P. 289–297.

Vassilev A., Lidon F., Scotti P., Da Graca M., Yordanov I. Cadmium-induced changes in chloroplast lipids and photosystem activities in barley plants // *Biol. Plant.* 2004. Vol. 48, N 1. P. 153–156.

Xie S., Luo X. Effect of leaf position and age on anatomical structure, photosynthesis, stomatal conductance and transpiration of Asian pear // *Bot. Bull. Acad. Sin.* 2003. Vol. 44. P. 297–303.

Xu Z. Z., Zhou G. S., Wang Y. L., Han G.X., Li Y. J. Changes in chlorophyll fluorescence in maize plants with imposed rapid dehydration at different leaf ages // *J. Plant Growth Regul.* 2008. Vol. 27. P. 83–92.

Zhang S. B., Hu H., Li Z. R. Variation of photosynthetic capacity with leaf age in an alpine orchid, *Cypripedium flavum* // *Acta Physiol. Plant.* 2008. Vol. 30. P. 381–388.

Zima J., Sestak Z. Photosynthetic characteristics during ontogenesis of leaves: Carbon fixation pathways, their enzymes and products // *Photosynthetica.* 1979. Vol. 13. P. 83–106.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Казнина Наталья Мстиславовна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
e-mail: kaznina@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 762706

Титов Александр Федорович

председатель КарНЦ РАН, чл.-корр. РАН, д. б. н., проф.
руководитель лаб. экологической физиологии растений
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
e-mail: titov@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769710

Лайдинен Галина Федоровна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
e-mail: laidinen@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 762706

Батова Юлия Валерьевна

научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия 185910
e-mail: batova@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 762706

Kaznina, Natalia

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., Petrozavodsk,
Karelia, Russia 185910
e-mail: kaznina@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 762706

Titov, Alexandr

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., Petrozavodsk,
Karelia, Russia 185910
e-mail: titov@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769710

Laidinen, Galina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., Petrozavodsk,
Karelia, Russia 185910
e-mail: laidinen@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 762706

Batova, Yulia

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., Petrozavodsk,
Karelia, Russia 185910
e-mail: batova@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 762706

УДК 574.583+581.526.3

СРЕДООБРАЗУЮЩАЯ РОЛЬ ГИДРОФИТОВ В РАЗВИТИИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ПЛАНКТОННЫХ СООБЩЕСТВ

С. А. Курбатова, Н. А. Лаптева, И. Ю. Ершов, Е. В. Борисовская

Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН

В экспериментальных экосистемах исследованы изменения ряда гидрохимических параметров среды и структурно-функциональных характеристик бактерий, фито- и зоопланктона в присутствии гидрофитов различных экологических групп (погруженных и плавающих). Показано преобладание деструкционных процессов, снижение бактериальной продукции и фотосинтеза водорослей, изменение видовой структуры зоопланктона среди водных растений. Выявлена обратная зависимость обилия рачка *Daphnia longispina* от уровня минерализации.

Ключевые слова: гидрофиты; *Hydrocharis morsus-ranae*; *Elodea canadensis*; *Ceratophyllum demersum*; бактерии; фитопланктон; зоопланктон; численность; биомасса; продукция; деструкция.

S. A. Kurbatova, N. A. Lapteva, I. Yu. Yershov, E. V. Borisovskaya. ENVIRONMENTAL ROLE OF HYDROPHYTES IN DEVELOPMENT AND FUNCTIONING OF PLANKTONIC COMMUNITIES

Changes in some hydrochemical parameters of the environment and in the structural and functional characteristics of bacteria, phytoplankton and zooplankton in the presence of different ecological groups of hydrophytes (submerged and floating) were studied in experimental ecosystems. We demonstrate that destructive processes prevailed, bacterial production and photosynthesis of algae decreased, zooplankton species composition changed among the aquatic plants. An inverse relationship was found between the abundance of the crustacean *Daphnia longispina* and the level of mineralization.

Key words: hydrophytes; *Hydrocharis morsus-ranae*; *Elodea canadensis*; *Ceratophyllum demersum*; bacteria; phytoplankton; zooplankton; abundance; biomass; production; destruction.

Введение

Водные растения играют важную роль в создании гидробиологического режима водоема и формировании качества воды [Олейник и др., 1988; Ратушняк, 2002]. В период вегетации и в процессе отмирания высшие водные растения поставляют в водную толщу и грунт синтезированные ими органические соединения и минеральные элементы. Одновременно растения поглощают

минеральные вещества из воды и грунтов [Щепански, 1977]. На зарастающих высшими растениями мелководьях создаются благоприятные условия для развития в воде и илах разнообразных групп бактерий, выполняющих различные физиологические функции [Марголина, Куклин 1976; Кудрявцев, 1978; Якушин, 1987]. Скопление бактерий в этих биотопах привлекает зоопланктон и зообентос, которые служат пищей для молоди и взрослых рыб [Родина, 1959]. В воде зарослей отмечают

богатый видовой состав и высокую биомассу зоопланктона [Семенченко, Разлуцкий, 2009; Kuczyńska-Kippen, Joniak, 2010]. В смежных с зарослями участках открытой воды наблюдают повышенную продуктивность фитопланктона, что свидетельствует о поступлении в эти зоны биогенных веществ [Пырина и др., 1976].

Тем не менее не вполне ясно, как растения влияют на формирование сообществ пелагической пищевой сети. Изучение данной проблемы в значительной степени затруднено ее сложностью и характером приемов и методических подходов. В природных водоемах на функционирование сообществ гидробионтов оказывает влияние множество абиотических и биотических факторов, которые в полном объеме не могут быть учтены исследователями. Поэтому натурные наблюдения не позволяют сделать конкретные заключения о роли водных растений в жизнедеятельности гидробионтов. В связи с этим возникает необходимость проведения эксперимента с использованием модельных экосистем, когда большинство факторов находятся под контролем исследователей.

Цель работы – в условиях эксперимента оценить влияние гидрофитов на изменение гидрохимии воды, развитие и функционирование планктонных сообществ.

Материалы и методы

Экспериментальные экосистемы создавали в полевых условиях в пластиковых лотках, которые для предотвращения резких суточных колебаний температуры помещали в заполненный водой бетонный бассейн. В лотки заливали отфильтрованную через сеть с ячейей 76 мкм речную воду до уровня 0,3 м. Общий объем воды составлял в каждом лотке 300 л. Зоопланктон предварительно отлавливали из прудов и концентрировали в одной емкости. Затем примерно в равном количестве распределяли в опытные лотки. Для адаптации зоопланктона к условиям эксперимента отводили неделю, потом в лотки помещали растения. Плотность посадки погруженных гидрофитов – роголистника *Ceratophyllum demersum* L. и элодеи *Elodea canadensis* Michx. составляла по 1000 г сырой массы на лоток, плавающего на поверхности водокраса *Hydrocharis morsus-ranae* L. – по 250 розеток (400 г на лоток). В контроле растений не было. Каждый вариант опыта выполняли в трех повторностях. Поверхность лотков затягивали сеткой, чтобы исключить попадание насекомых, моллюсков, опада с деревьев, и на 1/3 закрывали тканью для создания тени и предот-

вращения чрезмерной инсоляции гидрофитов, обитающих в природе, как правило, под ряской или в тени воздушно-водных растений. Эксперимент проходил в период активной вегетации растений и длился 2 месяца (2.07.08–2.09.08).

Ежедневно в утренние часы (9⁰⁰–10⁰⁰) регистрировали показатели температуры и pH. Ежедневно определяли содержание O₂, концентрации основных катионов (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺), гидрокарбонатов, общую минерализацию, БПК₅ [Алекин и др., 1973]. Концентрации катионов устанавливали с помощью пламенного фотометра Flarno-4 и атомно-абсорбционного спектрофотометра AAS-1. Общую минерализацию рассчитывали по методике [Хлебович, 1974]. Одновременно отбирали пробы для анализа структурно-функциональных характеристик бактерий, фито- и зоопланктона. Общую численность бактерий (ОЧБ) определяли с использованием метода эпифлуоресцентной микроскопии с флуорохромом Дафи [Porter, Feig, 1980]. Биомассу бактерий рассчитывали исходя из численности и средних размеров клеток, которые измеряли окулярной линейкой. Удельный вес бактерий принимали за единицу. Определяли скорость гетеротрофной ассимиляции ¹⁴CO₂ бактериями и по ее значениям рассчитывали бактериальную продукцию. Первичную продукцию и деструкцию ОВ изучали по изменению кислорода в темных и светлых склянках в течение суток [Кузнецов, Дубинина, 1989]. Содержание хлорофилла *a* измеряли спектрофотометрическим методом [Определение..., 1982]. Зоопланктон отбирали пробоотборником на 0,5 л в шести точках лотка и фиксировали в 4%-м формалине. Пробы обрабатывали, пользуясь общепринятыми гидробиологическими методами [Методические..., 1982].

Рассчитывали средние по повторностям величины, стандартные отклонения и доверительные интервалы. Связь между определяемыми параметрами оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Результаты

Гидрохимические характеристики. В период наблюдений средняя температура воды в утренние часы составляла 18 °С, изменяясь от 11 до 22 °С.

В экспериментальных экосистемах с водокрасом показатель pH на протяжении опыта был близок к нейтральным значениям, а концентрация кислорода была меньше, чем в других вариантах. В лотках с погруженными гидрофитами отмечали более сильное насыщение воды кислородом и смещение pH в щелочную сторону (табл.).

Изменение гидрохимических показателей в присутствии различных видов растений (среднее за опыт значение показателя (минимальное–максимальное))

	O ₂ , мг/л	pH	HCO ₃ ⁻ , мг/л	Общая минерализация, мг/л	Na ⁺ , мг/л	K ⁺ , мг/л	Ca ²⁺ , мг/л	Mg ²⁺ , мг/л	БПК ₅ , мг O ₂ /л
Без растений	10,2 (8,8–12,2)	8,7 (8,2–9,1)	19,3 (10,1–26,3)	78,1 (63,9–105,9)	3,7 (2,7–5,2)	1,5 (1,1–2,1)	35,5 (26,7–54,9)	20,6 (17,3–26,2)	2,3 (1,6–3,3)
<i>Hydrocharis morsus-ranae</i>	8,4 (6,9–10,5)	7,6 (7,1–8,1)	19,6 (12,2–26,5)	72,2 (58,1–92,6)	3,8 (3,1–5,3)	1,4 (0,6–2,4)	33,5 (20,3–52,5)	20,4 (17,1–25,8)	2,1 (1,3–3,2)
<i>Ceratophyllum demersum</i>	11,0 (9,2–12,9)	9,4 (8,8–9,7)	16,8 (10,8–28,0)	72,8 (59,9–93,7)	4,1 (3,3–5,1)	2,3 (1,6–3,0)	31,4 (24,4–51,7)	19,1 (15,3–25,6)	2,9 (1,3–4,9)
<i>Elodea canadensis</i>	11,4 (10,0–13,6)	9,6 (9,2–9,9)	11,4 (8,0–14,6)	47,0 (40,3–62,4)	2,6 (1,8–4,9)	0,2 (0,03–0,6)	15,9 (12,4–27,2)	17,9 (13,5–25,1)	1,9 (1,0–3,2)

В присутствии всех растений происходило уменьшение общей минерализации воды. В экспериментальных экосистемах с элодеей значительно ниже становилась концентрация всех измеряемых катионов и гидрокарбонатов, общая минерализация была почти в 2 раза меньше, чем в контроле. В присутствии роголистника увеличивалась концентрация K⁺ в воде. Наименьшим изменениям в экспериментальных экосистемах с растениями подвергалась концентрация Mg²⁺ (табл.).

В экосистемах с растениями БПК₅ в течение первой недели эксперимента превышало контрольные значения, затем снизилось. Увеличение БПК₅ к концу эксперимента (со второй половины августа) происходило в лотках с роголистником.

Структурно-функциональные характеристики микроорганизмов и водорослей. Кривые динамики численности и биомассы бактерий носили пилообразный характер, особенно в вариантах с гидрофитами (рис. 1). Минимальное количество бактерий отмечали в начале опыта: в экосистемах без растений ~0,5 млн кл./мл, с растениями 0,8–1 млн кл./мл. Через 2 недели опыта численность бактерий в контроле и в варианте с роголистником достигла 2 млн кл./мл, в присутствии элодеи и водокраса она оставалась на уровне 1 млн кл./мл. Численность бактерий в лотках с элодеей была ниже контрольной на протяжении всего опыта (рис. 1: б). Лишь в конце лета она увеличилась до 2 млн кл./мл и ее значения приблизились к нижнему уровню контрольных. В присутствии водокраса развитие бактерий было скачкообразным (рис. 1: а). Отмечали три пика в динамике ОЧБ. Первый, в конце июля, достигал 3,3 млн кл./мл, что выше контроля в три раза. Затем произошел спад численности до 0,8 млн кл./мл. Рост ОЧБ вновь зафиксирован в конце второй декады августа (2,1 млн кл./мл) с максимумом в начале сентября (3,5 млн кл./мл). В экспериментальных экосистемах с роголистником первый подъем ОЧБ

до 1,9 млн кл./мл был растянут с середины до конца июля (рис. 1: в), второй (2,9 млн кл./мл) отмечали в конце августа – начале сентября.

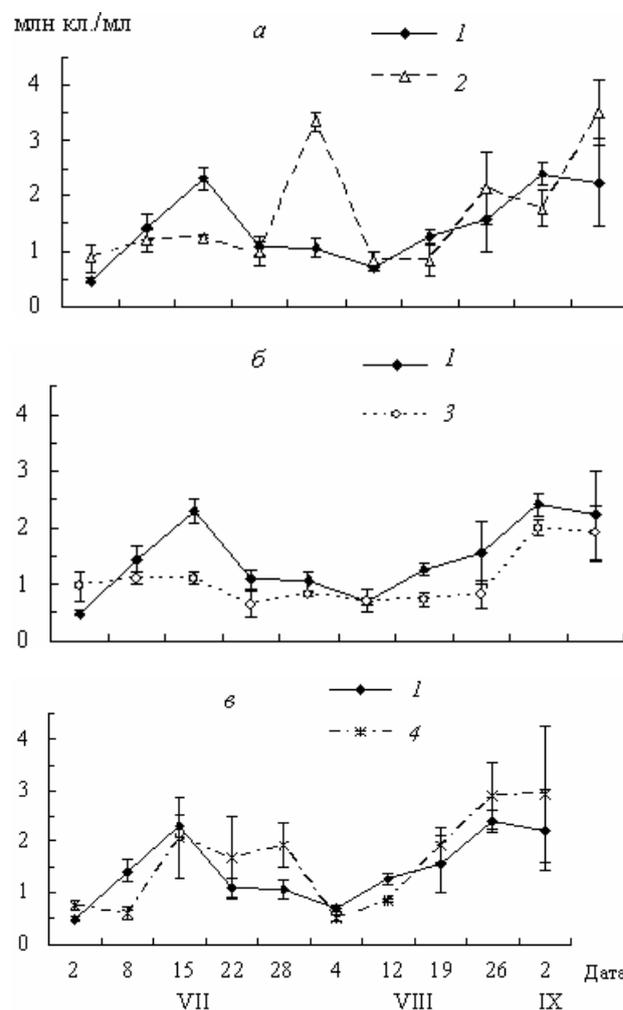


Рис. 1. Численность бактерий в эксперименте: 1 – контроль, 2 – с водокрасом, 3 – с элодеей, 4 – с роголистником

Биомасса бактерий соответствовала динамике их численности. Ее величины варьировали в течение эксперимента от минимальных 0,03–0,08 мг/л в начале опыта и в первой декаде

августа до максимальных 0,1–0,4 мг/л во вторую и третью декады июля и августа. Наименьшие значения биомассы бактерий характерны для экосистем с элодеей (0,06–0,16 мг/л). В контроле максимальная биомасса 0,22 мг/л наблюдалась в середине июля, а в лотках с водокрасом и роголистником значительное повышение биомассы (до 0,28 мг/л) происходило в конце августа – начале сентября.

Через 7 дней опыта активность гетеротрофных бактерий была наименьшей в вариантах с элодеей и в контроле (1,2 и 1,9 мкг С/(л·сут) соответственно), наибольшей – с водокрасом (3,7 мкг С/(л·сут)) и с роголистником (3,4 мкг С/(л·сут)). В последующие сроки в экосистемах с водокрасом и элодеей в среднем ассимилировалось 1,4 мкг С/(л·сут), в присутствии роголистника – 1,8 мкг С/(л·сут), в контроле – 2,5 мкг С/(л·сут).

Бактериальная продукция, рассчитанная по гетеротрофной ассимиляции, была невелика и значительно варьировала в течение опыта. Через неделю она была максимальной в экосистемах с водокрасом и роголистником (62–56 мкг С/(л·сут)), меньшей – с элодеей и в контроле (20–30 мкг С/(л·сут)). Со второй декады августа и до начала сентября величины бактериальной продукции во всех экспериментальных экосистемах с растениями были в 2 раза ниже контрольных.

Максимальная скорость деструкции ОВ (рис. 2) через неделю опыта в лотках с водокрасом составляла 1,73 мг O_2 /(л·сут), в присутствии элодеи – 1,5 мг O_2 /(л·сут), с роголистником – 0,47 мг O_2 /(л·сут), в контроле – 1,16 мг O_2 /(л·сут). Далее в середине июля наблюдалось снижение скорости деструкции в вариантах с водокрасом (до 0,28 мг O_2 /(л·сут)) и с элодеей (до 0,13 мг O_2 /(л·сут)), чуть позже, в последней декаде июля – в присутствии роголистника (до 0,13 мг O_2 /(л·сут)). В контроле в этот период скорость распада ОВ составляла 0,43–0,63 мг O_2 /(л·сут), а ее снижение происходило в период с конца июля до второй декады августа (0,23 мг O_2 /(л·сут)), затем в конце августа скорость вновь увеличилась (0,67 мг O_2 /(л·сут)). В начале сентября при снижении температуры воды скорость деструкции ОВ существенно уменьшилась. Наиболее неравномерно деструкция ОВ протекала в экспериментальных экосистемах с водокрасом и элодеей. Изменение ее величин варьировало в пределах 0,09–1,73 мг O_2 /(л·сут) и 0–1,5 мг O_2 /(л·сут) соответственно. В вариантах с роголистником изменение деструкции было плавным и скорость распада ОВ приближалась к контрольным значениям.

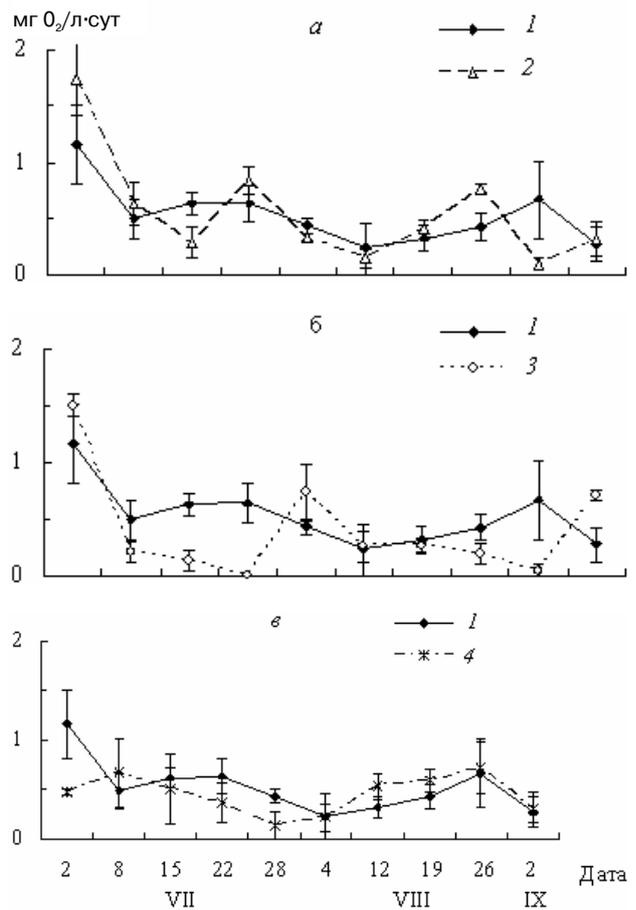


Рис. 2. Скорость деструкции органического вещества в экспериментальных экосистемах. Обозначения 1–4 как на рис. 1

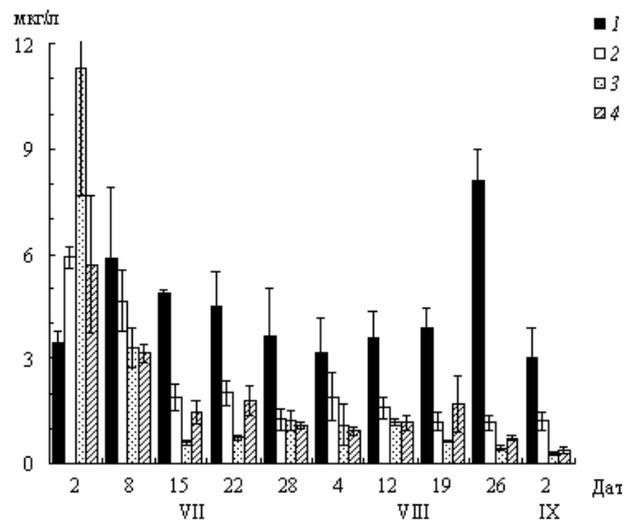


Рис. 3. Содержание хлорофилла *a* в воде экспериментальных экосистем. Обозначения 1–4 как на рис. 1

Концентрация хлорофилла *a* спустя неделю от начала эксперимента во всех вариантах с гидрофитами снизилась (рис. 3). Средние показатели за период наблюдений составили

в контроле 4,5 мкг/л, с водокрасом – 1,9 мкг/л, с элодеей – 1,1 мкг/л, с роголистником – 1,4 мкг/л. Во всех экспериментальных экосистемах с растениями прослеживалась тесная корреляционная зависимость концентрации хлорофилла от содержания основных катионов и общей минерализации воды.

В контроле дважды происходил подъем величин фотосинтеза фитопланктона. В начале опыта фотосинтез составил 1,27 мг O_2 /(л·сут), в третьей декаде июля – 1,1 мг O_2 /(л·сут), затем до конца эксперимента не превышал 0,5 мг O_2 /(л·сут) с минимумом в начале августа. В присутствии растений фотосинтез фитопланктона, как правило, протекал с более низкой, чем в контроле, скоростью. В среднем фотосинтез был максимальным в контрольных экосистемах (0,64 мг O_2 /(л·сут)), минимальным – с элодеей (0,2 мг O_2 /(л·сут)). В присутствии водокраса и роголистника средняя величина фотосинтеза составила 0,47 и 0,32 мг O_2 /(л·сут) соответственно. Отношение фотосинтеза к деструкции, рассчитанное по средним за период наблюдений данным, было наибольшим в контроле (1,2). В экспериментальных экосистемах с растениями деструкция ОВ шла интенсивнее, чем образование первичной продукции. Величина отношения фотосинтеза к деструкции убывала в ряду: водокрас (0,8) – роголистник (0,6) – элодея (0,5).

Зоопланктон. В зоопланктоне экспериментальных экосистем определено 44 вида. Из них 22 вида – Rotifera, 12 – Cladocera, 10 – Copepoda. Изначально зоопланктон всех вариантов включал хищную каляниду *Heterocope saliens* Lilljeborg. Это наиболее существенный фактор, влияющий на обилие других видов зоопланктонного сообщества. При доминировании *H. saliens*, когда этот рачок составлял 60–100 % биомассы зоопланктона, общая численность оставалась на низком уровне. Она начинала увеличиваться после исчезновения *H. saliens* из сообщества (рис. 4). Между численностью *H. saliens* и остального зоопланктона во всех вариантах опыта установлены высокие коэффициенты корреляции ($r = -0,7...-0,8$; $p < 0,05$). Срок доминирования *H. saliens* в экспериментальных экосистемах с различными видами растений и в контроле отличался. Постепенное снижение численности этого рачка наблюдали во всех вариантах. Наибольший период времени (6 недель) *H. saliens* отмечали в контрольных пробах и с водокрасом, затем, очевидно, происходило естественное завершение жизненного цикла рачка [Рылов, 1930]. В лотках с погруженными растениями *H. saliens* выбывала из сообщества значительно раньше: через 4 недели – с роголистником и через 2 недели – с элодеей.

В дальнейшем структура зоопланктона экспериментальных экосистем различных вариантов опыта имела свои особенности. В присутствии всех растений увеличивалось видовое разнообразие. В контроле индекс видового разнообразия (Шеннона) был небольшим и не превышал 2 бит/экз. В экспериментальных экосистемах с гидрофитами он изменялся в пределах 2–3 бит/экз. Индекс видового сходства (Серенсена) между вариантами с погруженными растениями (элодеей и роголистником) был высоким и в течение эксперимента принимал значения от 0,6 до 0,9. Наименьшее видовое сходство отмечено между контролем и экосистемами с водокрасом. В этом случае индекс колебался в пределах от 0,2 до 0,6. В контроле после периода доминирования *H. saliens* общая численность зоопланктона возрастала за счет мелкоразмерных организмов: науплиусов Copepoda, хидорид *Alona rectangula* Sars и *Chydorus sphaericus* (O. F. Müller). Из коловраток более многочисленной была *Lecane luna* Müller. Биомасса зоопланктона составляла 0,18–0,44 мг/л.

В экспериментальных экосистемах с водокрасом небольшая численность сохранялась на протяжении всего опыта (рис. 4: б). Биомасса изменялась в пределах 0,09–0,58 мг/л. Доминировали ювенильные Cyclopoida (науплиусы и копеподиты). В меньшем, чем в контроле, количестве развивались хидориды. В отличие от контроля в пробах постоянно присутствовал рачок *Simocephalus vetulus* (O. F. Müller) (в среднем за опыт – 1 экз./л). Отмечалась более высокая численность коловраток (в среднем 2 экз./л против 0,7 экз./л в контроле). Наибольшее развитие получили *Lecane luna*, *L. (M.) lunaris* Ehrenberg, *Mytilina mucronata* Müller, *M. ventralis* Ehrenberg, *Euchlanis dilatata* Ehrenberg, *Testudinella patina* (Hermann), *Trichotria pocillum* Müller.

Для экосистем с погруженными растениями характерно развитие обычных для литорали и зарослей водных растений Copepoda: *Mesocyclops leuckarti* (Claus), *Eucyclops serrulatus* (Fisch.), *E. macruroides* (Lill.), *Megacyclops viridis* (Jur.). Как с роголистником, так и с элодеей количество Cladocera было выше, чем в контроле и с водокрасом. В присутствии роголистника численность рачков сем. Chydoridae достигала в среднем 12 экз./л. Обильно развивались *Graptoleberis testudinaria* (Fischer) и *C. sphaericus*. С большей, чем с водокрасом, численностью в пробах присутствовал *S. vetulus* (в среднем 4 экз./л). К концу опыта отмечалось появление единичных особей *Daphnia longispina* O. F. Müller. Численность и биомасса коловраток превышали контрольные значения первые 7 недель опыта. Наиболее массовыми

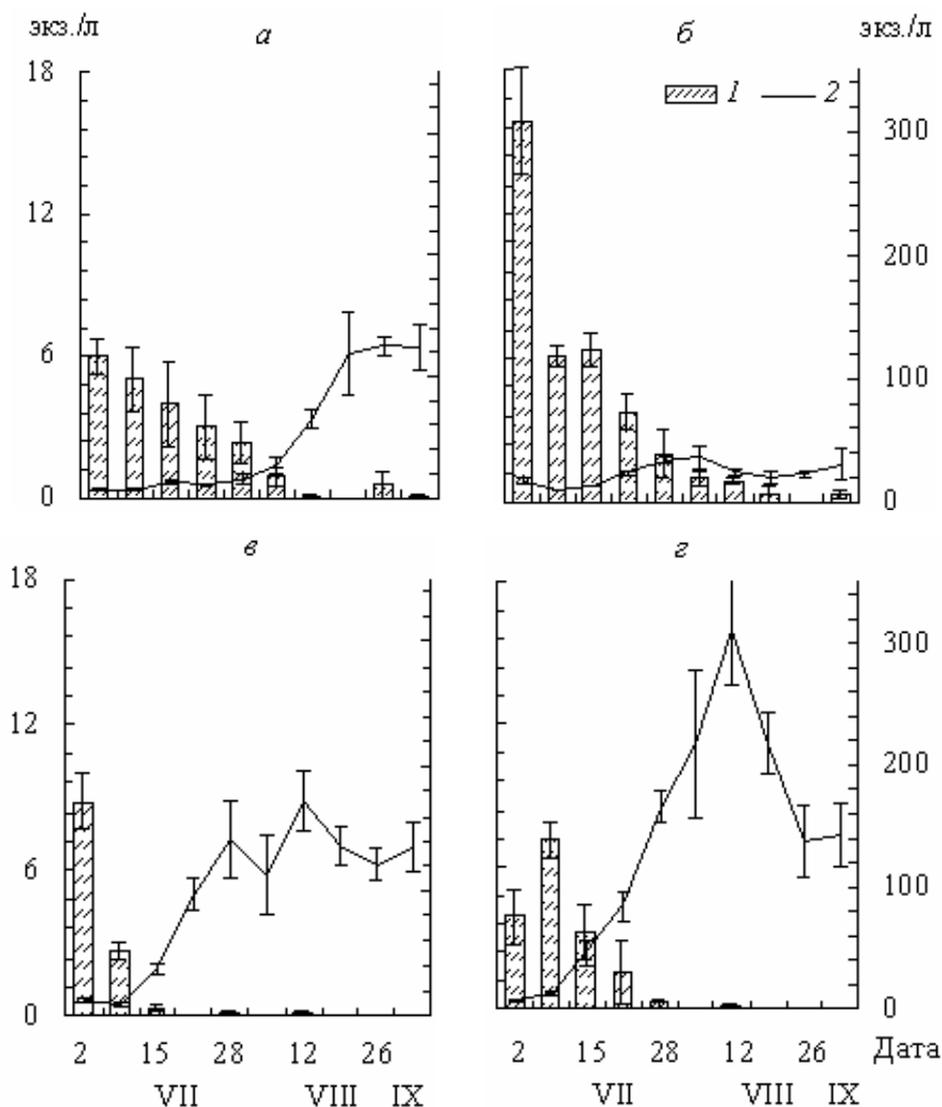


Рис. 4. Динамика численности *Heteroscope saliens* (1) (левая ось ординат) и общей численности зоопланктона (2) (правая ось ординат): а – в контроле, б – с водокрасом, в – с элодеей, г – с роголистником

были *Lecane (M.) arcuata* (Bryce), *Mytilina ventralis*, *T. patina*. После исчезновения *H. saliens* из сообщества биомасса зоопланктона среди роголистника составляла от 0,43 до 1,17 мг/л.

В лотках с элодеей многочисленнее, чем в других вариантах опыта, были крупноразмерные Cladocera – *S. vetulus* и *D. longispina*, достигавшие в отдельные даты 16 и 19 экз./л (в среднем за эксперимент 5 и 6 экз./л) соответственно. Средняя за опыт численность хидорид составляла 13 экз./л. Преобладание *A. rectangulara* в начале эксперимента сменялось в последующем массовым развитием *C. sphaericus*. Наибольших величин по сравнению с другими вариантами достигала биомасса зоопланктона (0,59–2,00 мг/л). Коловратки в экспериментальных экосистемах с элодеей развивались слабо.

Обсуждение

Гидрофиты существенно меняют ряд гидрохимических показателей среды. В результате активного фотосинтеза погруженных растений (элодеи, роголистника), насыщения воды кислородом и изменения карбонатного равновесия значения pH в опыте смещались в щелочную сторону (табл.). У плавающего на поверхности водокраса увеличения концентрации O_2 в воде не происходило, так как газообмен осуществляется в основном в воздушной среде. Кроме того, плавающие листья водокраса создают тень для фитопланктона, снижая фотосинтез водорослей [Dvořák, 1987]. Средняя за опыт величина фотосинтеза и концентрация хлорофилла в лотках с водокрасом были ниже, чем в контроле. В результате в эксперимен-

тальных экосистемах с водокрасом отмечены наименьшие в опыте концентрации O_2 и близкие к нейтральным значения pH.

Влияние растений на минеральный состав воды в наибольшей степени прослеживалось в экспериментальных экосистемах с элодеей, где общая минерализация снизилась почти в 2 раза по сравнению с контролем. Значительно меньше становились концентрации Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , HCO_3^{2-} . Для элодеи характерен интенсивный обмен веществ и быстрый рост [Антропогенное..., 1980; Pokorný et al., 1984]. Только этот вид из трех, выбранных для опыта, к концу периода наблюдений увеличил свою массу в среднем на 27 %. Масса двух других видов уменьшилась. В естественном водоеме из-за постоянного обмена водных масс разница минерального состава воды внутри зарослей элодеи и вне их не столь заметна [Pokorný et al., 1984].

Уменьшение минерализации в экосистемах с гидрофитами может происходить не только в результате поглощения минеральных веществ, но также вследствие осаждения $CaCO_3$ при повышении pH [Алекин, 1970]. Появление значительного количества кристаллов углекислого кальция на листьях растений и стенках лотков было особенно заметно в варианте с роголистником. Существует мнение, что этот процесс может усиливать седиментацию фитопланктона и способствовать смене доминирующих в нем форм [van Donk, van de Bund, 2002].

В лотках с водокрасом минерализация значительно коррелировала с концентрацией гидрокарбонатов ($r = 0,98$; $p < 0,05$), что косвенно свидетельствует о слабом использовании высшими растениями и водорослями в этих системах минерального углерода.

Уровень минерализации и pH могут определять развитие отдельных видов гидробионтов. К примеру, известно, что у *C. sphaericus* два оптимума развития: при pH 5 и pH 9 [Мануйлова, 1964]. В эксперименте именно среди погруженных растений, где происходило защелачивание среды, *C. sphaericus* достигал максимальной численности. В присутствии элодеи и роголистника отмечали обратную зависимость количества рачков *D. longispina* от общей минерализации ($r = -0,84$ и $-0,76$ соответственно, $p < 0,01$). С элодеей при наименьшем в опыте уровне общей минерализации воды *D. longispina* была многочисленнее, чем в других вариантах. Увеличение численности *D. longispina* на фоне снижения минерализации наблюдали ранее в другом эксперименте [Курбатова, 2005].

В лотках с элодеей в условиях низкой минерализации отмечены минимальное содержание хлорофилла и малая скорость фотосинтеза.

Очевидно, небольшие показатели численности и функциональной активности бактерий в этих экосистемах также обуславливались минимальным содержанием минеральных и органических веществ, щелочной pH среды, а также прессом со стороны фильтраторов Cladocera.

Изменение БПК₅ в экспериментальных экосистемах с гидрофитами – это следствие изменения функционирования сообществ гидробионтов различных уровней. Так, снижение БПК₅ через неделю от начала эксперимента происходило одновременно с падением концентрации хлорофилла и, вероятно, связано с уменьшением продуцирования лабильного органического вещества (ЛОВ) фитопланктоном. Прямая зависимость БПК₅ от содержания хлорофилла *a* ($r = 0,72$; $p < 0,05$) установлена в лотках с водокрасом. Усиление БПК₅ в экосистемах с роголистником к концу эксперимента совпадало по времени с накоплением отмерших листьев и стеблей и увеличением численности и биомассы бактерий. В свою очередь численность бактерий связана ($r = 0,7$; $p < 0,05$) с концентрацией K^+ , которая в 1,5–2,3 раза превышала контрольные значения в присутствии роголистника.

В лотках с роголистником трофические связи усложнялись, так как большое значение приобретал детрит, накапливающийся в результате отмирания базальной части побегов. В этих условиях, по-видимому, возросло значение простейших, численность которых в эксперименте не контролировалась. Отличительной чертой зоопланктона экспериментальных экосистем с роголистником было обильное развитие рачка-детритофага *G. testudinaria* и фитофильных коловраток.

Немаловажную роль в изменении структурно-функциональных показателей водорослей и микроорганизмов играют вторичные метаболиты высших водных растений, выделяемые ими в период активной вегетации и при отмирании. Показано, что погруженные растения секретируют ЛОВ, которое быстро включается в биотический круговорот [Wetzel, Manny, 1972]. Большое количество выделенных органических веществ утилизируется эпифитными бактериями и перифитонном до того, как поступят в воду литоральной или пелагической зоны [Wetzel, Manny, 1972]. Активность эпифитов высока, и организмы, составляющие перифитон, усиливают дефицит питательных веществ для фито- и бактериопланктона. У плавающих растений продуцирование органического вещества значительно ниже [Wetzel, Manny, 1972]. Известно альгицидное действие гидрофитов, в частно-

сти роголистника и элодеи, на отдельные виды водорослей [Коган, Чиннова, 1972; Wium-Andersen, 1987; van Donk, van de Bund, 2002; Gross et al., 2003]. Установлено также выраженное бактерицидное действие эфирного масла роголистника [Курашов и др., 2010]. Чувствительность водорослей к аллелопатическим веществам, а также состав и концентрации летучих низкомолекулярных органических веществ эфирного масла водных растений зависят от фазы развития растений и условий среды, в частности от температуры и содержания фосфора [Fitzgerald, 1969; Mjelde, Faafeng, 1997; Курашов и др., 2010]. Перечисленные обстоятельства, по-видимому, внесли вклад в снижение бактериальной продукции и фотосинтеза фитопланктона в экспериментальных экосистемах с растениями. В среднем за период наблюдений бактериальная продукция в лотках с водокрасом снижена на 32 % по сравнению с контролем, с роголистником – на 20 %, с элодеей – на 42 %. Величина фотосинтеза была ниже контрольной на 40 % с водокрасом, на 58 % с роголистником и на 74 % с элодеей.

Несмотря на снижение бактериальной продукции, в присутствии водокраса и роголистника численность бактерий в отдельные даты превышала контрольные значения (рис. 1), что, очевидно, связано с процессами разложения растительных остатков. В лотках с водокрасом от биомассы бактерий напрямую зависела численность колониальных ($r = 0,7$; $p < 0,05$). Среди роголистника численность бактерий имела обратную корреляцию с биомассой зоопланктона ($r = -0,64$; $p < 0,05$).

Скорость деструкционных процессов определялась абиотическими и биотическими факторами среды. В контроле деструкция ОВ коррелировала с биомассой зоопланктона ($r = 0,71$; $p = 0,02$) и одновременно с концентрациями катионов K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} ($r = 0,66-0,76$; $p < 0,05$). Последняя зависимость, вероятно, обусловлена опосредованно через связь функциональной активности деструкторов с минеральным составом среды. В лотках с водокрасом и роголистником скорость деструкции напрямую связана с активностью водорослей, то есть с величиной фотосинтеза ($r = 0,87$ и $0,8$ соответственно; $p < 0,01$). В экспериментальных экосистемах с элодеей в условиях наименьшего развития бактерий и фитопланктона, а также низкой минерализации значимой зависимости величины деструкции от других определяемых в опыте параметров установлено не было.

Превышение деструкции над фотосинтезом в присутствии гидрофитов наблюдали и в природных условиях [Рыбакова, 2010]. Это объясняется повышенным содержанием ЛОВ и минеральных веществ, выделяемых растениями прижизненно и в процессе их бактериального разложения [Майстренко и др., 1969]. По-видимому, в зарослях фотосинтез планктонных водорослей в значительно меньшей степени, чем высшие водные растения, обеспечивает энергетические потребности бактериопланктона.

Выводы

В условиях эксперимента гидрофиты изменяют газовый режим в воде, значения pH, концентрации основных катионов и уровень общей минерализации. В среднем за период наблюдений отмечено снижение бактериальной продукции, содержания хлорофилла *a* в воде и фотосинтеза фитопланктона. Большинство характеристик бактериопланктона претерпевают значительные колебания величин, которые иногда превосходят контрольные. Наименьшее количество и функциональная активность бактерий и фитопланктона характерны для экспериментальных экосистем с элодеей. Среди гидрофитов (в большей степени в присутствии погруженных растений – элодеи, роголистника, в меньшей – с плавающим на поверхности водокрасом) деструкционные процессы преобладают над продукционными. Одно из проявлений прямого действия гидрофитов на зоопланктон, как результат изменения ряда гидрохимических показателей среды, – увеличение обилия видов, для которых создаются оптимальные условия. На количественные характеристики отдельных групп и видов зоопланктона гидрофиты влияют опосредованно через развитие кормовых объектов (водорослей, бактерий, детрита).

Исследования поддержаны Программой Президиума РАН «Биологическое разнообразие».

Литература

- Алекин О. А. Основы гидрохимии. Л.: Гидрометеорологическое изд-во, 1970. 444 с.
- Алекин О. А., Семенов А. Д., Скопинцев Б. А. Руководство по химическому анализу вод суши. Л.: Гидрометеоиздат, 1973. 272 с.
- Антропогенное воздействие на малые озера. Л.: Наука, 1980. 172 с.
- Коган Ш. И., Чиннова Г. А. О взаимоотношениях *Ceratophyllum demersum* L. с некоторыми сине-зелеными водорослями // Гидробиол. журн. 1972. Т. 8, № 5. С. 21–27.

Кудрявцев В. М. Численность бактерий в зарослях и обрастаниях высших водных растений // Гидробиол. журн. 1978. Вып. 14, № 6. С. 14–20.

Кузнецов С. И., Дубинина Г. А. Методы изучения водных микроорганизмов. М.: Наука, 1989. 285 с.

Курашов Е. А., Крылова Ю. В., Митрукова Г. Г. Теоретические и практические аспекты изучения метаболитов макрофитов и их роли в пресноводных экосистемах // Матер. I (VII) междунар. конф. по водным макрофитам «Гидробиотаника 2010». Ярославль: Принт Хаус, 2010. С. 176–178.

Курбатова С. А. Ответ зоопланктона микрокосмов на закисление // Известия АН. Сер. биологическая. 2005. № 1. С. 100–108.

Майстренко Ю. Г., Денисова А. И., Багнюк В. М., Арямова Ж. М. К роли высшей водной растительности в накоплении органических и биогенных веществ в водоемах // Гидробиол. журн. 1969. Т. 5, № 6. С. 28–39.

Мануйлова Е. Ф. Ветвистоусые рачки (*Cladocera*) фауны СССР. М.; Л.: Наука, 1964. 328 с.

Марголина Г. Л., Куклин В. В. Микробиологические процессы в зарослях высших водных растений Рыбинского водохранилища // Гидробиологический режим прибрежных мелководий верхневолжских водохранилищ. Тр. Ин-та биологии внутр. вод АН СССР. 1976. Вып. 33 (36). С. 74–83.

Методические рекомендации по сбору и обработке материалов при гидробиологических исследованиях на пресноводных водоемах. Зоопланктон и его продукция. Л.: ГосНИОРХ, 1982. 33 с.

Олейник Г. Н., Якушин В. М., Цаплина Е. Н. Влияние разложения высших водных растений на содержание органического вещества в воде // Водные ресурсы. 1988. № 2. С. 135–143.

Определение содержания хлорофилла в планктоне пресных водоемов. Киев: Наукова думка, 1982. 52 с.

Пырина И. Л., Башкатова Е. Л., Сигарева Л. Е. Первичная продукция фитопланктона в мелководной зоне Рыбинского водохранилища в 1971–1972 гг. // Гидробиологический режим прибрежных мелководий верхневолжских водохранилищ. Тр. Ин-та биологии внутр. вод АН СССР. 1976. Вып. 33 (36). С. 106–132.

Ратушняк А. А. Оценка роли сообществ макрофитов в формировании качества воды мелководий Куйбышевского водохранилища (на примере Свяжского и Мешинского заливов) // Экологическая химия. 2002. Т. 11, № 2. С. 133–139.

Родина А. Г. Бактериопланктон зон зарослей в озерах – кормовая база водных беспозвоночных // Доклады АН СССР. 1959. Т. 127, № 6. С. 1286–1290.

Рыбакова И. В. Численность, биомасса и активность бактерий в воде зарослей и обрастаниях высших водных растений // Биология внутр. вод. 2010. № 4. С. 15–24.

Рылов В. М. Определители организмов пресных вод СССР. Пресноводная фауна. Пресноводные Calanoida СССР. Л.: Всесоюз. акад. с.-х. наук, 1930. 288 с.

Семенченко В. П., Разлуцкий В. И. Факторы, определяющие суточное распределение и перемещение зоопланктона в литоральной зоне пресноводных озер (обзор) // Журн. Сибирского федерального университета. Сер. «Биология». 2009. № 2. С. 191–225.

Хлебович В. В. Критическая соленость биологических процессов. Л.: Наука, 1974. 236 с.

Щепански А. О макрофитах озер и их роли в круговороте веществ // Гидробиол. журн. 1977. Т. 13, № 6. С. 23–27.

Якушин В. М. Бактериальная флора и каталазная активность обрастаний высших водных растений // Гидробиол. журн. 1987. Вып. 23, № 3. С. 45–47.

Dvořák J. Production-ecological relationships between aquatic vascular plants and invertebrates in shallow waters and wetlands – a review // Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 1987. Vol. 27. P. 181–184.

Fitzgerald G. P. Some factors in the competition or antagonism among bacteria, algae, and aquatic weeds // J. Phycol. 1969. N 5. P. 351–359.

Gross E. M., Erhard D., Iványi E. Allelopathic activity of *Ceratophyllum demersum* L. and *Najas marina* ssp. *intermedia* (Wolfgang) Casper // Hydrobiologia. 2003. Vol. 506–509, N 1–3. P. 583–589.

Kuczyńska-Kippen N., Joniak T. The impact of water chemistry on zooplankton occurrence in two types (field versus forest) of small water bodies // Internat. Rev. Hydrobiol. 2010. Vol. 95, N 2. P. 130–141.

Mjelde M., Faafeng B. A. *Ceratophyllum demersum* hampers phytoplankton development in some small Norwegian lakes over a wide range of phosphorus concentrations and geographical latitude // Freshwater Biol. 1997. Vol. 37, N 2. P. 355–365.

Pokorný J., Kvěť J., Ondok J. P., Ostrý I. Production-ecological analysis of a plant community dominated by *Elodea canadensis* Michx // Aquatic Botany. 1984. Vol. 19, N 3–4. P. 263–292.

Porter K. G., Feig Y. S. The use of DAPI for identifying and counting of aquatic microflora // Limnol. Oceanogr. 1980. Vol. 25, N 5. P. 943–948.

van Donk E., van de Bund W. J. Impact of submerged macrophytes including charophytes on phyto- and zooplankton communities: allelopathy versus other mechanisms // Aquatic Botany. 2002. Vol. 72, N 3–4. P. 261–274.

Wetzel R. G., Manny B. A. Secretion of dissolved organic carbon and nitrogen by aquatic macrophytes // Verh. Internat. Verein. Limnol. 1972. Vol. 18, Pt. 1. P. 162–170.

Wium-Andersen S. Allelopathy among aquatic plants // Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 1987. Vol. 27. P. 167–172.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Курбатова Светлана Анатольевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН
Борок, Ярославская обл.,
Некоузский р-н, Россия, 152742
эл. почта: kurb@ibiw.yaroslavl.ru
тел.: (48547) 24486

Лаптева Нина Андреевна

ведущий научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН
Борок, Ярославская обл.,
Некоузский р-н, Россия, 152742
эл. почта: lap@ibiw.yaroslavl.ru
тел.: (48547) 24486

Ершов Игорь Юрьевич

научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН
Борок, Ярославская обл.,
Некоузский р-н, Россия, 152742
эл. почта: ershov@ibiw.yaroslavl.ru
тел.: (48547) 24486

Борисовская Елена Витальевна

младший научный сотрудник
Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН
Борок, Ярославская обл.,
Некоузский р-н, Россия, 152742
эл. почта: boris@ibiw.yaroslavl.ru
тел.: (48547) 24486

Kurbatova, Svetlana

I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters,
Russian Academy of Sciences
152742 Borok, Yaroslavl Region, Russia
e-mail: kurb@ibiw.yaroslavl.ru
tel.: (48547) 24486

Lapteva, Nina

I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters,
Russian Academy of Sciences
152742 Borok, Yaroslavl Region, Russia
e-mail: lap@ibiw.yaroslavl.ru
tel.: (48547) 24486

Yershov, Igor

I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters,
Russian Academy of Sciences
152742 Borok, Yaroslavl Region, Russia
e-mail: ershov@ibiw.yaroslavl.ru
tel.: (48547) 24486

Borisovskaya, Elena

I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters,
Russian Academy of Sciences
152742 Borok, Yaroslavl Region, Russia
e-mail: boris@ibiw.yaroslavl.ru
tel.: (48547) 24486

УДК 581.143:577.175.1

ВЛИЯНИЕ ТИДИАЗУРОНА НА ТЕРМОУСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ

А. С. Лукаткин, Н. Н. Каштанова

Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева

Семена кукурузы, обработанные тидиазуроном (ТДЗ) в концентрациях от 10^{-8} до 10^{-11} М, проращивали при комнатной температуре до возраста 7 суток, затем проростки выдерживали 20 ч при температуре 43 или 3 °С (контроль – при 25 °С) с последующим выращиванием в рулонной культуре до возраста 14 суток, после чего определяли параметры роста и состояние клеточных мембран. Показано, что синтетический регулятор роста ТДЗ оказал положительное воздействие на молодые растения кукурузы на фоне действия пониженных и повышенных температур. Наиболее эффективные концентрации ТДЗ, максимально повышающие термоустойчивость проростков кукурузы, – 10^{-10} и 10^{-11} М. В последствии неблагоприятных температур параметры роста и проницаемость мембран листьев кукурузы, выращенной из обработанных тидиазуроном семян, проявляли тенденцию к восстановлению до уровня нестрессированных растений.

К л ю ч е в ы е с л о в а : *Zea mays*, пониженные температуры, высокие температуры, рост, проницаемость мембран, регуляторы роста, тидиазурон.

A. S. Lukatkin, N. N. Kashtanova. EFFECT OF THIDIAZURON ON THE THERMAL RESISTANCE OF MAIZE SEEDLINGS

Maize seeds treated with thidiazuron (TDZ) at concentrations ranging from 10^{-8} to 10^{-11} M were germinated at room temperature until the age of 7 days. The seedlings were then kept for 20 h at 43°C or 3°C (control seedlings at 25°C) followed by a roll-growing culture until 14 days of age, after which the growth parameters and the condition of the cell membranes were studied. It is shown that the synthetic growth regulator TDZ has had a positive impact on young maize plants affected by chilling and heating. The TDZ concentrations most effective in maximizing the thermal resistance of maize seedlings were 10^{-10} and 10^{-11} M. In the aftereffect of extreme temperatures the growth parameters and membrane permeability in the leaves of maize plants pre-treated with thidiazuron tended to recover to the level of non-stressed plants.

К e y w o r d s : *Zea mays*, chilling, high temperatures, growth, membrane permeability, plant growth regulators, thidiazuron.

Введение

В настоящее время растения подвергаются нарастающему воздействию абиотических и антропогенных неблагоприятных факторов среды, таких как засуха, низкая и высокая температура, засоление, высокие концентрации тяжелых металлов (ТМ) и ксенобиотиков. Од-

ним из ведущих экологических факторов является температура, определяющая саму возможность существования растений в определенном местообитании. Температурные сдвиги вызывают изменения структуры биополимеров, метаболических процессов в растительной клетке, при высокой напряженности могут приводить к повреждениям и гибели растений

[Усманов и др., 2001]. Повреждения растений могут индуцировать как пониженные, так и повышенные температуры [Титов, Таланова, 2011]. Теплолюбивые растения (в том числе кукуруза) проявляют симптомы повреждения при пониженных положительных температурах (выше 0 °С, но ниже 10 °С) [Лукаткин, 2002]. Тепловой стресс возникает в растениях при помещении в условия повышенной температуры [Титов, Таланова, 2011]. Известно, что основные ответные реакции растений на воздействие неблагоприятных абиотических факторов связаны со сверхпродукцией активированных форм кислорода (АФК) и возникновением окислительного стресса, впоследствии приводящего к нарушениям структуры и функционирования клеточных мембран [Лукаткин, 2002].

Для снижения повреждающего действия неблагоприятных температур используют различные приемы, среди которых особое место занимают синтетические и природные регуляторы роста (РР) [Прусакова и др., 2005; Титов, Таланова, 2009; Колмыкова, Лукаткин, 2012; Будыкина и др., 2012]. Наряду с регуляторным действием на физиолого-биохимические процессы в растительных клетках, многие РР способствуют повышению устойчивости растений к абиотическим и биотическим стрессорам [Титов и др., 2011].

В последние годы интенсивно изучаются новые синтетические препараты с цитокининовой активностью – тидиазурон, цитодеф, хлорсульфурон и другие [Лукаткин и др., 2003а, 2003б; Шаповалов, Зубкова, 2003; Прусакова и др., 2005; Лукаткин, Зауралов, 2009; Лукаткин, Старкина, 2011]. Их преимуществом является низкая концентрация, в которой они оказывают специфическое действие, и высокая эффективность по сравнению с природными цитокининами. В лабораторных опытах выявлено стимулирующее действие цитокининовых препаратов на прорастание семян огурца и кукурузы при температурах 10–14 °С, причем эффективность проявлялась в широком диапазоне концентраций: тидиазурона – 10^{-6} – 10^{-11} М, хлорсульфурона – 10^{-9} – 10^{-10} М, цитодефа – 10^{-7} – 10^{-9} М, кинетина – 10^{-7} – 10^{-8} М [Лукаткин и др., 2003б; Колмыкова и др., 2005; Лукаткин, Овчинникова, 2009].

Несмотря на проведенные ранее исследования антистрессового действия синтетического цитокинина тидиазурона, до сих пор нет четкого представления о механизмах этих эффектов, а также об оптимальных концентрациях ТДЗ, используемых для обработки разных видов растений на фоне различных стрессирующих факторов. В связи с этим целью работы было изучение действия препарата тидиазурон на термо-

устойчивость молодых растений кукурузы, оцениваемую по параметрам роста (прироста) и состояния клеточных мембран.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи: 1) изучить эффект различных концентраций ТДЗ на ранних этапах развития кукурузы; 2) выявить наиболее эффективные концентрации ТДЗ и их действие на рост и состояние клеточных мембран растений кукурузы при различных температурных воздействиях; 3) оценить эффективность ТДЗ в последствии неблагоприятных температур (по параметрам роста и проницаемости мембран).

Материалы и методы

Объектом для работы служили семена и молодые растения кукурузы (*Zea mays* L.) гибрида Коллективный 172 МВ. В качестве экспериментального материала для работы использовали тидиазурон [N-фенил-(1,3,5-тиазол-5-ил)мочевина] (ДРОПП) – препарат фирмы «Шеринг» (Германия), используемый в качестве дефолианта [Дропп..., 1985], но в низких концентрациях обладающий цитокининовой активностью [Murthy et al., 1998].

В первой серии опытов семена замачивали 10 часов в растворах ТДЗ концентраций от 10^{-8} до 10^{-11} М (контроль – в дистиллированной воде), затем промывали и проращивали при температуре около 25 °С в растительных на дистиллированной воде до возраста 7 суток. На третий день определяли энергию прорастания, на 7-й день – всхожесть семян и измеряли ростовые характеристики (длину корня и побега). Далее семидневные проростки кукурузы пересаживали в модифицированную среду Кнопа. Часть растений оставляли в нормальных условиях (температура 25 °С), а остальные помещали на 20 часов в термостат (температура 43 °С) или холодильную камеру (температура 3 °С), после чего возвращали в нормальные условия, выращивая еще 6 дней методом рулонной культуры [Журбицкий, Ильин, 1968]. На 14-й день от начала опыта измеряли ростовые характеристики (длину корня и побега), количество листьев на растении, визуально определяли % поврежденной листовой поверхности и выявляли концентрации ТДЗ, наиболее эффективные на фоне оптимальных и неблагоприятных температур.

Во второй серии опытов на основании концентраций, оказавших лучшее действие в первой серии (на прорастание семян, рост осевых органов и повреждение листьев), проверяли эффективность ТДЗ при действии и последствии неблагоприятных температур на проростки кукурузы. Схема опыта – такая же, как и в первой серии.

Семена кукурузы обрабатывали выбранными концентрациями ТДЗ, проращивали до возраста 7 суток, делили на три группы и помещали в те же температурные режимы, что и в первой серии опытов. Сразу после окончания температурного воздействия (охлаждения при 3 °С или нагрева при 43 °С) определяли состояние клеточных мембран по выходу электролитов из высечек листьев в дистиллированную воду на кондуктометре ОК-102 («Radekis», Венгрия) с платиновым электродом при частоте 3 кГц [Зауралов, Лукаткин, 1985]. Далее растения выращивали методом рулонной культуры и определяли последствие температурного стресса по выходу электролитов.

Определение проницаемости мембран проводили по изменению электропроводности вытяжки после 4-часовой экспозиции. Полный выход электролитов определяли по электропроводности вытяжки после разрушения мембран кипячением (методика детально описана в работе [Гришенкова, Лукаткин, 2005]). Результирующий выход электролитов рассчитывали в % от полного выхода:

$$L = (L1 - Lw) / (L2 - Lw) \cdot 100 \%,$$

где L – выход электролитов, в процентах от полного выхода электролитов; L1 и L2 – электропроводность после настаивания высечек листьев и кипячения, в мкСм; Lw – электропроводность дистиллированной воды, мкСм.

Термоустойчивость оценивали по степени повреждения клеточных мембран после воздействия неблагоприятными температурами. Степень повреждения в различных вариантах оценивали по «коэффициенту повреждаемости» (КП), рассчитываемому по формуле:

$$КП = (LD - L0) / (100 - L0) \cdot 100 \%,$$

где LD – выход электролитов из ткани, подвергнутой стрессу, в процентах от полного выхода электролитов; L0 – выход электролитов из ткани контрольных растений, в процентах от полного выхода электролитов. Чем больше величина КП, тем меньше устойчивость растительного объекта [Зауралов, Лукаткин, 1985].

Все опыты в каждой серии повторяли три раза, они включали не менее трех повторностей (растилен каждого варианта или сосудов с рулонными культурами). В каждом опыте измерения роста проводили на 10–12 растениях каждого варианта, определение выхода электролитов – в шести усредненных пробах, составленных из высечек листьев из 5–7 растений каждого варианта. Результаты обрабатывали статистически по стандартным методикам с использованием компьютерной программы BIOSTAT. В таблицах и на графиках представлены средние арифметические из всех повторностей с их стандартными ошибками.

Сравнение различных вариантов опыта проводили по t-критерию Стьюдента при 5-процентном уровне значимости [Лакин, 1980].

Результаты и обсуждение

Тидиазурон – синтетический дефолиант, в низких концентрациях проявляющий цитокининовую активность. Концентрации ТДЗ, применяемые разными авторами, в сильной степени варьируют (как для разных видов растений, так и для стрессирующих воздействий) [Лукаткин и др., 2003а; 2003б; Лукаткин, Старкина, 2011]. Поэтому на первом этапе работы по изучению влияния ТДЗ на молодые растения кукурузы необходимо выявить концентрации ТДЗ, оказывающие лучшее действие.

Определение энергии прорастания и всхожести семян кукурузы при использовании препарата ТДЗ показало, что не во всех концентрациях регулятора прорастание семян кукурузы шло быстрее (табл. 1). Оптимальными для прорастания семян оказались концентрации 10^{-9} и 10^{-11} М, где наблюдалась тенденция к повышению энергии прорастания семян относительно контроля, и 10^{-8} М, где выявлена тенденция к повышению всхожести. Следует отметить, что как по прорастанию семян, так и по ростовым характеристикам (длине корня и побега) достоверного увеличения относительно водного контроля ни при одной концентрации не выявлено.

Таблица 1. Влияние тидиазурона на прорастание семян кукурузы и длину осевых органов 7-дневных проростков

Концентрация, М	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %	Длина, мм	
			корень	побег
0 (H ₂ O)	76 ± 3,7	84 ± 3,5	102 ± 4,5	46 ± 1,9
10 ⁻⁸	77 ± 4,2	90 ± 3,1	88 ± 4,7	40 ± 2,9
10 ⁻⁹	83 ± 4,1	87 ± 5,2	97 ± 4,1	43 ± 1,8
10 ⁻¹⁰	73 ± 7,1	83 ± 4,4	98 ± 5,5	43 ± 2,4
10 ⁻¹¹	83 ± 5,2	85 ± 5,0	101 ± 5,2	45 ± 2,2

В последующем растения, обработанные различными концентрациями ТДЗ, выращивали методом рулонной культуры при температуре 25 °С, близкой к оптимальной (табл. 2). Наиболее эффективным препарат оказался в концентрации 10^{-10} М: здесь наблюдалась тенденция к увеличению длины корня и количества листьев по сравнению с контролем. Но положительного действия этого регулятора роста на длину побега не выявлено, лишь при концентрации 10^{-11} М показана тенденция к небольшой стимуляции роста. Таким образом, в нормальных температурных условиях не выражена рост-стимулирующая активность препарата ТДЗ.

Таблица 2. Параметры роста и повреждения 14-дневных растений кукурузы, выращенных в рулонной культуре из обработанных тидиазуроном семян и подвергнутых 20-часовому воздействию неблагоприятных температур

Концентрация, М	Длина, мм		Количество листьев, шт./раст.	% повреждения листовой поверхности
	корень	побег		
Температура 25 °С				
0	169 ± 9,4	208 ± 19,1	2,7 ± 0,1	–
10 ⁻⁸	133 ± 10,5	169 ± 13,2	2,8 ± 0,1	–
10 ⁻⁹	161 ± 15,9	189 ± 14,0	2,5 ± 0,2	–
10 ⁻¹⁰	195 ± 14,2	209 ± 16,2	3,0 ± 0,2	–
10 ⁻¹¹	164 ± 13,8	212 ± 12,4	2,6 ± 0,2	–
Температура 43 °С				
0	146 ± 15,6	171 ± 13,7	2,6 ± 0,2	33,8 ± 5,0
10 ⁻⁸	129 ± 16,3	146 ± 13,6	2,4 ± 0,2	30,0 ± 1,0,8
10 ⁻⁹	162 ± 18,7	188 ± 18,1	2,9 ± 0,3	34,3 ± 5,4
10 ⁻¹⁰	211 ± 15,0	200 ± 15,3	2,7 ± 0,2	13,3 ± 6,2
10 ⁻¹¹	162 ± 16,6	199 ± 16,7	3,0 ± 0,2	24,2 ± 4,6
Температура 3 °С				
0	131 ± 16,5	175 ± 6,5	2,6 ± 0,1	22,4 ± 4,6
10 ⁻⁸	121 ± 11,3	152 ± 7,8	2,6 ± 0,2	25,0 ± 6,1
10 ⁻⁹	129 ± 17,0	145 ± 12,5	2,6 ± 0,2	15,7 ± 5,2
10 ⁻¹⁰	156 ± 17,7	196 ± 9,3	2,9 ± 0,1	11,3 ± 3,2
10 ⁻¹¹	149 ± 12,8	152 ± 11,0	2,5 ± 0,3	17,3 ± 5,3

Вторую группу растений в рулонной культуре выдерживали 20 ч в термостате при температуре 43 °С, после чего выращивали в тех же условиях, что и предыдущую партию. При кратковременном воздействии высоких температур на молодые растения кукурузы выявлена тенденция к торможению роста, а также наблюдалось визуальное повреждение листьев (подсыхание краев и кончиков листовой пластинки). Тидиазурон оказал достоверное стимулирующее действие на длину корня в концентрации 10⁻¹⁰ М и показал тенденцию к усилению роста побега (в концентрациях 10⁻¹⁰ и 10⁻¹¹ М) и повышению количества листьев (в концентрациях 10⁻⁹ и 10⁻¹¹ М). Самый низкий процент подсыхания листьев наблюдали у растений, обработанных ТДЗ в концентрации 10⁻¹⁰ М. В остальных концентрационных вариантах обработки растений ТДЗ повреждение листьев гипертермией не отличалось от контроля.

В третьей группе растений (которые были выдержаны 20 ч в холодильной камере при пониженной температуре 3 °С) выявлено снижение роста и корней, и побегов относительно температуры 25 °С, а также визуальное повреждение листовой поверхности. При обработке ТДЗ в концентрации 10⁻¹⁰ М показана тенденция к превышению роста осевых органов и образования листьев по отношению к водному контролю. Степень повреждения листовой поверхности в результате холодовой экспозиции проростков кукурузы была довольно высокой как в контроле, так и при действии ТДЗ, и лишь кон-

центрация 10⁻¹⁰ М ТДЗ достоверно снижала повреждение: процент подсыхания оказался существенно ниже, чем в контроле.

Таким образом, оценка эффективности ТДЗ на фоне кратковременного действия пониженных и повышенных температур позволила сделать заключение о слабом положительном влиянии на рост и степень повреждения листовой поверхности растений ТДЗ в дозе 10⁻¹⁰ М.

Далее выясняли влияние неблагоприятных температур и ТДЗ на состояние клеточных мембран (по выходу электролитов). Были взяты три концентрации препарата, показавшие лучшие результаты по влиянию на прорастание семян, рост осевых органов и повреждение листьев при действии стрессовых температур. 7-дневные растения помещали в те же температурные режимы, что и в первой серии опытов. Сразу после окончания температурного воздействия (охлаждения при 3 °С или прогрева при 43 °С) измеряли выход электролитов. Далее растения выращивали методом рулонной культуры до возраста 14 суток и определяли последствие температурного стресса по выходу электролитов. Данные представлены в табл. 3.

При комнатной температуре проницаемость мембран в результате обработки ТДЗ практически не менялась относительно водного контроля. Сразу по окончании воздействия неблагоприятных температур в водном контроле отмечено значительное повышение проницаемости клеточных мембран, выражающее их повреждение температурным стрессом. Предварительная обработка ТДЗ снижала температурно-индуцированный выход ионов из клеток, особенно в концентрации 10⁻¹¹ М. Наиболее выражено стабилизирующее действие ТДЗ после обработки растений высокими температурами.

Определение проницаемости мембран в последствии температурного стресса может дать представление о скорости процессов репарации повреждений клеток, вызванных неблагоприятными температурами [Зауралов, Лукаткин, 1985; Гришенкова, Лукаткин, 2005]. Показано (табл. 3), что в большинстве вариантов опыта спустя 7 дней после температурного стресса происходило снижение неспецифической проницаемости мембран по сравнению с параметрами, наблюдавшимися сразу после охлаждения. При этом наиболее эффективным оказался вариант с обработкой семян 10⁻¹¹ М тидиазуроном. Интересно отметить, что в последствии пониженных температур эффективность ТДЗ на состояние клеточных мембран кукурузы проявлялась лучше, чем после высоких температур.

Таблица 3. Влияние тидиазурона на выход электролитов из листовой ткани кукурузы после температурного воздействия

Концентрация, М	Выход электролитов, % от полного выхода		
	Температура 25 °С	Температура 43 °С, 20 ч	Температура 3 °С, 20 ч
Сразу после температурного воздействия			
0 (вода)	4,69 ± 0,21	7,50 ± 0,17	6,58 ± 0,16
10 ⁻⁹	4,15 ± 0,48	6,52 ± 0,09	5,93 ± 0,23
10 ⁻¹⁰	4,72 ± 0,39	6,10 ± 0,28	6,17 ± 0,21
10 ⁻¹¹	3,75 ± 0,49	4,08 ± 0,07	5,49 ± 0,11
Спустя 7 суток после температурного воздействия			
0 (вода)	4,71 ± 0,27	6,28 ± 0,18	5,72 ± 0,23
10 ⁻⁹	4,26 ± 0,27	5,54 ± 0,09	4,14 ± 2,23
10 ⁻¹⁰	4,53 ± 0,44	5,32 ± 0,28	5,03 ± 1,21
10 ⁻¹¹	4,14 ± 0,29	4,15 ± 0,18	3,76 ± 1,94

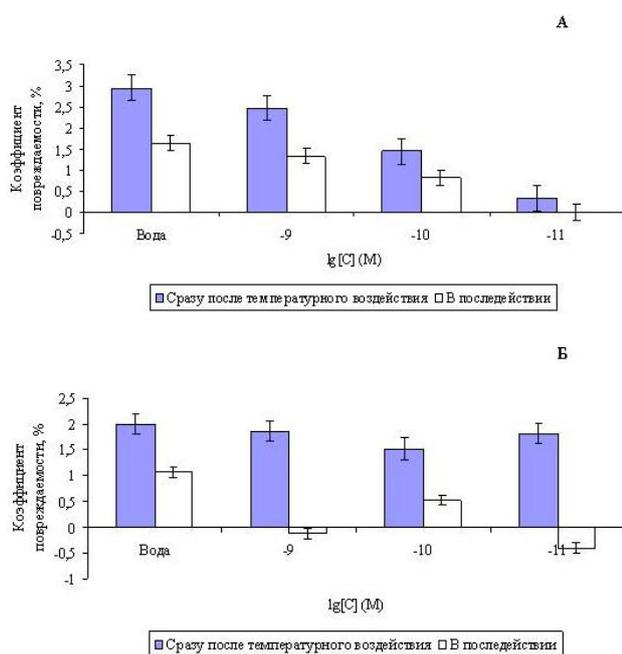


Рис. Коэффициент повреждаемости клеток листьев кукурузы, обработанной разными концентрациями тидиазурона, после воздействия температуры 43 °С (А) или 3 °С (Б)

Количественная оценка повреждающих эффектов температуры на состояние клеточных мембран может быть дана на основе «коэффициента повреждаемости» (КП), который показывает выход ионов, индуцированный только неблагоприятным температурным воздействием [Зауралов, Лукаткин, 1985]. В наших опытах с прогревом растений при температуре 43 °С было показано (рис.: А), что растения, выращенные из семян, обработанных тидиазуоном, показали прогрессирующее (с уменьшением концентрации ТДЗ) снижение величины КП сразу после прогрева относительно водного контроля, особенно выраженное в самой малой концентрации – 10⁻¹¹ М. В последствии прогрева величина КП во

всех вариантах опыта существенно снизилась, а в варианте с обработкой ТДЗ в концентрации 10⁻¹¹ М была почти нулевой. Определение КП сразу после окончания действия пониженной температуры (3 °С) показало (рис.: Б), что в вариантах со всеми концентрациями тидиазурона величина КП практически не отличалась от степени повреждения в воде. Однако в последствии охлаждения величина КП у обработанных ТДЗ проростков кукурузы значительно снизилась и минимальной (ниже 0) оказалась в варианте с обработкой ТДЗ в концентрации 10⁻¹¹ М.

Таким образом, на основании анализа действия и последствия температурных стрессоров на клеточные мембраны можно видеть протекторный эффект ТДЗ, наиболее значительный – в нанодозе 10⁻¹¹ М.

Для понимания возможных механизмов мембранопротекторного действия ТДЗ необходимо рассмотреть антиоксидантный потенциал этого препарата. Ранее было показано [Лукаткин и др., 2002], что обработка семян и проростков огурца тидиазуоном в очень низких концентрациях приводила к существенному снижению индуцированных низкотемпературным стрессом и тяжелыми металлами генерации активированных форм кислорода (в частности, супероксидного анион-радикала) и интенсивности перекисного окисления липидов. Предполагается, что исследованный регулятор роста обладает существенным антиоксидантным действием, которое наиболее сильно проявляется при попадании растений в стрессовые условия. Очевидно, что выявленное нами у обработанных ТДЗ проростков снижение индуцированного температурой повышения проницаемости мембран в растениях кукурузы, подвергнутых температурному стрессу, может быть связано с противодействием окислительному стрессу.

Заключение

Регулирование роста и развития растений с помощью физиологически активных веществ позволяет оказывать направленное влияние на отдельные этапы онтогенеза с целью мобилизации генетических возможностей растительного организма и в конечном итоге повышать стрессоустойчивость, продуктивность и качество урожая сельскохозяйственных культур. В последние годы уделяется большое внимание разработке и применению РР нового поколения, обладающих широким спектром физиологической активности. В данной работе представлены исследования

по влиянию на растения кукурузы РР наномолярных концентраций тидиазурана при действии повышенных и пониженных температур на ранних этапах развития.

В проведенном исследовании обнаружено, что тидиазурон оказал положительное воздействие на молодые растения кукурузы на фоне пониженных и повышенных температур; это выявлено по росту осевых органов и проницаемости клеточных мембран после температурного стресса. Наиболее эффективные концентрации ТДЗ, максимально повышающие термоустойчивость проростков кукурузы, – 10^{-10} М (по росту и степени повреждения листовой поверхности растений) и 10^{-11} М (по протекторному действию на клеточные мембраны).

Использование тидиазурана в целях повышения термоустойчивости растительных организмов может быть перспективным на территориях с высокой вероятностью попадания растений на ранних этапах развития в условия стрессовых температур (как пониженных, так и повышенных).

Литература

- Будыкина Н. П., Шиббаева Т. Г., Титов А. Ф. Влияние эпина экстра – синтетического аналога 24-эпибрассинолида на стрессоустойчивость и продуктивность растений огурца (*Cucumis sativus* L.) // Труды КарНЦ РАН. 2012. № 2. С. 47–55.
- Гришенкова Н. Н., Лукаткин А. С. Определение устойчивости растительных тканей к абиотическим стрессам с использованием кондуктометрического метода // Поволжский экологический журнал. 2005. № 1. С. 3–11.
- Дропп – дефолиант мягкого действия для хлопчатника. Проспект фирмы «Schering». 1985. 3 с.
- Журбицкий З. И., Ильин М. В. Теория и практика вегетационного метода. М.: Наука, 1968. 224 с.
- Зауралов О. А., Лукаткин А. С. Кинетика экзоосмоса электролитов у теплолюбивых растений при действии пониженных температур // Физиология растений. 1985. Т. 32. Вып. 2. С. 347–354.
- Колмыкова Т. С., Лукаткин А. С. Эффективность регуляторов роста растений при действии абиотических стрессовых факторов // Агрехимия. 2012. № 1. С. 83–94.
- Колмыкова Т. С., Зауралов О. А., Лукаткин А. С. Действие регуляторов роста на продуктивность и качество урожая сельскохозяйственных культур // Роль почв в сохранении устойчивости ландшафтов и ресурсосберегающее земледелие: мат-лы Международ. научн.-практ. конф. Пенза, 2005. С. 46–47.
- Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1980. 293 с.
- Лукаткин А. С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. Саранск: Изд-во Мордовск. ун-та, 2002. 208 с.
- Лукаткин А. С., Зауралов О. А. Экзогенные регуляторы роста как средство повышения холодоустойчивости теплолюбивых растений // Доклады Россельхозакадемии. 2009, № 6. С. 20–22.
- Лукаткин А. С., Овчинникова О. В. Влияние препарата цитодеф на рост и холодоустойчивость теплолюбивых растений // Агрехимия, 2009. № 12. С. 32–38.
- Лукаткин А. С., Старкина М. И. Влияние тидиазурана на устойчивость проростков огурца к стрессовым факторам // Агрехимия. 2011. № 10. С. 31–38.
- Лукаткин А. С., Кипайкина Н. В., Башмаков Д. И., Рудаков Д. В. Применение синтетических регуляторов роста в качестве антиоксидантов при воздействии абиотических стрессоров на растения // VI Междунар. конф. «Биоантиоксидант» (Москва, 16–19 апреля 2002 г.): тез. докл. М., 2002. С. 355–357.
- Лукаткин А. С., Башмаков Д. И., Кипайкина Н. В. Протекторная роль обработки тидиазураном проростков огурца при действии тяжелых металлов и охлаждения // Физиология растений. 2003а. Т. 50. С. 346–348.
- Лукаткин А. С., Жамгарян Ю. А., Пугаев С. В. Влияние тидиазурана на продуктивность, холодоустойчивость и качество плодов огурца // Агрехимия. 2003б. № 7. С. 52–59.
- Прусакова Л. Д., Малеванная Н. Н., Белопухов С. Л., Вакулenco В. В. Регуляторы роста растений с антистрессовыми и иммунопротекторными свойствами // Агрехимия. 2005. № 11. С. 76–86.
- Титов А. Ф., Таланова В. В. Устойчивость растений и фитогормоны. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2009. 206 с.
- Титов А. Ф., Таланова В. В. Локальное действие высоких и низких температур на растения. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2011. 166 с.
- Титов А. Ф., Фролова С. А., Таланова В. В., Венжик Ю. В. Влияние фитогормонов на активность протеолитических ферментов и ингибиторов трипсина при холодовой адаптации пшеницы // Труды КарНЦ РАН. 2011. № 3. С. 117–120.
- Усманов Н. Ю., Рахманкулова З. Ф., Кулагин А. Ю. Экологическая физиология растений. М.: Логос, 2001. 224 с.
- Шаповалов А. А., Зубкова Н. Ф. Отечественные регуляторы роста растений // Агрехимия. 2003. № 11. С. 33–47.
- Murthy B. N. S., Murch S. J., Saxena P. K. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis // In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant. 1998. Vol. 34, N 3. P. 267–275.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Лукаткин Александр Степанович

д. б. н., проф., зав. кафедрой ботаники
и физиологии растений
ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный
университет им. Н. П. Огарева»
ул. Большевистская, 68, Саранск,
Республика Мордовия, Россия, 430005
эл. почта: aslukatkin@yandex.ru
тел.: (8342) 322507

Каштанова Наталья Николаевна

соискатель
ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный
университет им. Н. П. Огарева»
ул. Большевистская, 68, Саранск,
Республика Мордовия, Россия, 430005
эл. почта: resmol@yandex.ru
тел.: (8342) 322507

Lukatkin, Alexandr

Mordovia State University
68 Bolshevistskaya St., 430005 Saransk,
Mordovia, Russia,
e-mail: aslukatkin@yandex.ru
tel.: (8342) 322507

Kashtanova, Natalia

Mordovia State University
68 Bolshevistskaya St., 430005 Saransk,
Mordovia, Russia,
e-mail: resmol@yandex.ru
tel.: (8342) 322507

УДК 591.473:577.151:597.2/.5 (470.2)

МЕЖВИДОВЫЕ, ВОЗРАСТНЫЕ И ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ В АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМ С-ОКСИДАЗЫ БЕЛЫХ МЫШЦ РЫБ ИЗ ВОДОЕМОВ СЕВЕРО-ЗАПАДА РОССИИ

О. В. Мещерякова, М. В. Чурова, Н. Н. Немова

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Исследована активность фермента дыхательной цепи митохондрий, индикатора уровня аэробного метаболизма – цитохром с-оксидазы (ЦО) в белых мышцах у различных видов пресноводных и морских рыб, обитающих в водоемах Республики Карелия и Мурманской области. Отмечена широкая межвидовая вариабельность активности фермента. Наиболее высокая активность ЦО характерна для морских (беломорской сельди и камбалы) и проходных (атлантического лосося и кумжи) видов рыб. Наблюдается также относительное сходство в активности фермента у близкородственных видов – атлантического лосося и кумжи (сем. Лососевые), у окуня и судака (сем. Окуневые), а также у леща и плотвы (сем. Карповые). Установлена одинаковая тенденция возрастных изменений в активности фермента для всех изученных видов: максимальные значения показателя наблюдаются в возрасте 0+, 1+, 2+, с возрастом активность фермента постепенно снижается. У некоторых видов рыб (беломорская сельдь, кумжа, ряпушка, плотва) в возрасте, соответствующем половому созреванию, наблюдались достоверные половые различия в активности цитохромоксидазы, при этом активность фермента у самок была выше, чем у самцов.

К л ю ч е в ы е с л о в а : цитохром с-оксидаза, активность, рыбы, межвидовые различия, возрастные особенности, половые различия.

O. V. Meshcheryakova, M. V. Churova, N. N. Nemova. SPECIES-, AGING- AND SEX-RELATED DIFFERENCES IN CYTOCHROME C OXIDASE ACTIVITY IN WHITE MUSCLES OF SOME FISH IN NORTHWEST RUSSIA

The activity of cytochrome *c* oxidase (EC 1.9.3.1) in white skeletal muscles of some fish species from Northwest Russia was studied. The activity ranged widely among species. The highest level of activity was found in the White Sea herring *Clupea pallasii marisalbi* and Arctic flounder *Liopsetta glacialis*, and in the muscles of anadromous fish – Atlantic salmon *Salmo salar* and brown trout *Salmo trutta*. Some related species such as *Salmo salar* and *Salmo trutta* (*Salmonidae*), perch *Perca fluviatilis* and European pike-perch *Stizostedion lucioperca* (*Percidae*), roach *Rutilus rutilus* and bream *Abramis brama* (*Cyprinidae*) had similar levels of cytochrome *c* oxidase activity. Age-related changes in the enzyme activity were identical in all the species independent of the taxonomy. The activity was the highest in 0+, 1+ and 2+ fish, decreasing thereafter. Sex-related differences in cytochrome *c* oxidase activity were observed at the age of maturation in the White Sea herring, brown trout, roach, and vendace. The enzyme activity in the muscles was higher in females than in males.

Key words : cytochrome *c* oxidase, activity, fish, aging- and sex-related differences.

Введение

Важнейшим аспектом, определяющим нормальное функционирование организма, темпы роста, а также способность адаптироваться к постоянно изменяющимся условиям окружающей среды, является уровень энергетического обмена. Главным процессом образования энергии в клетках большинства органов высших животных является аэробный синтез АТФ (тканевое дыхание), протекающий в митохондриях. Аэробный синтез АТФ в энергетическом плане является очень эффективным и позволяет использовать различные субстраты (глюкозу-6-фосфат, жирные кислоты, кетоновые тела, молочную кислоту и некоторые аминокислоты) для образования энергии, что имеет большое значение, например, при несбалансированном питании и в условиях адаптации к различным факторам среды. Аэробный метаболизм свойствен клеткам большинства тканей и органов высших животных и обуславливает активный рост и развитие организма рыб, особенно в период раннего онтогенеза [Озернюк, 2000; Новиков, 2000], когда требуются большие энергетические затраты на синтез структурных соединений.

Индикатором уровня аэробного метаболизма является активность фермента цитохром *c*-оксидазы – важнейшего компонента дыхательной цепи митохондрий (комплекс IV) (ЦО, КФ 1.9.3.1.). Цитохромоксидаза катализирует конечный этап переноса электронов с цитохрома *c* на кислород в процессе окислительного фосфорилирования. Фермент представляет собой димер с молекулярной массой 200 кДа, прочно ассоциированный с молекулами фосфолипидов мембран. У млекопитающих и рыб фермент состоит из 13 субъединиц: 3 основных каталитических, кодируемых митохондриальным геномом, и 10 минорных, которые кодируются ядерным геномом [Kadenbach, Arnold, 1999; Duggan et al., 2011]. Субъединицы, кодируемые митохондриальным геномом, непосредственно принимают участие в катализе. С субъединицей COX1 связаны гем *a* и двухъядерный центр гем *a*3-CuВ. Субъединица COX2 включает CuA-центр и участвует в связывании цитохрома *c*. Субъединица COX3, вероятно, участвует в протонной проводимости ЦО. Остальные субъединицы цитохром *c*-оксидазы кодируются в ядерном геноме и синтезируются в цитоплазме. Функции этих полипептидов связаны с регуляцией активности фермента, а также определяют его тканевую специфичность [Carr, Winge, 2003]. Некоторые ядерные

субъединицы имеют изоформы, причем у разных классов животных изоферментный состав может различаться [Kadenbach et al., 2000; Little, 2010].

Активность цитохром *c*-оксидазы используется как показатель уровня аэробного метаболизма в тканях и органах рыб, что имеет значение для оценки их состояния, физической активности, процессов роста и изучения адаптационного потенциала. Цель работы состояла в исследовании уровня активности цитохромоксидазы у различных видов рыб, выявлении межвидовых особенностей, характера возрастных изменений и половых различий.

Материалы и методы

Материал для исследования собирали в летний сезон в течение трех лет. Беломорскую сельдь *Clupea pallasii marisalbi* и полярную камбалу *Liopsetta glacialis* отлавливали в Белом море в районе п-ова Картеш. Атлантического лосося *Salmo Salar* (морскую форму) – в реках бассейна Белого моря (Кольский п-ов, Мурманская обл.). Сига *Coregonus lavaretus* отлавливали в оз. Сямозеро. Остальные виды пресноводных рыб – кумжу (форель, *Salmo trutta*), ряпушку *Coregonus albula*, щуку *Esox lucius*, плотву *Rutilus rutilus*, леща *Abramis brama*, окуня *Perca fluviatilis*, судака *Stizostedion lucioperca*, колюшку трехиглую *Gasterosteus aculeatus* собирали в бассейне Онежского озера. Возраст рыб определяли стандартными ихтиологическими методами [Чугунова, 1959].

Активность цитохром *c*-оксидазы определяли в белых мышцах рыб по методике Smith [Smith, 1955]. Ткань гомогенизировали в 0,01 М трис-HCl буфере с pH = 7,4, с добавлением 0,1% неионогенный детергент тритон X-100 в соотношении 1:10. Полученный гомогенат центрифугировали при 9000 г в течение 5 мин при 4 °С. Цитохром *c* получали путем добавления 30 мг аскорбиновой кислоты к 15 мг окисленного цитохрома *c* и растворением этой смеси в 1 мл 0,1 М фосфатного буфера с выдерживанием 2 часа в темноте. Полученный восстановленный цитохром *c* очищали от избытка аскорбиновой кислоты на колонке, заполненной сефадексом G-25, диаметром 1,5 см и высотой 40 см, в 0,02 М фосфатном буфере. На спектрофотометре СФ-2000 измеряли увеличение количества окисленного цитохрома *c* при 550 нм.

Исследования выполнены с использованием приборной базы Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН.

Результаты и обсуждение

Межвидовые различия в активности цитохромоксидазы. По уровню аэробного энергетического обмена рыбы занимают промежуточное положение между факультативными анаэробами – беспозвоночными и типичными аэробами – высшими позвоночными животными [Сравнительная физиология животных, 1977]. Уровень окислительных процессов и активность цитохромной системы в их органах и тканях ниже, чем у теплокровных животных, а структурная организация молекулы фермента проще, чем у птиц и млекопитающих [Montecucco et al., 1987]. При этом внутри класса рыб существуют значительные межвидовые различия в уровне энергетического обмена, аэробного метаболизма и, соответственно, активности цитохромоксидазы, что обусловлено многими факторами [Dalziel et al., 2006; Bremer, Moyes, 2011]. Уровень окислительного метаболизма рыб определяется эволюционным положением вида, зависит от его размеров, двигательной активности и других особенностей биологии и экологии.

Известно, что более примитивные представители надкласса рыб – хрящевые рыбы (акулы и скаты) – имеют более низкий уровень аэробного обмена и активность цитохромоксидазы по сравнению с костными рыбами [Dalziel et al., 2006; Little et al., 2012]. В связи с ранним филогенетическим происхождением их метаболизм характеризуется высокой интенсивностью более древнего процесса образования энергии – анаэробного гликолиза, а энзиматический статус скелетных мышц этих видов рыб отличается высокой активностью ферментов анаэробного обмена и меньшей специализацией различных форм ферментов. Селективный отбор

среди костных рыб и увеличение их адаптивного потенциала сопровождались повышением уровня высокоэффективного окислительного метаболизма, увеличением активности ЦО, усложнением ее структуры – количества субъединиц или изоформ и механизмов ее регуляции [Little et al., 2010; Little et al., 2012]. При сравнении активности ЦО у исследованных нами видов рыб (табл. 1) сложно выделить характер влияния таксономического положения на этот параметр, так как все они относятся к одному классу – костных рыб. Кроме того, в литературе отсутствуют сравнительные сведения об активности фермента у представителей различных семейств пресноводных рыб Северо-Запада России. Наши результаты указывают на относительное сходство в активности фермента у близкородственных видов – атлантического лосося и кумжи (сем. Лососевые), у окуня и судака (сем. Окуневые), а также у леща и плотвы (сем. Карповые). Сходство в активности ферментов у близкородственных видов животных, в том числе и рыб, обусловлено структурным сходством молекул фермента, количеством субъединиц и их специфической ролью в обеспечении каталитических и аллостерических эффектов [Dalziel et al., 2006].

Наблюдаемые межвидовые различия в активности фермента могут быть обусловлены не только таксономической принадлежностью вида, но и их экологическими особенностями. Так, заметного сходства в активности фермента между представителями отряда Сиговые ряпушкой и сигом не установлено. Активность фермента у сига почти вдвое больше, чем у ряпушки (табл. 1). По-видимому, принадлежность этих видов к различным трофо-экологическим группам является более сильным фактором, определяющим уровень активности ЦО. Известно,

Таблица 1. Активность цитохром с-оксидазы в белых мышцах исследованных видов рыб разных возрастных групп, мкмоль/мин/мг белка

Виды рыб	Возраст					
	0+	1+	2+	3+	4+	5+
Морские виды						
Беломорская сельдь	16,26±0,151	17,90±0,14	15,13±0,21	11,90±0,08	10,56±0,09	-
Камбала	9,31±0,20	9,20±0,21	8,63±0,21	7,71±0,13	5,26±0,15	-
Проходные виды						
Атлантический лосось (морская форма)	9,60±0,10	10,51±0,10	9,21±0,19	8,33±0,12	-	-
Кумжа (пресноводная форма)	10,71±0,14	10,98±0,19	9,63±0,18	7,45±0,20	6,40±0,23	-
Пресноводные виды						
Щука	7,34±0,05	7,81±0,12	6,79±0,11	4,50±0,20	3,35±0,13	3,11±0,09
Сиг	8,25±0,11	8,52±0,12	7,96±0,09	5,13±0,15	4,21±0,13	3,51±0,12
Ряпушка	3,80±0,19	4,31±0,19	4,11±0,17	2,87±0,12	2,66±0,20	2,45±0,20
Окунь	7,78±0,11	6,76±0,09	6,93±0,11	4,89±0,16	4,56±0,15	3,75±0,25
Судак	8,14±0,10	7,06±0,10	5,08±0,13	4,81±0,22	3,93±0,10	3,26±0,09
Плотва	3,45±0,09	3,39±0,10	2,76±0,10	2,71±0,13	2,43±0,14	1,74±0,10
Лещ	3,18±0,11	3,72±0,12	3,43±0,12	2,25±0,09	2,31±0,09	2,05±0,15
Колюшка трехиглая	2,80±0,11	3,44±0,09	3,58±0,09	2,93±0,09	2,20±0,13	1,89±0,10

что трофический фактор играет большую роль в развитии специфических особенностей метаболизма. Хищные виды рыб характеризуются более высоким уровнем аэробного обмена, чем растительноядные, что обусловлено их более высокой физической активностью и составом пищи. Переваривание белковой пищи, характеризующейся высоким содержанием липидов, требует высокого уровня потребления кислорода [Шмидт-Ниельсен, 1982], что предопределяет более высокую активность ферментов аэробного обмена. Среди исследованных нами пресноводных видов рыб у хищных видов – щуки, сига, окуня и судака – наблюдается более высокая активность ЦО по сравнению с рыбами со смешанным типом питания или растительноядными – ряпушкой, плотвой, колюшкой.

Важнейшим фактором, определяющим активность ЦО у рыб, является интенсивность дыхания и уровень потребления кислорода. Соответственно, экологические факторы или особенности биологии рыб, которые так или иначе определяют уровень поглощения кислорода, будут оказывать влияние на активность фермента. Один из основных факторов, определяющих уровень потребления кислорода у рыб, – это температура окружающей среды. Известно, что холодолюбивые виды рыб имеют более высокий уровень аэробного обмена и активности соответствующих ферментов. Адаптация к холоду сопровождается увеличением потребления тканями кислорода, изменением структурно-функциональных свойств митохондрий и эффективности действия митохондриальных ферментов [Guderley, 2004; Somero, 2012; White et al., 2012]. Повышение эффективности работы цитохромоксидазы при компенсации температурных эффектов связано с изменением активности (концентрации) фермента. Более высокая концентрация и, соответственно, активность фермента компенсирует низкую скорость реакций метаболизма при низких температурах [Guderley, 2004; O'Brien, 2011; Somero, 2012]. Повышение активности ЦО при холодной акклимации показано для трески [Speers-Roesch, Ballantyne, 2005; Kraffe, 2007], карпа [Wodtke, 1981] и форели [Bouchard, Guderley, 2003].

Результаты наших исследований подтверждают сказанное. Наиболее высокая активность ЦО среди исследованных видов рыб отмечена у морских видов – обитателей высоких широт – беломорской сельди и камбалы, а также у холодолюбивых проходных видов – атлантического лосося и кумжи (табл. 1). Следует отметить, что одним из механизмов регуляции активности ЦО является изменение уровня экспрессии генов ее регуляторных и каталити-

ческих субъединиц [Lucassen et al., 2003; Guderley, 2004; O'Brien, 2011; Duggan et al., 2011]. В собственных исследованиях на кумже [Meshcheryakova et al., 2012] показано, что холодовая акклимация рыб сопровождается увеличением активности фермента и уровня экспрессии его субъединицы 4 (COX4), которая необходима для сборки фермента, имеет сайт связывания с АТФ и является аллостерическим центром регуляции его активности [Arnold, Kadenbac, 1997].

Сравнительно высокая активность ЦО у исследованных морских рыб (табл. 1) может быть также связана с адаптацией их метаболизма к солёности среды. Известно, что приспособление к обитанию в солёной воде характеризуются повышенными энергетическими затратами для обеспечения регуляции и интенсификации ионного транспорта у рыб. У морских рыб, а также рыб, акклимированных к высокому уровню солёности, наблюдается более высокий уровень потребления кислорода и аэробного энергетического обмена по сравнению с пресноводными рыбами [Yung-Che Tseng, Pung-Pung Hwang, 2008]. При изучении европейского угря *Anguilla anguilla* и сибаса *Dicentrarchus labrax* установлено также, что повышение активности ЦО при адаптации к солёности сопровождается изменением уровня экспрессии генов ее каталитических субъединиц 1 и 3, а также упомянутой выше 4-й субъединицы.

Еще одним важным фактором, определяющим видовую специфику энергетического обмена, и в том числе активность цитохромоксидазы, является уровень двигательной активности вида. Более высокая физическая активность и скорость плавания требуют больших затрат энергии, что определяет высокий уровень всего энергетического метаболизма вида и его аэробной составляющей. Так, например, показано, что скелетные мышцы пелагических видов – морского окуня *Paralabrax clathratus* и пресноводной радужной форели *Salmo gairdneri* – обладают в 2–4 раза большей активностью ферментов энергетического обмена по сравнению с бентосным малоактивным видом рыб – камбалой *Microstomus pacificus* [Sullivan, Somero, 1980]. Режим плавания также оказывает влияние на активность ферментов аэробного синтеза АТФ: на примере колюшки *Gasterosteus aculeatus* и трески *Gadus morhua* продемонстрировано возрастание активности ЦО при увеличении объемов нагрузки [Guderley, 2004]. Согласно нашим результатам, активность цитохром с-оксидазы у нектонного вида – беломорской сельди – в 1,5–2 раза выше, чем у бентосного вида – камбалы (табл. 1). Среди изученных

пресноводных видов рыб отсутствуют бентосные виды, поэтому не было возможности провести аналогичные сравнения.

Возрастные особенности в уровне активности ЦО рыб. Энергетический обмен на разных этапах индивидуального развития имеет свои особенности, связанные с возрастным изменением различных параметров организма в процессе жизнедеятельности. Прежде всего, в разные периоды онтогенеза меняется скорость потребления и аккумуляции энергии. Соотношение этих двух процессов на каждой стадии индивидуального развития характеризует уровень энергетического обмена организма. Так, например, вклад в суммарное потребление энергии такого процесса, как рост на разных стадиях развития, значительно меняется. Другим примером является функция движения, осуществление которой на различных этапах онтогенеза требует неодинаковых затрат [Озернюк, 2000]. В течение ювенильного периода происходит интенсивный линейный и весовой рост рыб. В этот период активно протекают биосинтетические процессы, происходит интенсивный синтез структурных и запасных веществ, что требует большого количества энергии АТФ. В органах и тканях рыб значительно увеличивается содержание углеводов и незастерифицированных жирных кислот, обеспечивающих растущий активный обмен, продолжает повышаться жирность и калорийность организма [Шатуновский, 2001]. Результаты исследования показывают, что все изученные виды рыб имеют наиболее высокую активность ЦО именно в период раннего онтогенеза, в возрасте 0+ и 1+. Незначительные межвидовые различия проявлялись в возрасте, на который приходилось максимальное значение активности фермента: у камбалы, окуня, судака, плотвы – в возрасте 0+, а у сельди, лосося, кумжи, щуки, сига, ряпушки, леща и колюшки – в возрасте 1+. У некоторых видов высокая активность фермента отмечена также и в возрасте 2+. В ходе развития рыб с увеличением их возраста и массы отмечается тенденция снижения уровня аэробного обмена и увеличения степени анаэробного обмена [Goolish, 1991; Moyes, Genge, 2010], что связано с возрастным ухудшением кровообращения тканей и органов и уменьшением двигательной активности особей [Forgan, Forester, 2012]. Наблюдаемая нами возрастная динамика активности цитохромоксидазы подтверждает этот факт – отмечено снижение уровня активности фермента у более старших рыб, независимо от их вида, особенностей биологии и экологии. Уменьшение с возрастом активности ЦО, а также снижение уровня экспрессии генов ее субъединиц и других

белков, вовлеченных в биогенез митохондрий, показано на примере животных различных таксонов – крыс, собак, приматов [Navarro, 2004]. Связывают это с возрастным ухудшением кровоснабжения органов и тканей, замедлением процессов роста, уменьшением двигательной активности особей, что приводит к снижению уровня потребления кислорода.

Половые различия в активности ЦО у некоторых видов рыб. Половые различия в активности ЦО изучали на примере беломорской сельди, кумжи, плотвы, ряпушки и сига (табл. 2). Как показывают результаты, половые особенности в активности цитохромоксидазы имеют видовую и возрастную специфику. Известно, что в течение ювенильного периода процессы дифференцировки и первичного роста половых клеток не связаны со значительными затратами пластических и энергетических веществ [Шатуновский, 2001]. Генеративный обмен, как форма пластического обмена, в этот период не играет существенной роли в организме. Большая часть образующейся энергии в этот период тратится на синтез структурных веществ, обеспечивающих процессы соматического роста. Видимо, поэтому у всех пяти видов исследованных рыб в возрасте 0+ и 1+ достоверные половые различия отсутствовали.

Таблица 2. Активность цитохром с-оксидазы в мышцах самцов и самок некоторых исследованных видов рыб, мкмоль/мин/мг белка

Виды рыб	Возраст	Самцы	Самки
Беломорская сельдь	2+	10,67 ± 0,25 n = 26	21,56 ± 0,30 * n = 30
	3+	9,23 ± 0,19 n = 27	14,48 ± 0,25 * n = 35
Кумжа (пресноводная форма)	2+	9,30 ± 0,29 N = 10	10,46 ± 0,28 n = 11
	3+	6,90 ± 0,09 n = 10	9,70 ± 0,08 * n = 10
	4+	5,90 ± 0,30 n = 9	6,70 ± 0,28 * n = 8
Плотва	2+	2,28 ± 0,10 n = 24	3,20 ± 0,23 * n = 28
	3+	2,21 ± 0,15 n = 18	3,04 ± 0,18 * n = 20
	4+	2,53 ± 0,19 n = 15	2,32 ± 0,28 n = 15
Сиги	2+	7,97 ± 0,14 n = 16	7,91 ± 0,14 n = 12
	3+	5,38 ± 0,20 n = 10	5,03 ± 0,20 n = 14
	4+	4,29 ± 0,45 n = 14	4,08 ± 0,45 n = 13
Ряпушка	2+	3,80 ± 0,22 n = 18	4,58 ± 0,19 * n = 18
	3+	2,41 ± 0,20 n = 15	3,50 ± 0,18 * n = 16
	4+	2,30 ± 0,24 n = 15	2,95 ± 0,24 n = 17

* – различия достоверны при p < 0,05

В конце ювенильного периода начинается подготовка к переходу в следующий период развития, в пределах которого достигается половая зрелость. Непосредственно в год достижения половой зрелости скорость линейного роста у рыб замедляется, так как значительная часть ассимилированной пищи используется не на прирост белка, а на отложение жира. В период достижения половой зрелости в систему общего обмена включается генеративный обмен. С этого времени в организме в первую очередь обеспечиваются оптимальные метаболические условия для роста и развития гонад. Как показывают результаты исследования, достоверные различия в активности цитохромоксидазы между самцами и самками некоторых видов рыб начинают проявляться к моменту достижения ими половой зрелости. Для беломорской сельди, кумжи и плотвы различия появляются в возрасте 2+, сохраняются у трехлетних рыб, а в возрасте 4+ они уже слабо выражены. У сига и ряпушки достоверных половых различий в активности фермента не было обнаружено. Следует отметить, что у видов с наблюдавшимися половыми различиями наибольшую активность цитохромоксидазы имеют самки, это свидетельствует о больших затратах энергии при созревании икры. Наиболее выраженные различия между самцами и самками показаны для беломорской сельди, что, вероятно, связано со специфическими особенностями энергетического обмена этого вида рыб, обитающего в условиях солёности и относительно низких температур.

Выводы

1. Установлено, что уровень активности цитохромоксидазы одновозрастных рыб определяется различными факторами – таксономическим положением вида, особенностями его биологии и экологии. Наблюдается относительное сходство в активности фермента у близкородственных видов – атлантического лосося и радужной форели (сем. Лососевые), у окуня и судака (сем. Окуневые), а также у леща и плотвы (сем. Карповые). Наиболее высокая активность ЦО характерна для морских видов рыб – беломорской сельди и камбалы, а также холодолюбивых видов рыб – атлантического лосося и кумжи.

2. Установлена одинаковая тенденция возрастных изменений в активности фермента для всех изученных видов: максимальные значения показателя наблюдаются в возрасте 0+, 1+, у более старших возрастных групп активность фермента постепенно снижается.

3. Выявлены достоверные половые различия в активности фермента у беломорской сельди, кумжи, ряпушки и плотвы в возрасте,

соответствующем половому созреванию (2+ и 3+), при этом активность фермента у самок была выше, чем у самцов.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта Президента РФ НШ–1642.2012.4, проекта РФФИ № 11-04-00167_а, проектов ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.» (соглашение № 8050 и г. к. 14.740.11.1034), программы фундаментальных исследований Президиума РАН на 2012–2014 гг. «Живая природа» и программы фундаментальных исследований ОБН РАН на 2012–2014 гг. «Биоресурсы».

Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам лаборатории экологии рыб и водных беспозвоночных ИБ КарНЦ РАН д. б. н. А. Е. Веселову, д. б. н. О. П. Стерлиговой, д. б. н. Н. В. Ильмасту и к. б. н. Д. С. Савосину за помощь в сборе материала для исследования.

Литература

Новиков Г. Г. Рост и энергетика развития костистых рыб в раннем онтогенезе. М.: Эдиториал УРСС, 2000. 296 с.

Озернюк Н. Д. Биоэнергетика онтогенеза. М.: Изд-во МГУ. 2000.

Сравнительная физиология животных: в 3-х томах / Edited by С. Ladd Posser; Пер. с англ. под ред. Т. М. Турпаева. 1977. М.: Мир. Т. 1. 608 с.

Чугунова Н. И. Руководство по изучению возраста и роста рыб. М.: Изд-во АН СССР. 1959. 162 с.

Шатуновский М. И. Эколого-физиологические подходы к периодизации онтогенеза рыб // Экологические проблемы онтогенеза рыб: физиолого-биохимические аспекты. М.: Изд-во МГУ, 2001. С. 13–19.

Шмидт-Ниельсен К. Физиология животных: прикосновение и среда. 1982. М.: Мир. 416 с.

Arnold S., Kadenbach B. Cell respiration is controlled by ATP, an allosteric inhibitor of cytochrome c oxidase // Eur. J. Biochem. 1997. Vol. 249, N 1. P. 350–354.

Bouchard P., Guderley H. Time course of the response of mitochondria from oxidative muscle during thermal acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* // J. Exp. Biol. 2003. Vol. 206 (Pt 19). P. 3455–3465.

Bremer K., Moyes C. D. Origins of variation in muscle cytochrome c oxidase activity within and between fish species // J. Exp. Biol. 2011. Vol. 214. P. 1888–1895.

Carr H. S., Winge D. R. Assembly of cytochrome c oxidase within the mitochondrion. Acc. Chem. Res // 2003. Vol. 36. P. 309–316.

Dalziel A. C., Moyes C. D., Fredriksson E., Loughheed S. C. Molecular evolution of cytochrome c oxidase in high-performance fish (teleostei: Scombroidei) // J. Mol. Evol. 2006. Vol. 62, N 3. P. 319–331.

Duggan A. T. Coordination of cytochrome c oxidase gene expression in the remodelling of skeletal muscle / A. T. Duggan, K. M. Kocha, C. T. Monk, K. Bremer, C. D. Moyes // J. Exp. Biol. 2011. Vol. 214. P. 1880–1887.

Forgan L. G., Forster M. E. Oxygen dependence of metabolism and cellular adaptation in vertebrate muscles: a review // J. Comp. Physiol. B. 2012. Vol. 182, N 2. P. 177–188.

Goolish E. M. Aerobic and anaerobic scaling in fish // Biological Reviews. 1991. Vol. 66. P. 33–56.

Guderley H. Metabolic responses to low temperature in fish muscle. // Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 2004. Vol. 79, N 2. P. 409–427.

Kadenbach B., Arnold S. A second mechanism of respiratory control // FEBS Lett. 1999. Vol. 447. P. 131–134.

Kadenbach B., Huttemann M., Arnold S., Lee I., Bender E. Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase // Free Radical Biology & Medicine. 2000. Vol. 29. P. 211–221.

Kraffe E., Marty Y., Guderley H. Changes in mitochondrial oxidative capacity during thermal acclimation of rainbow trout: roles of membrane proteins, phospholipids and its fatty acid composition // J. Exper. Biology. 2007. Vol. 210. P. 149–165.

Little A. G., Kocha K. M., Loughheed S. C., Moyes C. D. Evolution of the nuclear-encoded cytochrome oxidase subunits in vertebrates // Physiol. Genomics. 2010. Vol. 42. N 1. P. 76–84.

Little A. G., Loughheed S. C., Moyes C. D. Evolution of mitochondrial-encoded cytochrome oxidase subunits in endothermic fish: the importance of taxon-sampling in codon-based models // Mol. Phylogenet. Evol. 2012. Vol. 63, N 3. P. 679–684.

Lucassen M., Schmidt A., Eckerle L. G., Pörtner H. O. Mitochondrial proliferation in the permanent vs. temporary cold: enzyme activities and mRNA levels in Antarctic and temperate zoarcid fish // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2003. Vol. 285. P. 1410–1420.

Meshcheryakova O. V., Churova M. V., Nemova N. N. Mitochondrial lactate oxidation: mechanism and importance at the temperature adaptation // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 2012. Vol. 163A, N 1. Supplement. P. 5–6.

Montecucco C., Schiavo G., Bacci B., Bisson R. Isolation and characterization of cytochrome c oxidase from bird and fish heart mitochondria // Comp. Biochem. Physiol. B. 1987. Vol. 87, N 4. P. 851–856.

Moyes C. D., Genge C. E. Scaling of muscle metabolic enzymes: an historical perspective // Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 2010. Vol. 156, N 3. P. 344–350.

Navarro A. Mitochondrial enzyme activities as biochemical markers of aging // Mol. Aspects Med. 2004. Vol. 25, N 1–2. P. 37–48.

O'Brien K. M. Mitochondrial biogenesis in cold-bodied fishes // J. Exp. Biol. 2011. Vol. 214. P. 275–285.

Smith L. Spectrophotometric assay of cytochrome c oxidase // Methods in Biochem. Analysis. 1995. Vol. 2. P. 427–434.

Somero G. N. The physiology of global change: linking patterns to mechanisms // Ann Rev. Mar. Sci. 2012. N 4. P. 39–61.

Speers-Roesch B., Ballantyne J. S. Activities of antioxidant enzymes and cytochrome c oxidase in liver of Arctic and temperate teleosts // Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 2005. Vol. 140, N 4. P. 487–494.

Sullivan K. M., Somero G. N. Enzyme activities of fish skeletal muscle and brain as influenced by depth of occurrence and habits of feeding and locomotion // Mar. Biol. 1980. Vol. 60. P. 91–99.

White C. R., Alton L. A., Frappell P. B. Metabolic cold adaptation in fishes occurs at the level of whole animal, mitochondria and enzyme // Proc. Biol. Sci. 2012. Vol. 279, N 1734. P. 1740–1747.

Wodtke E. Temperature adaptation of biological membranes. Compensation of the molar activity of cytochrome c oxidase in the mitochondrial energy-transducing membrane during thermal acclimation of the carp (*Cyprinus carpio* L.) // Biochim. Biophys. Acta. 1981. Vol. 640, N 3. P. 710–720.

Yung-Che Tseng, Pung-Pung Hwang. Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish // Comp. Biochem. And Physiol., Part C. 2008. Vol. 148, P. 419–429.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Мещерякова Ольга Владимировна

и.о. зав. лаб. экологической биохимии, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: mesch@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 571879

Чурова Мария Викторовна

мл. научный сотрудник лаб. экологической биохимии, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: mchurova@yandex.ru
тел.: (8142) 571879

Немова Нина Николаевна

директор, чл.-корр. РАН, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: nemova@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 783615

Meshcheryakova, Olga

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: mesch@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 571879

Churova, Maria

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: mchurova@yandex.ru
tel.: (8142) 571879

Nemova, Nina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: nemova@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 783615

УДК 582.594:581.13/.14

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ МИНЕРАЛЬНОЙ ОСНОВЫ СРЕДЫ И РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА ОРГАНОГЕНЕЗ ЦИМБИДИУМА ГИБРИДНОГО В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Е. В. Фатеева, Е. В. Мокшин, А. С. Лукаткин

Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева

В культуре *in vitro* изучали влияние концентрации минеральной основы среды Мурасиге-Скуга (МС) и регуляторов роста (РР) – синтетических аналогов цитокининов (кинетина, 6-бензиламинопурина (6-БАП), тидиазурона) и ауксина (индолил-3-уксусной кислоты (ИУК)) – на органогенез цимбидиума гибридного. При варьировании концентрации минеральной основы среды выявлено, что рост побегов был максимальным на полной среде, а корнеобразование и формирование псевдобульб – на 1/2 среды МС. При исследовании влияния различных препаратов цитокининового типа в сочетании с ауксиновым препаратом на органогенез цимбидиума показано лучшее формирование псевдобульб в вариантах с использованием 2,5 мг/л кинетина + 0,5 мг/л ИУК (по количеству) и 0,1 мг/л кинетина + 0,5 мг/л ИУК (по размеру псевдобульб). Количество формирующихся побегов было максимальным на среде с внесением 10^{-4} моль/л тидиазурона + 0,5 мг/л ИУК, тогда как побеги максимальной длины формировались в варианте с добавлением 6-БАП + ИУК (по 0,5 мг/л каждый).

К л ю ч е в ы е с л о в а : *Cymbidium*; *in vitro*; среда Мурасиге-Скуга; кинетин; тидиазурон; 6-бензиламинопурин; ИУК; органогенез; псевдобульба; рост.

E. V. Fateeva, E. V. Mokshin, A. S. Lukatkin. EFFECTS OF THE CONCENTRATIONS OF THE MEDIUM INORGANIC BASE AND GROWTH REGULATORS ON *CYMBIDIUM* HYBRID ORGANOGENESIS *IN VITRO*

The effects of the concentration of the inorganic base of Murashige-Skoog (MS) media and synthetic plant growth regulators (PGR) – cytokinins (kinetin, 6-BAP or thidiazuron) with IAA – on *Cymbidium* hybrid organogenesis *in vitro* are presented. In the experiment with varying concentrations of the MS mineral base we revealed that the growth of shoots was maximal on the complete MS medium, whereas rooting and pseudobulbs formation – on 1/2 MS. In the combined PGR and auxin treatments the best effect on the formation of pseudobulbs in the *Cymbidium* hybrid was achieved in media supplemented with 2.5 mg/l kinetin + 0.5 mg/l IAA (pseudobulbs number) and 0.1 mg/l kinetin + 0.5 mg/l IAA (pseudobulbs size). The number of newly formed shoots was maximal on the medium supplemented with 10^{-4} mol/l thidiazuron + 0.5 mg/l IAA, whereas the longest shoots formed on media supplemented with 6-BAP + IAA (0.5 mg/l each).

K e y w o r d s : *Cymbidium* hybrids; *in vitro*; Murashige-Skoog media; inorganic base; kinetin; thidiazuron; benzyladenine; IAA; organogenesis; pseudobulbs; growth.

Введение

Растительные ресурсы земного шара включают огромное разнообразие полезных для человека растений, в том числе цветочно-декоративных. Их ассортимент ежегодно увеличивается благодаря введению в культуру дикорастущих видов и созданию новых сортов. Травянистые декоративные многолетники открытого грунта представлены в культуре примерно шестью тысячами видов и десятками тысяч сортов [Долганова, 2002].

В настоящее время возрастает необходимость ускоренного размножения ценных видов растений, в том числе и декоративных. В связи с этим перспективна разработка приемов повышения качества получаемой продукции растений, особенно с использованием технологий *in vitro* [Мокшин, Лукаткин, 2005а, 2005б; Mokshin et al., 2008]. В промышленном цветоводстве выращиваются многочисленные виды – представители различных семейств, происходящие из разных частей земного шара, преимущественно субтропических и тропических районов Америки, Африки и островов Тихого океана [Висящева et al., 1991]. Высокая декоративность цветков представителей семейства *Orchidaceae* Lindl. положила начало культуре орхидей во всех странах мира [Тетеря, 2007]. В настоящее время интенсивно развивается техника размножения орхидей *in vitro*.

Цимбидиум гибридный (*Cymbidium hybrid*) является весьма сложным межвидовым гибридом. Для его создания использовано много видов, в частности *C. lovianum* Reichb f., *C. insigne* Roife, *C. giganteum* Wall. и др. [Черевченко, Кушнир, 1986]. Родиной исходных родительских видов многих гибридных цимбидиумов являются более прохладные районы тропической Азии, поэтому сорта цимбидиумов представляют интерес как наиболее приспособленные к прохладным условиям оранжерей России.

В литературе имеются отрывочные сведения о влиянии минеральной основы среды и различных РР на размножение, развитие почек и индукцию цветения в культуре *in vitro* ряда видов *Cymbidium* [Fonnesbech, 1972; Chang, Chang, 2000, 2003; Chen et al., 2005; Tao et al., 2011; Kau, Bhutani, 2012], которые довольно противоречивы как в целом по органогенезу, так и по выбору оптимальных концентраций РР [Chang, Chang, 2000; Kau, Bhutani, 2012]. Для других объектов в культуре *in vitro* имеются данные по использованию безгормональной среды МС, как полной, так и редуцированной вдвое (например, при укоренении побегов растений рода *Hosta*) [Балабова, Соловьева, 2006]. Помимо природных фитогор-

монов получено большое количество их синтетических аналогов, которые часто обладают высокой физиологической активностью, не уступая фитогормонам или превосходя их [Муромцев и др., 1987], и часто используются в работах с культурами *in vitro*. Например, побеговую культуру *Gladiolus hybrida* поддерживали в течение двух лет на среде МС, содержащей 0,5–1,0 мг/л 6-БАП, с высоким коэффициентом размножения [Фоменко, Веевник, 2010]. Очевидно, что для каждого вида нужно подбирать индивидуальные параметры состава питательной среды, регуляторов роста и других компонентов. В связи с этим целью работы было выяснение влияния концентрации минеральной основы питательной среды МС и различных цитокининовых РР на органогенез цимбидиума гибридного *in vitro*. Задачи работы: выяснить влияние минеральной основы среды (по прописи МС) на образование псевдобульб и длину осевых органов цимбидиума (опыт 1); исследовать влияние синтетических аналогов цитокининов (кинетина, 6-БАП и тидиазурона) совместно с ИУК на формирование и рост псевдобульб и побегов цимбидиума (опыт 2).

Материалы и методы

В качестве объектов в работе использовали стерильные пробирочные растения цимбидиума гибридного (*Cymbidium hybrid*), любезно предоставленные сотрудниками Главного ботанического сада РАН.

Клонально размноженные псевдобульбы высаживали на агаризованную (0,7 %) среду по прописи Мурасиге и Скуга [Murashige, Skoog, 1962] (рН 5,6–5,8) с добавлением активированного угля (0,15 %) и варьированием концентрации минеральной основы (полная, 1/2, 1/4, 1/8 части) – в первой серии опытов, синтетических аналогов цитокининов (6-БАП, тидиазурон, кинетин) + 0,5 мг/л ИУК на полной среде МС – во второй серии опытов. Растения культивировали в сосудах объемом 150 мл в условиях постоянного освещения белыми люминесцентными лампами при температуре 20–24 °С. Количество и размер псевдобульб, побегов, корней учитывали еженедельно начиная с третьей недели культивирования.

Проводили 7 последовательных серий опытов. Каждый вариант опыта включал 10 биологических повторностей (растений *in vitro*). Результаты обрабатывали статистически по общепринятым биометрическим формулам с использованием пакетов прикладных программ Microsoft Excel. На графиках представлены средние значения из всех опытов с их стандартными ошибками.

Результаты и обсуждение

Важнейшим фактором, который необходимо учитывать при клональном микроразмножении растений, является минеральная основа среды. В ходе исследований по изучению влияния различной концентрации макро- и микросолей (по МС) в среде на органогенез цимбидиума гибридного установлено, что минимальное образование псевдобульб происходило на полной среде. Снижение концентрации МС приводило к повышению количества формирующихся псевдобульб (рис. 1) (при этом достоверных различий между вариантами 1/2, 1/4 и 1/8 концентрации среды не было). Аналогичная тенденция сохранялась и по количеству побегов: минимальным оно было в варианте с полной средой МС, максимальным – 1/2 и 1/4 МС. Что касается количества корней, то наибольшим оно было в варианте с 1/2 МС, хотя различия с другими вариантами опыта зачастую недостоверны.

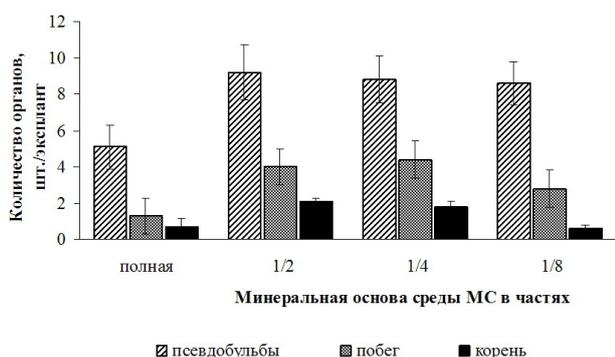


Рис. 1. Органогенез эксплантов цимбидиума гибридного на среде МС с различной концентрацией минеральной основы

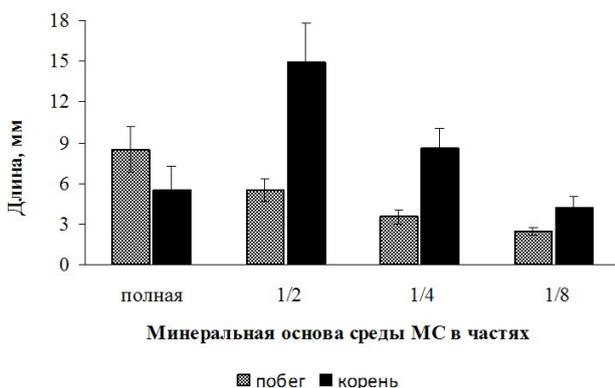


Рис. 2. Влияние минеральной основы среды МС на длину побегов и корней цимбидиума гибридного

При изучении влияния концентрации минеральной основы МС на длину осевых органов цимбидиума установлено, что максимальный

рост побегов наблюдался на полной среде МС (рис. 2). Снижение концентрации минеральной основы среды приводило к прогрессирующему уменьшению длины побега. Максимальный размер корней отмечен на среде с 1/2 солей МС.

Известно, что при культивировании растений *in vitro* чаще всего используются питательные среды с минеральной основой МС, Блейдза, Гамборга, Уайта, Шенка-Хильдебранта, Серлиса [Helmold, 1978], и рост разных видов на них существенно варьирует. Показано, что минеральный состав среды при одних и тех же световых и температурных режимах и одинаковом органическом фоне существенно влиял на процессы приживаемости, роста и регенерации эксплантов наперстянки пурпурной *in vitro* [Смольникова, Величко, 2009]. Наши данные показывают, что при культивировании цимбидиума гибридного *in vitro* состав минеральной основы среды играет определяющую роль для разных элементов органогенеза: если для формирования псевдобульб оптимальной была неполная среда МС (1/2–1/8), для образования корней и побегов – 1/2 МС, то для роста побегов необходима полная среда МС, а для роста корней – 1/2 МС.

Важную роль в регуляции органогенеза играет гормональный состав среды. Нами выяснялось действие различных концентраций 6-БАП, кинетина и тидиазулона в сочетании с 0,5 мг/л ИУК на формирование новых органов цимбидиума гибридного. При изучении влияния РР на количество образовавшихся псевдобульб максимальное значение (5 шт./эксплант) зафиксировано на среде с добавлением 2,5 мг/л кинетина + 0,5 мг/л ИУК (табл. 1). Менее эффективным оказался вариант с 1,5 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л ИУК, здесь образовалось 3,7 шт./эксплант. Несколько ниже, чем в варианте с кинетином, но выше, чем на среде с 6-БАП, этот показатель был на среде с добавлением 10^{-5} моль/л тидиазулона (табл. 2).

Данные регуляторы роста оказывали влияние не только на количество, но и на размер образующихся псевдобульб. Максимальным (4,5 мм) размер был в варианте с использованием 0,1 мг/л кинетина + 0,5 мг/л ИУК (табл. 1). Дальнейшее увеличение концентрации данного препарата в среде снижало этот показатель. Использование в качестве регулятора 6-БАП вкуче с ИУК оказалось менее эффективным для формирования псевдобульб. Максимум (3,8 мм) отмечался в варианте с 0,5 мг/л 6-БАП. Использование тидиазулона совместно с ИУК привело к формированию псевдобульб минимального размера – от 1,2 до 1,7 мм (данные не приведены).

Таблица 1. Влияние различных концентраций кинетина или 6-БАП (вместе с 0,5 мг/л ИУК) на формирование и рост псевдобульб цимбидиума гибридного

Концентрация, мг/л	Псевдобульбы			
	Количество, шт.	Размер, мм	Количество, шт.	Размер, мм
	6-БАП		Кинетин	
0,1	1,3 ± 0,3	1,0 ± 0,4	1,0 ± 0,1	4,5 ± 0,3
0,5	1,4 ± 0,2	3,8 ± 0,6	1,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1
1,0	2,3 ± 0,4	2,9 ± 0,3	1,3 ± 0,2	2,3 ± 0,1
1,5	3,7 ± 0,1	2,3 ± 0,2	2,0 ± 0,5	2,0 ± 0,4
2,0	3,2 ± 0,3	2,0 ± 0,4	3,4 ± 0,2	1,5 ± 0,1
2,5	2,9 ± 0,6	1,4 ± 0,2	5,0 ± 0,3	1,1 ± 0,4
3,0	2,6 ± 0,3	1,4 ± 0,1	4,5 ± 0,2	1,1 ± 0,3
3,5	2,3 ± 0,3	1,2 ± 0,2	4,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1
4,0	2,3 ± 0,4	1,0 ± 0,2	1,5 ± 0,3	0,5 ± 0,2

Побегообразование у цимбидиума гибридного существенно зависело от использованных РР. Количество регенерированных побегов на средах с разными РР варьировало, и наилучшие результаты получены на средах, дополненных 2,5 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л ИУК – 2 шт./эксплант (рис. 3), и 10⁻⁴ моль/л тидиазурона + 0,5 мг/л ИУК – 4 шт./эксплант (табл. 2). Кинетин оказал очень слабое действие на этот показатель (данные не приведены).

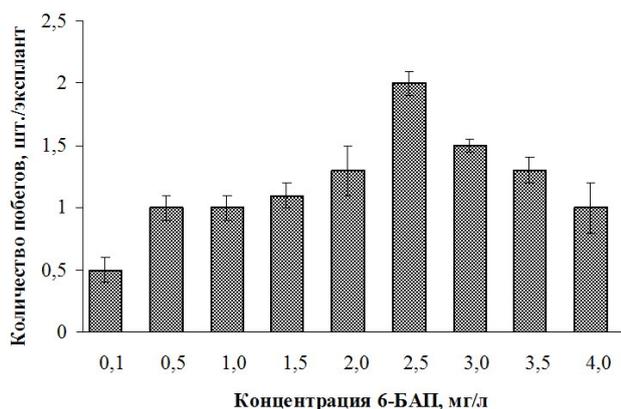


Рис. 3. Влияние различной концентрации 6-БАП в сочетании с 0,5 мг/л ИУК на количество побегов цимбидиума гибридного

При исследовании влияния РР на длину формирующихся побегов хорошие результаты получены при использовании 6-БАП. Здесь выявлены максимальные значения этого критерия. Оптимальным оказался вариант с внесением в среду 0,5 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л ИУК – 7,7 мм (данные не приведены). В опыте с тидиазурином лучший результат отмечался в варианте с 10⁻⁷ моль/л + 0,5 мг/л ИУК (табл. 2). Повышение и понижение концентрации тидиазурина приводило к уменьшению значений. Поскольку кинетин не оказал значительного действия на количество побегов, сведения о влиянии данного препарата на длину побегов не приведены.

Таблица 2. Влияние различных концентраций тидиазурона (вместе с 0,5 мг/л ИУК) на органоогенез цимбидиума гибридного

Концентрация, моль/л	Псевдобульбы, шт.	Побеги	
		Количество, шт.	Длина, мм
10 ⁻¹⁵	1,0 ± 0,4	4,0 ± 0,01	1,5 ± 0,1
10 ⁻¹³	1,5 ± 0,3	1,8 ± 0,1	3,1 ± 0,2
10 ⁻¹¹	2,0 ± 0,3	1,5 ± 0,2	5,0 ± 0,3
10 ⁻⁹	2,5 ± 0,3	1,3 ± 0,01	6,0 ± 0,2
10 ⁻⁷	2,7 ± 0,3	1,0 ± 0,03	3,0 ± 0,01
10 ⁻⁶	3,4 ± 0,3	1,0 ± 0,1	2,1 ± 0,1
10 ⁻⁵	4,2 ± 0,2	0,5 ± 0,1	1,0 ± 0,15
10 ⁻⁴	3,5 ± 0,3	0	0

Индукция с помощью цитокининовых и ауксиновых препаратов (в частности, кинетина и ИУК) органоогенеза в недифференцированной ткани стеблевого каллуса табака была показана еще Ф. Скугом с сотрудниками, которые установили, что для закладки корней и побегов требовались свои специфические концентрации фитогормонов [Scoog, Miller, 1957]. В зависимости от этапа микроклонального размножения косточковых культур в питательные среды добавляют 6-БАП в концентрациях от 0,2 до 2 мг/л [Фаустов и др., 1988; Орлова, 2002]. Другие авторы показали эффективность использования в качестве цитокининов производных дифенилмочевины – тидиазурона и CPPU, которые оказали положительное влияние на приживаемость эксплантов и регенерацию побегов [Tang et al., 2002; Bhagwat, Lane, 2004; Сквородников и др., 2010]. Тидиазурон непосредственно способствует росту, подобно N6-замещенным цитокининам, или может вызвать синтез и (или) накопление эндогенного цитокинина [Mok M., Mok D., 1985]. При этом эффективность различных цитокининов и использованные концентрации существенно варьировали.

В нашем исследовании выявлено, что различные цитокининовые препараты неодинаково влияли на органоогенез цимбидиума гибридного в культуре *in vitro*. Очевидно, это связано со структурными особенностями разных синтетических аналогов цитокининов, а также с физиолого-биохимическими различиями их действия. По данным Tao et al. [2011], внесение в среду 6-БАП оказало негативное влияние на формирование и количество псевдобульб, причем с повышением концентрации 6-БАП количество образующихся псевдобульб уменьшалось. Однако синтетические аналоги цитокининов оказывали существенное влияние на побегообразование, которое без них не происходило. Эти данные согласуются с полученными в ранних работах, когда для индукции побегообразования в культуре

ткани *C. faberi* среду дополняли цитокининами, в частности 6-БАП [Hasegawa et al., 1985]. Показано, что высокие концентрации 6-БАП ускоряют дифференциацию и рост псевдобульб, однако очень высокие концентрации тормозили данный процесс [Fu et al., 1997]. С другой стороны, имеются сведения о положительном влиянии на побегообразование у китайских орхидей другого цитокининового препарата – тидиазурона [Chang, Chang, 2000]. В исследованиях на многих растениях показано, что тидиазурон оказывал на индукцию побегообразования более эффективное действие, чем 6-БАП [Fan et al., 2010]. В дальнейшем эти данные подтвердились в работе по микроразмножению *C. faberi* [Tao et al., 2011]. В этом исследовании было показано, что совместное использование тидиазурона и нафтилуксусной кислоты положительно влияло на побегообразование *C. faberi*, и побеги формировались здоровыми и сильными.

Заключение

На основании полученных данных видно, что минеральная основа среды и концентрация регуляторов роста играют важнейшую роль в прохождении органогенеза цимбидиума гибридного. Выяснено, что для формирования псевдобульб наилучшей была среда с 1/2 МС, для формирования побегов – 1/2 и 1/4, тогда как побеги наибольшей длины образовывались на полной среде, а максимальное действие на ризогенез оказала среда с 1/2 МС. При изучении влияния различных синтетических аналогов цитокининов (кинетина, 6-БАП и тидиазурона) и ауксина на формирование псевдобульб хорошо себя зарекомендовали варианты с использованием 2,5 мг/л кинетина + 0,5 мг/л ИУК (по количеству) и 0,1 мг/л кинетина + 0,5 мг/л ИУК (по размеру псевдобульб). Внесение 10^{-4} моль/л тидиазурона + 0,5 мг/л ИУК показало хорошие результаты по количеству формирующихся побегов, тогда как использование 0,5 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л ИУК оказалось эффективным для получения побегов максимальной длины.

Таким образом, для ускоренного размножения цимбидиума гибридного *in vitro* (псевдобульбами) рекомендуется использовать среду с 1/2 минеральной основы МС, дополненную 2,5 мг/л кинетина + 0,5 мг/л ИУК. Однако для формирования более крупных органов (в целях быстрого последующего формирования растений *ex vitro*) целесообразно использовать иные комбинации синтетических аналогов цитокининов с ауксином.

Литература

- Балабова Д. В., Соловьева В. В. Микроразмножение растений рода *Hosta* // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: материалы VI Междунар. науч.-практич. конф. Барнаул: Алтайские стра- ницы, 2006. С. 311–313.
- Висящева Л. В., Соколова Т. А. Промышленное цветоводство. М.: Знание, 1991. 368 с.
- Долганова З. В. Биология и интродукция цветочно-декоративных корневищных многолетников в Западной Сибири / РАСХН. Сиб. отд-ние. НИИСС им. М. А. Лисавенко. Новосибирск, 2002. 232 с.
- Мокшин Е. В., Лукаткин А. С. Масс-клональное размножение гладиолуса *in vitro* // Биотехнология. 2005а. № 1. С. 19–26.
- Мокшин Е. В., Лукаткин А. С. Влияние регуляторов роста на морфогенез Лонгифлорум-Азиатик-гибридов лилий в культуре *in vitro* // Агрехимия. 2005б. № 3. С. 55–59.
- Муромцев Г. С. Чкаников Д. И., Кулаева О. Н., Гамбург К. З. Основы химической регуляции роста и продуктивности растений. М.: Агропромиздат, 1987. 383 с.
- Орлова С. Ю. Биологические особенности и селекционная ценность сортов вишни в условиях северо-запада России: автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 2002. 20 с.
- Сквородников Д. Н., Сазонов Ф. Ф., Райков И. А. Опыт использования клонального микроразмножения смородины черной в селекционном процессе // Интенсификация плодоводства Беларуси: традиции, достижения, перспективы: материалы междунар. науч. конф., пос. Самохваловичи, 1 сентября – 1 октября 2010 г. / РУП «Ин-т плодоводства»; редкол.: В. А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. Самохваловичи, 2010. С. 128–130.
- Смольникова Я. В., Величко Н. А. Биологически активные вещества каллусной ткани наперстянки пурпурной // Проблемы современной аграрной науки: мат-лы междунар. заоч. науч. конф. Красноярск, 2009. Т. 3. С. 265–268
- Тетеря О. П. Об итогах и перспективе интродукции орхидных, культивируемых в коллекциях Ботанического сада-института ДВО РАН // Вестник ТвГУ. Сер. «Биология и экология». 2007. Вып. 4, № 8. С. 160–164.
- Фаустов В. В., Олешко Е. В., Жаркова И. В., Асадулаев З. М., Шарафутдинов Х. В., Исмаил Х. Микроразмножение вишни // Известия Тимирязевской с.-х. академии. М., 1988. № 5. С. 131–148.
- Фоменко Т. И., Веевник А. А. Микроразмножение гладиолуса *in vitro* // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира: материалы III Всерос. науч.-практ. конф. Волгоград, 2010. С. 292–297.
- Черевченко Т. М., Кушнир Г. П. Орхидеи в культуре. Киев: Наук. Думка, 1986. 200 с.
- Bhagwat B., Lane D. W. *In vitro* shoot regeneration from leaves of sweet cherry (*Prunus avium*) «Lapins» and «Sweetheart» // Plant Cell Tissue and Organ Culture. 2004. Vol. 78, N 3. P. 173–181

Chang C., Chang W. Effect of thidiazuron on bud development of *Cymbidium sinense* Willd *in vitro* // Plant Growth Regul. 2000. Vol. 30, N 3. P. 171–175.

Chang C., Chang W. Cytokinins promotion of flowering in *Cymbidium ensifolium* var. *Misericors in vitro* // Plant Growth Regul. 2003. Vol. 39, N 3. P. 217–221.

Chen Y., Liu X., Liu Y. *In vitro* plant regeneration from the immature seeds of *Cymbidium faberi* // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2005. Vol. 81, N 3. P. 247–251.

Chowdhury I., Rahman A. R. M., Islam M. O., Matsui S. Effect of plant growth regulators on callus proliferation, plantlet regeneration and growth of plantlets of *Doritaenopsis* orchid // Biotechnology. 2003. Vol. 2, N 2. P. 214–221.

Fan M. Q., Zhu Y. L., Zhu M. Y., Xu S. C., Li Y. Y. Research progress *in vitro* regeneration of vegetable crops of *Brassica rapa* // China Vegs. 2010. Vol. 14, N 2. P. 8–12.

Fonnesbech M. Growth hormones and propagation of *Cymbidium in vitro* // Physiologia Plantarum. 1972. Vol. 27, N 2. P. 310–316.

Fu X. D., Qian X. H., Mao B. Z., Li D. B. Effects of some factors on the growth and differentiation of *Cymbidium ensifolium protocorm* // Journal of Zhejiang University. 1997. Vol. 23, N 5. P. 547–550.

Hasegawa A., Ohashi H., Goi M. Effects of BA, rhizome length, mechanical treatment and liquid sharking culture on the shoot formation from rhizome in *Cymbidium faberi* Rolfe. // Hort. Sci. 1985. Vol. 166, N 2. P. 25–40.

Helmold H. Sterols in cells culture of *Digitalis* // Planta Med. 1978. Vol. 20, N 2. P. 185–187.

Kau S., Bhutani K. K. Organic growth supplement stimulants for *in vitro* multiplication of *Cymbidium pendulum* (Roxb.) Sw. // Hort. Sci. 2012. Vol. 39, N 1. P. 47–52.

Mok M., Mok D. The metabolism of [¹⁴C]-thidiazuron in callus tissues of *Phaseolus lunatus* // Physiol Plant. 1985. Vol. 65, N 3. P. 427–432.

Mokshin E. V., Lukatkin A. S., Teixeira da Silva J. A. Aseptic culture and simple, clonal micropropagation of *Ficus elastica* Roxb. // Floriculture and Ornamental Biotechnology. 2008. Vol. 2, N 2. P. 52–54.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15, N 3. P. 473–497.

Skoog F., Miller C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro* // Symp. Soc. Exp. Biol. 1957. XI: P. 118–131.

Tang H., Ren Z., Reustle G., Krczal G. Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars // Scientia Horticulturae. 2002. Vol. 93, N 4. P. 235–244.

Tao J., Liqin Y., Fen K., Daqiu Z. Effects of plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Cymbidium faberi* Rolfe // African Journal of Biotechnology. 2011. Vol. 10, N 69. P. 15639–15646.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Фатеева Екатерина Викторовна

магистрант
ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный
университет им. Н. П. Огарева»
ул. Большевикская, 68, Саранск,
Республика Мордовия, Россия, 430005
эл. почта: fateeva.ek.v@yandex.ru
тел.: (8342) 322507

Мокшин Евгений Владимирович

к. б. н., доцент каф. ботаники и физиологии растений
ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный
университет им. Н. П. Огарева»
ул. Большевикская, 68, Саранск,
Республика Мордовия, Россия, 430005
эл. почта: Evmokshin@yandex.ru
тел.: (8342) 322507

Лукаткин Александр Степанович

д. б. н., проф., зав. кафедрой ботаники
и физиологии растений
ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный
университет им. Н. П. Огарева»
ул. Большевикская, 68, Саранск,
Республика Мордовия, Россия, 430005
эл. почта: aslukatkin@yandex.ru
тел.: (8342) 322507

Fateeva, Ekaterina

Mordovia State University
68 Bolshevistskaya St., 430005 Saransk,
Mordovia, Russia
e-mail: fateeva.ek.v@yandex.ru
tel.: (8342) 322507

Mokshin, Evgueni

Mordovia State University
68 Bolshevistskaya St., 430005 Saransk,
Mordovia, Russia
e-mail: Evmokshin@yandex.ru
tel.: (8342) 322507

Lukatkin, Alexandr

Mordovia State University
68 Bolshevistskaya St., 430005 Saransk,
Mordovia, Russia
e-mail: aslukatkin@yandex.ru
tel.: (8342) 322507

УДК 591.185.6:591.05:591.3:599.323.4

ОТСУТСТВИЕ ФОТОПЕРИОДИЗМА НАРУШАЕТ ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ КРЫС

**Е. А. Хижкин¹, В. Д. Юнаш², Л. Б. Узенбаева¹, И. А. Виноградова²,
В. А. Илюха^{1,2}, Т. Н. Ильина¹, Ю. П. Баранова², А. В. Морозов¹**

¹Институт биологии Карельского научного центра РАН

²Петрозаводский государственный университет

Исследовано влияние постоянного освещения и постоянной темноты на состояние антиоксидантной системы, лейкоцитарную формулу, скорость полового созревания, а также продолжительность жизни крыс. Установлено, что воздействие постоянного освещения в период внутриутробного развития и с момента рождения приводит к однонаправленным изменениям изученных физиологических систем у крыс, хотя их выраженность различается в зависимости от момента начала воздействий. Отсутствие фотопериодизма (при постоянном освещении и световой депривации) в препубертатный период нарушает функционирование только тех физиологических показателей, которые подчинены циркадианной ритмике.

К л ю ч е в ы е с л о в а : фотопериод, антиоксидантная система, лейкоциты, половое созревание, продолжительность жизни, постоянное освещение, постоянная темнота.

**E. A. Khizhkin, V. D. Yunash, L. B. Uzenbaeva, I. A. Vinogradova,
V. A. Ilyukha, T. N. Ilyina, Yu. P. Baranova, A. V. Morozov. FUNCTIONING
OF THE PHYSIOLOGICAL SYSTEMS IN THE POSTNATAL ONTOGENY
IN RATS IS DISRUPTED IN THE ABSENCE OF THE PHOTOPERIOD**

We evaluated the effect of constant light and constant darkness on the antioxidant system, leukocyte formula, pubescence and life span of rats. It was established that exposure of pregnant females or newborns to constant light results in similar changes in the rats' physiological systems, although their intensity varies depending on the timing of the exposure. Only the physiological processes subject to circadian rhythms are affected in the absence of the photoperiod (at constant light and light deprivation) during the prepubertal period.

K e y w o r d s : photoperiod, antioxidant system, leucocytes, pubescence, life span, constant light, constant darkness.

Введение

Свет является экологическим фактором, регулирующим периоды активности, размножения, миграцию, линьку и другие биологические явления у животных. Реакция организма

на смену световых условий окружающей среды обусловлена гормоном эпифиза (пинеальной железы) мелатонином, синтез которого подчинен циркадианной ритмике и осуществляется в темное время суток. Воздействие же света вызывает эффект «физиологической

пинеалэктомии» – подавления синтетической функции эпифиза [Simonpeaux, Ribelayga, 2003; Anisimov, 2006].

Мелатонин участвует в регуляции многих физиологических процессов, таких как половое созревание, метаболизм свободных радикалов, иммунный ответ, пролиферация и дифференцировка клеток и др. Однако в большинстве случаев изучается ограниченное количество физиологических параметров, хотя в организме функционирование всех систем связано между собой. Другим важным аспектом является вопрос о влиянии на функционирование физиологических систем в организме нарушения и усиления синтетической функции эпифиза при длительном отсутствии фотопериодизма (постоянное освещение и постоянная темнота). Известно, что синтез и активность антиоксидантных ферментов (АОФ) повышается ночью и совпадает по времени с синтезом мелатонина эпифизом. При этом постоянное освещение подавляет активность ферментов антиоксидантной системы (АОС) [Pablos et al., 1998; Albarran et al., 2001; Tomas-Zapico et al., 2003; Tunes et al., 2003], однако в подобных экспериментах воздействие света было кратковременным (от нескольких дней до нескольких недель).

Цель настоящего исследования – изучить влияние длительного «включения» и «выключения» синтетической функции эпифиза на различные физиологические показатели организма крыс (АОС, перестройки иммуннореактивности, половое созревание, продолжительность жизни).

Материалы и методы

Работа выполнена с использованием приборно-аналитической базы Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН.

В исследовании на крысах ЛИО (Ленинградский институт онкологии) было проведено экспериментальное моделирование гипо- и гиперфункции эпифиза, вызванных воздействием постоянного освещения и постоянной темноты соответственно. В первой серии экспериментов беременные самки содержались в условиях стандартного (12/12) и постоянного освещения (750 лк). Потомство от самок первой группы разделили на две подгруппы и содержали при стандартном (LD/LD; контроль) и постоянном (LD/LL) освещении. Крыс от самок второй группы после рождения оставили при постоянном освещении (LL/LL). Во второй серии исследований крысы начиная с возраста 25 дней находились в условиях стандартного режима освещения (12 часов

свет/12 часов темнота, LD, контроль), при постоянном освещении (LL, 750 люкс) и при постоянной темноте (DD).

Образцы тканей печени и кровь отбирали после декапитации у крыс в группах LD/LD, LD/LL и LL/LL в 3 месяца (n = 5 в каждой группе) и у животных групп LD, LL и DD в возрасте 6, 12, 18 и 24 месяца (n = 5 в каждой группе). Активность АОФ измеряли спектрофотометрически: супероксиддисмутазы (СОД) – по модифицированной адренохромной методике [Misra, Fridovich, 1972] и каталазы – по количеству разложенной H₂O₂ [Bears, Sizer, 1952]. Концентрацию витаминов А и Е определяли методом ВЭЖХ [Скурихин, Двинская, 1989]. Лейкоцитарную формулу и количество лейкоцитов в крови подсчитывали общепринятым способом [Справочник..., 1975], активность щелочной фосфатазы (ЩФ) – методом одновременного азосочетания по М. Берстону [Берстон, 1965] с использованием компьютерной системы анализа изображений с цветной цифровой видеокамерой и программным обеспечением «Видеотест». Оценивали скорость полового созревания у самцов крыс. Рассчитывали среднюю продолжительность жизни (СПЖ), СПЖ последних 10 % крыс и максимальную продолжительность жизни (МПЖ) животных. Общее количество крыс, использованных для оценки показателей старения, составило 158 особей.

Числовые данные обрабатывали с использованием общепринятых методов вариационной статистики: при сравнении групп применяли непараметрические критерии, для оценки степени влияния факторов на изученные показатели использовали дисперсионный анализ. Оценку различий в динамике полового созревания и смертности проводили с использованием критерия хи-квадрат [Коросов, Горбач, 2007].

Работа выполнена с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным и правил проведения работ с использованием экспериментальных животных [Этическая..., 2005].

Результаты и обсуждение

В результате проведенных экспериментов было установлено, что отсутствие фотопериодизма при постоянном освещении оказывало модулирующий эффект на изученные показатели в зависимости от того, в каком периоде онтогенеза начиналось его воздействие. Угнетение синтетической функции эпифиза у самок в период беременности (LL/LL) или у крысят с момента рождения (LD/LL) приводило к однопавленным изменениям активности антиокси-

дантных ферментов, хотя их выраженность различалась (рис. 1: А). При этом постоянное освещение вызывало рассогласование сопряженных изменений активности АОФ в печени у крыс в 3-месячном возрасте, что проявлялось в значительном снижении активности СОД с параллельным повышением активности каталазы.

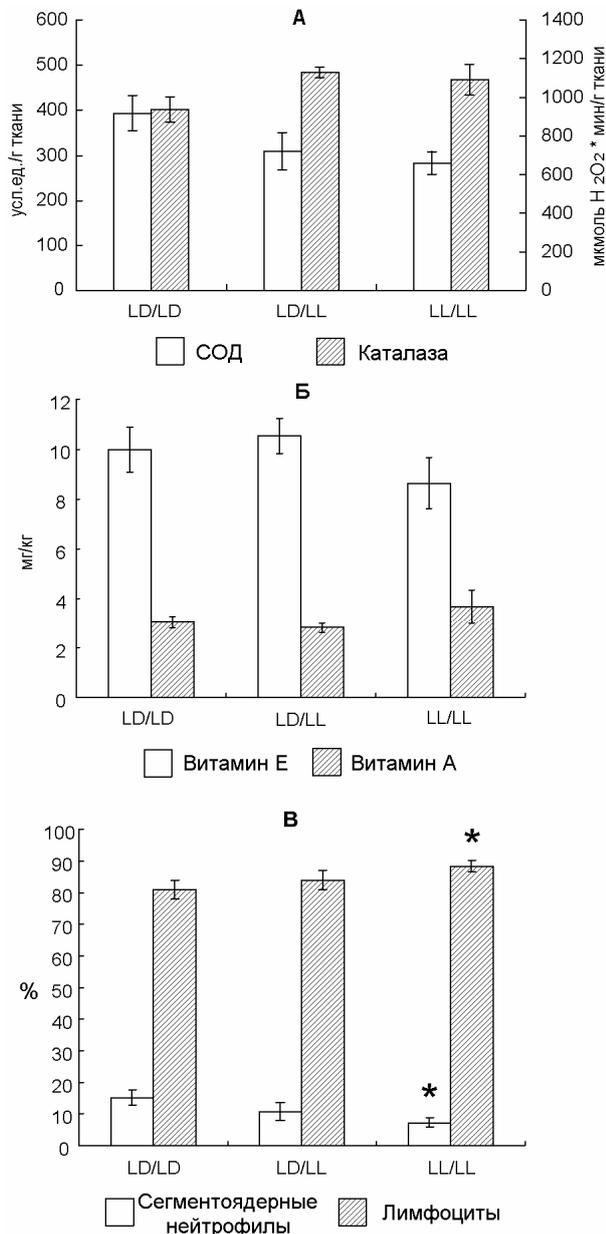


Рис. 1. Влияние световых режимов на активность АОФ (А) и уровень витаминов (Б) в печени и на показатели крови (В) у 3-месячных крыс (M ± m)

Условные обозначения: ось абсцисс NL/NL, LD/LD, LL/LL – беременные самки и их потомство с момента рождения содержались при естественном, стандартном и постоянном освещении соответственно, LD/LL – беременные самки содержались при стандартном освещении, а их потомство – при постоянном освещении с момента рождения; * – изменения достоверны по сравнению животными, которые содержались в группе LD/LD (p < 0,05)

Изменения коснулись и неферментативного компонента АОС, так как подавление синтеза мелатонина – антиоксиданта, способного непосредственно взаимодействовать с АФК, – отражается на уровне других низкомолекулярных антиоксидантов. Нами было установлено, что концентрация витамина Е у крыс, находившихся в группе LL/LL, была ниже по сравнению с остальными группами. В свою очередь, это привело к увеличению концентрации в печени другого неферментативного антиоксиданта – витамина А, взаимовлияние которого с токоферолом хорошо известно (рис. 1: Б). Такие компенсаторные отношения между токоферолом и ретинолом наиболее отчетливо отражает их содержание в печени животных исследованных групп.

Согласно данным литературы, воздействие света является десинхронизирующим фактором, вызывающим существенные изменения разных систем организма, в том числе и иммунной [Арушанян, 2000]. В нашем исследовании отмечено снижение в крови уровня сегментоядерных нейтрофилов и увеличение доли лимфоцитов у 3-месячных крыс, находившихся при постоянном освещении в период внутриутробного развития (LL/LL) и с момента рождения (LD/LL) по сравнению с крысами, содержавшимися при стандартном освещении (рис. 1: В), причем у животных в группе LL/LL изменения данных показателей были более существенные.

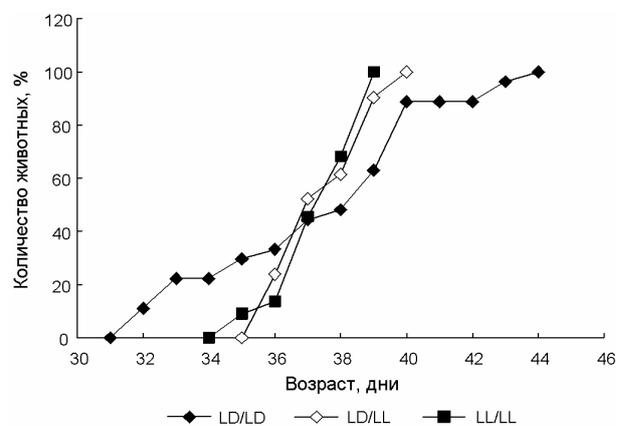


Рис. 2. Влияние постоянного освещения на динамику полового созревания самцов крыс

Условные обозначения как на рис. 1

Нахождение животных в период внутриутробного развития и с момента рождения при постоянном освещении практически не отразилось на половом созревании самцов (рис. 2). Однако необходимо отметить, что у крыс в группе LL/LL становление половой функции происходит несколько раньше, нежели у животных в группе LD/LD.

Подводя итог первой серии экспериментов, необходимо отметить, что отсутствие фотопериода при постоянном освещении в период эмбрионального развития и с момента рождения крыс нарушает постнатальное развитие исследованных физиологических систем. При этом более чувствительными к изменениям светового режима оказались крысы в пренатальный период. Очевидно, основной причиной таких изменений является нарушение суточного ритма синтеза мелатонина эпифизом у беременных и лактирующих самок. По данным литературы, значительное влияние на циклические колебания мелатонина в крови у крыс оказывает функциональное состояние матери [Calvo, Voysa, 1984]. На этапе эмбрионального развития информация о световых режимах передается плоду от беременной самки посредством мелатонина, проникающего через плацентарный барьер [Reppert et al., 1989]. В период новорожденности, когда эпифиз функционирует еще слабо, сильное влияние оказывает мелатонин, который поступает с молоком матери [Rowe, Kennaway, 2002]. Участие материнских суточных ритмов в образовании и развитии циркадианной системы у их потомства было продемонстрировано на крысах [Reppert, Schwartz, 1986] и хомяках [Davis, Gorski, 1988] при разрушении у матери супрахиазматических ядер (СХЯ). Повреждение СХЯ на ранних стадиях беременности самок крыс (седьмой день) приводило к нарушению нормального ритма активности N-ацетилтрансферазы (N-АТ) в эпифизе у 10-дневных новорожденных крыс. У них динамика активности N-АТ не имела значительных суточных колебаний, тогда как у животных, рожденных ложнооперированными самками и выращенных самками с повреждением СХЯ, был отмечен нормальный суточный ритм активности N-АТ [Reppert et al., 1989].

Во второй серии экспериментов нами были исследованы эффекты режимов постоянного освещения и световой депривации, воздействие которых начиналось с периода полового созревания (25 дней), на возрастную динамику изученных показателей. Прежде всего изменения затронули антиоксидантную систему, так как мелатонин способен непосредственно улавливать свободные радикалы или регулировать активность АОФ в результате воздействия на генетический аппарат клетки [Allegra et al., 2003; Rodrigues et al., 2004]. При старении у контрольных крыс (стандартное освещение, LD) в печени было выявлено рассогласование функционирования сопряженных антиоксидантных ферментов – при снижении активности одного фермента активность другого повышалась, и наоборот. Так, активность СОД была выше у стареющих и

старых животных (18 и 24 месяца соответственно) по сравнению со взрослыми (12 месяцев), тогда как активность каталазы, напротив, снижалась у крыс в возрасте 18 месяцев и оставалась на этом уровне у старых животных (рис. 3).

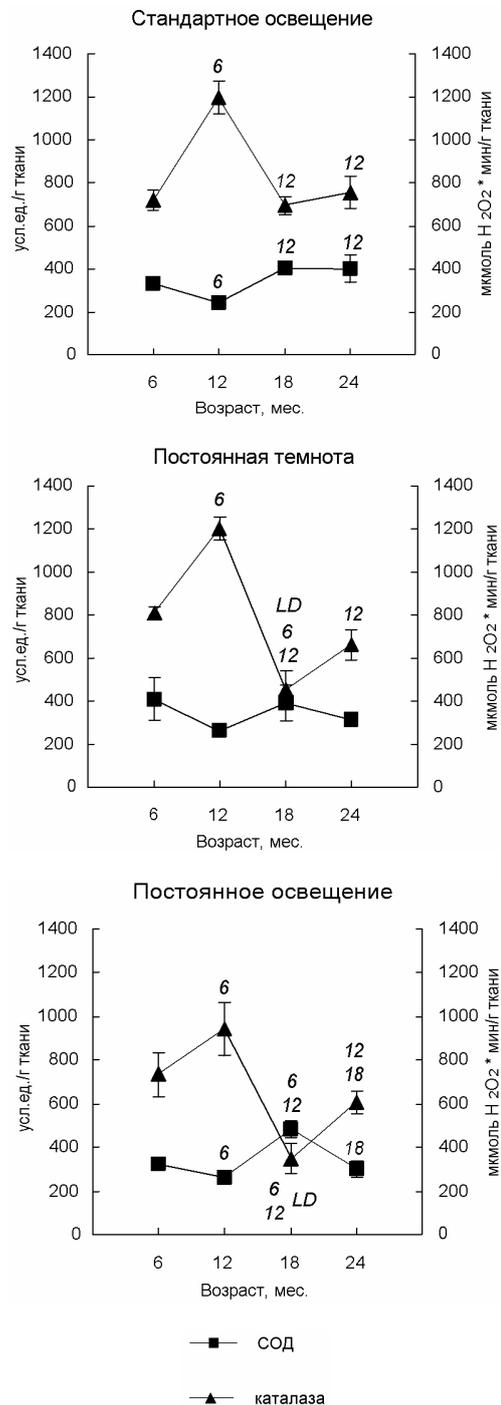


Рис. 3. Возрастная динамика активности АОФ в печени крыс при различных световых режимах ($M \pm m$)
Условные обозначения: LD – изменения достоверны по сравнению с животными, которые содержались при стандартном освещении ($p < 0,05$); 6, 12, 18 – изменения достоверны по сравнению с 6-, 12- и 18-месячными животными, содержащимися при одинаковых световых режимах ($p < 0,05$)

Крысы, содержащиеся при постоянном освещении (LL), имели максимальное рассогласование сопряженных изменений активности АОФ в печени. Повышение активности СОД в этом органе у 18-месячных крыс наблюдалось на фоне значительного снижения активности каталазы. При этом уровень активности этого фермента был достоверно ниже, чем у животных, находившихся в стандартных условиях освещения. Воздействие постоянной темноты (DD) в отличие от постоянного освещения способствует усилению работы эпифиза и приводит к увеличению синтеза мелатонина этой железой [Simonneaux, Ribelayga, 2003]. Однако возрастная динамика активности АОФ в печени, обнаруженная при воздействии постоянной темноты, была идентична той, которая наблюдалась у крыс, находившихся при постоянном освещении. Кроме того, воздействие DD режима, так же как и LL режима, приводило к снижению каталазы в печени стареющих животных по сравнению с крысами в группе LD (рис. 3). Вероятно, в LL и DD световых условиях определяющим фактором являлось не изменение концентрации мелатонина (снижение и увеличение соответственно), а отсутствие суточной периодичности его синтеза.

Несмотря на то что крысы в течение всей жизни содержались либо в условиях отсутствия чередования света и темноты (LL и DD), либо при регулярно чередующемся освещении (12/12, LD), для изученных нами ферментов в печени зарегистрирована сезонная цикличность изменений. Фактор «сезон» на 15,45 % определял изменчивость активности СОД и на 23,78 % активности каталазы (рис. 4).

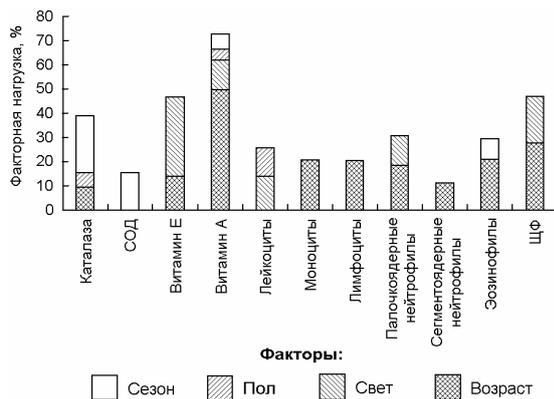


Рис. 4. Влияние изученных факторов на активность АОФ, уровень витаминов и показатели крови

Изменения неферментативного компонента АОС (концентрация витаминов Е и А) в печени крыс скорее зависели от уровня мелатонина, синтезируемого эпифизом, чем от его фотопериодических колебаний. Концентрация витами-

на Е в печени 6-месячных крыс, находившихся при постоянном освещении (LL), была значительно выше (рис. 5), а уровень витамина А [Ильина и др., 2005] у животных при постоянной темноте (DD) ниже по сравнению с другими группами, в которых содержание токоферола и ретинола практически не различалось. По всей видимости, нарушение синтеза мелатонина эпифизом компенсировалось изменением уровня важнейших неферментативных антиоксидантов: либо накоплением витамина Е при LL, либо повышением витамина А при DD режимах. Кроме того, были выявлены онтогенетические особенности распределения витаминов в печени у крыс. Так, независимо от режима освещения уровень ретинола у стареющих крыс (18 месяцев) был выше по сравнению с предыдущими возрастными периодами. По данным дисперсионного анализа (рис. 4), концентрация витамина А в большей степени (49,81 %) зависела от возраста животных, чем от светового режима, который более значительно (32,71 %) влиял на уровень витамина Е.

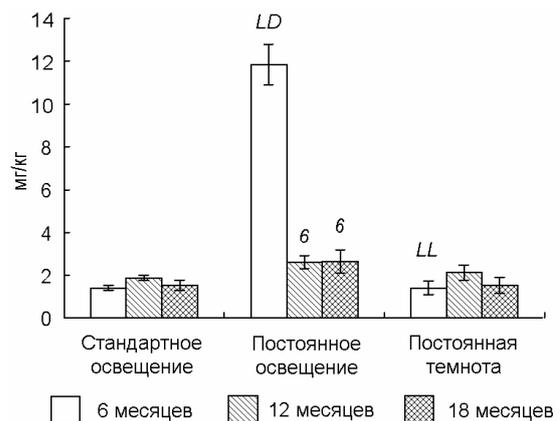


Рис. 5. Влияние световых режимов на уровень витамина Е в печени крыс различных возрастов

Условные обозначения: LL – изменения достоверны по сравнению с животными, которые содержались при стандартном и постоянном освещении соответственно ($p < 0,05$); остальные обозначения как на рис. 3

Данные литературы о влиянии гипо- и гиперфункции эпифиза на содержание в крови основных клеточных элементов – лимфоцитов и нейтрофилов – противоречивы. По некоторым из них, количество лимфоцитов снижается [Чазов, Исаченков, 1974], а по другим – не изменяется [Козинец и др., 2001]. Мы показали, что изменение количества отдельных типов клеток иммунной системы в большей степени определяется фактором «возраст» (рис. 4). В крови у крыс в возрасте от 6 до 18 месяцев при стандартном световом режиме (LD) (рис. 6) поддерживается физиологический уровень лимфоцитов и сег-

ментоядерных нейтрофилов ($74,0 \pm 3,65\%$ и $13,8 \pm 2,63\%$ соответственно). У старых животных (24 месяца) происходят значительные изменения клеточного состава крови вследствие уменьшения до минимума содержания лимфоцитов ($44,4 \pm 6,95\%$) и, наоборот, возрастания до максимума нейтрофилов ($31,6 \pm 6,55\%$). Содержание животных в режимах с отсутствием чередования света и темноты (LL и DD) оказывало сходный эффект на уровень клеток крови этих типов (рис. 6). Начиная уже с 6-месячного возраста крыс содержание лимфоцитов в их крови находится на более низком, а нейтрофилов – на более высоком уровне. Количество лимфоцитов у 6-месячных крыс в группе LL составляет $64,4 \pm 2,98\%$ и в группе DD – $66,20 \pm 5,10\%$. Учитывая структурно-временную организацию кроветворной и иммунной системы, можно предположить, что наблюдаемые изменения могут быть связаны с состоянием центральных механизмов регуляции, в том числе и эпифиза как эндогенного синхронизатора циркадианных и сезонных ритмов. При постоянном освещении (LL) или световой депривации (DD) большое значение имеет отсутствие периодичности в световом режиме, играющем важную роль в приспособительных реакциях организма к внешней среде. Кроме того, выявленное нами влияние факторов «пол животных» (11,45 %) и «свет» (14,05 %) на уровень лейкоцитов (рис. 4) свидетельствует о необходимости также учитывать и особенности эндокрино-метаболического статуса, обусловленного столь различными режимами, как LL и DD, и высокой чувствительностью лейкопоэза к эндокринным влияниям [Узенбаева и др., 2006].

Известно, что в системе защитных реакций организма важное место принадлежит нейтрофильным лейкоцитам, обладающим набором биологически активных соединений и ферментов. Среди них большое значение имеет ЩФ – фермент из класса гидролаз. Литературные данные о сдвигах фосфатазной активности на поздних этапах постнатального онтогенеза немногочисленны и довольно противоречивы [Цитохимические..., 1973; Дягилева и др., 2001; Козинец и др., 2001]. Наши исследования показали, что активность ЩФ в лейкоцитах у крыс повышается в процессе старения организма (рис. 7). Степень увеличения с возрастом уровня фосфатазы различается в зависимости от освещенности среды следующим образом. В условиях стандартного режима освещения (LD) она нарастает только у старых крыс (24 месяца). Раньше всего возрастное повышение активности фермента отмечено у крыс при постоянном освещении (LL), при котором уже у 12-месячных крыс она достигает наиболее высоких, по сравнению с другими световыми условиями, величин и

существенно увеличивается в последующие возрастные периоды – у 18- и еще больше – у 24-месячных животных. При световой депривации (DD) возрастная динамика аналогична таковой при LL режиме с той лишь разницей, что интенсивность цитохимической реакции в 12 и 18 месяцев ниже, чем в соответствующей группе при постоянном освещении (рис. 7). Согласно статистическим расчетам, дисперсия активности ЩФ на 27,72 % определялась фактором «возраст» и на 19,42 % – фактором «свет» (рис. 4).

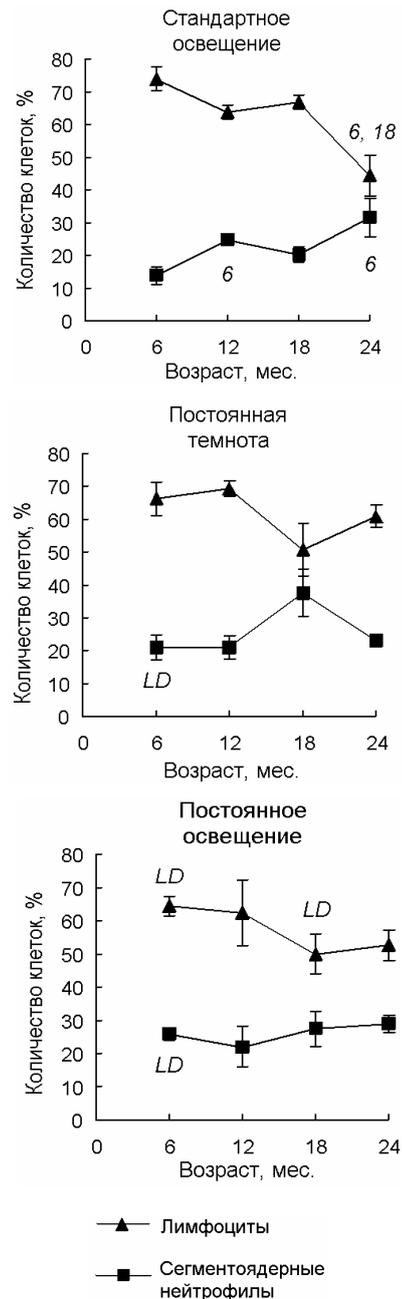


Рис. 6. Возрастная динамика количества лимфоцитов и нейтрофилов в периферической крови крыс при различных режимах освещения. Условные обозначения как на рис. 3

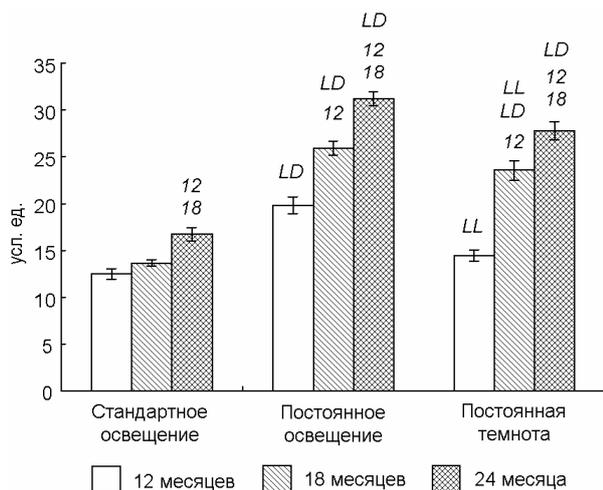


Рис. 7. Влияние световых режимов на активность щелочной фосфатазы в нейтрофилах периферической крови крыс различных возрастов

Условные обозначения как на рис. 3–6

Отмеченное нами повышение фосфатазной активности при старении может быть обусловлено патологическими изменениями в организме [Дягилева и др., 2001]. В экспериментальных исследованиях и клинических наблюдениях установлено, что у лабораторных животных и человека увеличение ее характерно для заболеваний, сопровождающихся воспалительно-деструктивными процессами, и для канцерогенеза [Соловьева и др., 1973; Шубич, Нагоев, 1980]. Результаты нашего исследования свидетельствуют о негативном влиянии на активность щелочной фосфатазы в нейтрофилах крови крыс как постоянного освещения, так и постоянной темноты. По-видимому, неблагоприятным фактором при отсутствии фотопериодизма является более раннее, по сравнению с другими режимами, нарушение гомеостаза организма, которое сопровождается увеличением активности ЩФ в лейкоцитах крови крыс. Нельзя исключить и действие других факторов, в частности гормонов, которые, как известно, оказывают существенное влияние на активность лейкоцитарной ЩФ [Узенбаева и др., 2008].

Выявленные нами эффекты постоянного освещения и постоянной темноты на физиологические параметры могут быть связаны с изменением синтеза мелатонина пинеальной железой. Этот гормон играет существенную роль в регуляции полового созревания, репродуктивных циклов, стрессорной реакции и иммунного ответа [Maestroni, 2001; Guerrero, Reiter, 2002; Nelson, 2004; Esquifino, Pandi-Perumal et al., 2004]. Несмотря на обилие работ о влиянии света, комплексных исследо-

ваний в этой области не проводится, а уделяется внимание какой-либо одной физиологической функции. Однако следует отметить, что, с одной стороны, для синтеза половых стероидных гормонов необходимы активные формы кислорода (АФК), а с другой, метаболические превращения этих гормонов связаны с генерацией АФК. Таким образом, организм вынужден тонко регулировать уровень АФК, поскольку его значительное снижение из-за высокой активности АОФ тормозит процесс полового созревания млекопитающих и одновременно приводит к замедлению процесса старения.

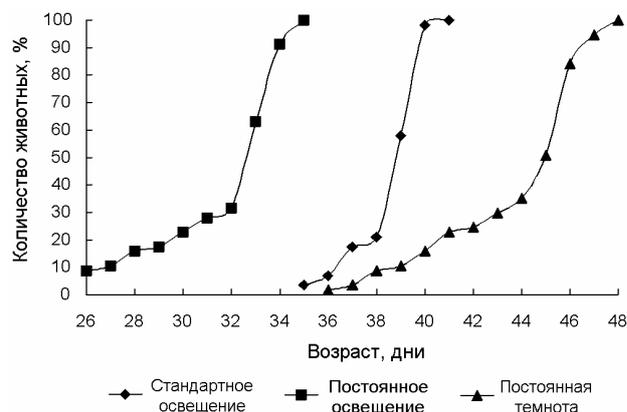


Рис. 8. Влияние световых режимов на динамику полового созревания самцов крыс

Влияние различных режимов освещения на продолжительность жизни самцов крыс

	Световой режим		
	Стандартное освещение (LD)	Постоянное освещение (LL)	Световая депривация (DD)
Количество крыс, шт.	57	50	51
СПЖ, сут	644 ± 34,0	580 ± 35,5	652 ± 32,5
МПЖ, сут	1045	1005	1017
СПЖ последних 10 % крыс, сут	999 ± 11,5	987 ± 13,0	987 ± 13,0

В нашем исследовании установлено, что постоянное освещение, воздействие которого началось с 25-дневного возраста крыс, ускоряло половое созревание самцов, а световая депривация, напротив, замедляла его (рис. 8). При этом у животных в группе LL СПЖ и МПЖ были ниже, а в группе DD СПЖ выше, чем у крыс в стандартных световых условиях (табл.). Кроме того, у самцов в условиях постоянного освещения укорачивались фазы прогрессивного и стабильного роста и отмечалось раннее наступление старческого периода [Vinogradova et al., 2009]. Содержание

крыс при постоянном освещении сопровождалось более ранним развитием доброкачественных и злокачественных новообразований, прежде всего в органах репродуктивной системы, а также различных воспалительных и иных патологических процессов, тогда как световая депривация препятствовала их развитию по сравнению с контрольными особями [Vinogradova et al., 2009].

Заключение

Таким образом, у лабораторных крыс показана взаимосвязь между состоянием антиоксидантной системы, некоторыми параметрами иммунной системы, скоростью полового созревания и продолжительностью жизни. Изменение уровня синтеза мелатонина с помощью постоянного освещения приводит к взаимосвязанным перестройкам в функционировании исследованных физиологических систем. Усиление активности антиоксидантной системы ведет к увеличению продолжительности жизни, но одновременно с этим – к замедлению полового созревания животных и изменению морфо-функциональных свойств лейкоцитов крови. Изменение про/антиоксидантного баланса отражается и на составе иммунокомпетентных клеток в крови, для осуществления функции которых также необходимы активные формы кислорода.

Несмотря на противоположное влияние постоянного освещения и постоянной темноты на синтез мелатонина эпифизом многие эффекты двух режимов совпадают. Отсутствие суточного чередования света и темноты нарушает функционирование только тех физиологических показателей, которые подчинены циркадианной ритмике в организме (активность АОФ, уровень отдельных типов клеток иммунной системы), тогда как изменение параметров, не подчиненных суточным колебаниям (концентрация витаминов, половое созревание и старение), зависит от уровня эпифизарного мелатонина.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 8050), РФФИ (№ 12-04-31368), гранта Президента НШ-1642.2012.4, ФЦП ГК № 02.740.11.0700.

Литература

Арушанян Э. Б. Хронофармакология. Ставрополь: СГМА, 2000. 422 с.
Берстон М. Гистохимия ферментов. М.: Мир, 1965. 464 с.

Дягилева О. А., Быкова И. А., Наумова И. Н., Шишина Р. Н., Савенко Т. А., Потапова С. Г., Катанов Н. И., Рогинский В. В., Ипполитов В. П., Соколова М. А., Козинец Г. И. Информативность цитохимических реакций на щелочную фосфатазу и миелопероксидазу для оценки функционального состояния нейтрофилов при ряде заболеваний // Гематология и трансфузиология. 2001. Т. 46, № 4. С. 38–41.

Ильина Т. Н., Руоколайнен Т. Р., Баишникова И. В. Возрастные изменения содержания витаминов А и Е в печени и сердце крыс при различных режимах освещенности и влиянии геропротекторов // Мед. академ. журнал. 2005. Т. 5, № 3, Приложение 7. С. 27–29.

Козинец Г. И., Высоцкий В. В., Погорелов В. М., Еровиченков А. А., Малов В. А. Кровь и инфекция. М.: Триада-фарм, 2001. 456 с.

Коросов А. В., Горбач В. В. Компьютерная обработка биологических данных: метод. пособие. Петрозаводск: ПетрГУ, 2007. 76 с.

Скурихин В. Н., Двинская Л. М. Определение α-токоферола и ретинола в плазме крови сельскохозяйственных животных методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии // Сельскохозяйственная биология. 1989. № 4. С. 127–129.

Соловьева Е. А., Зубрихина Г. И., Кушнарева Н. И., Протасова А. К. Ферментативная активность гранулоцитов периферической крови у больных злокачественными новообразованиями // Вопр. онкол. 1973. Т. 19, № 6. С. 22–24.

Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / Под ред. Е. А. Кост. М.: Медицина, 1975. 583 с.

Узенбаева Л. Б., Виноградова И. А., Голубева А. Г., Нюппиева М. Г., Илюха В. А. Влияние мелатонина и эпиталона на состав лейкоцитарной формулы и активность щелочной фосфатазы лейкоцитов крови крыс при разных режимах освещения в онтогенезе // Успехи геронтол. 2008. Т. 21, № 3. С. 394–401.

Узенбаева Л. Б., Виноградова И. А., Голубева А. Г., Чуров А. В., Илюха В. А. Возрастные изменения лейкоцитарной формулы и морфометрических параметров больших гранулярных лимфоцитов крови крыс при различных режимах освещения // Успехи геронтологии. 2006. Вып. 19. С. 79–84.

Цитохимические исследования лейкоцитов. Возрастные колебания цитохимических показателей / Под ред. В. Б. Лецкого. Л., 1973. С. 32–33.

Чазов Е. И., Исаченков В. А. Эпифиз: место и роль в системе нейроэндокринной регуляции. М.: Наука, 1974. С. 121–155.

Шубич М. Г., Нагоев Б. С. Щелочная фосфатаза лейкоцитов в норме и патологии. М.: Медицина, 1980. 224 с.

Этическая экспертиза биомедицинских исследований. Практические рекомендации / Под ред. Ю. Б. Белоусова. Москва, 2005. 156 с.

Albarran M. T., Lopez-Burillo S., Pablos M. I., Reiter R. J., Agapito M. T. Endogenous rhythms of melatonin, total antioxidant status and superoxide dismutase activity in several tissues of chick and their inhibition by light // J. Pineal Res. 2001. Vol. 30. P. 227–233.

Allegra M., Reiter R. J., Tan D.-X., Gentile C., Tesoriere L., Livrea M. A. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species // J. Pineal Res. 2003. 34. P. 1–10.

Anisimov V. N. Light pollution, reproductive function and cancer risk // Neuroendocrinol. Lett. 2006. Vol. 27, N 1–2. P. 35–52.

Bears R. F., Sizes I. N. A spectral method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase // J. Biol. Chem. 1952. Vol. 195, N 1. P. 133–140.

Calvo J., Boya J. Postnatal evolution of the rat pineal gland: light microscopy // J. Anat. 1984. Vol. 138, N 1. P. 45–53.

Davis F. C., Gorski R. A. Development of hamster circadian rhythms: role of the maternal suprachiasmatic nucleus // J. Comp. Physiol. A. 1988. Vol. 162. P. 601–610.

Esquifino A. I., Pandi-Perumal S. R., Cardinali D. P. Circadian organization of the immune response: A role for melatonin // Clin. Appl. Immunol. Rev. 2004. Vol. 4. P. 423–433.

Guerrero J. M., Reiter R. J. Melatonin immune system relationship // Curr. Top. Med. Chem. 2002. Vol. 2. P. 167–179.

Maestroni G. J. The immunotherapeutic potential of melatonin // Expert Opin. Investig. Drugs. 2001. Vol. 10. P. 467–476.

Misra H. H., Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase // J. Biol. Chem. 1972. Vol. 247. P. 3170–3175.

Nelson R. J. Seasonal immune function and sickness responses // Trends Immunol. 2004. Vol. 25. P. 187–192.

Pablos M. I., Reiter R. J., Ortiz G. G., Guerrero J. M., Agapito M. T., Ghuang J. I., Sewerynek E. Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick, their inhibition by light // Neurochem. Int. 1998. Vol. 32. P. 69–75.

Reppert S. M., Schwartz W. J. Maternal suprachiasmatic nuclei are necessary for maternal coordination of the developing circadian system // J. Neurosci. 1986. Vol. 6. P. 2724–2729.

Reppert S. M., Weaver D. R., Rivkees S. A. Prenatal function and entrainment of a circadian clock // Res. Perinat. Med. 1989. Vol. 9. P. 25–44.

Rodrigues C., Mayo J. C., Sainz R. M., Antolin I., Herrera F., Martin V., Reiter R. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin // J. Pineal Res. 2004. Vol. 36. P. 1–9.

Rowe A. S., Kennaway D. J. Melatonin in rat milk and the likelihood of its role in postnatal maternal entrainment of rhythms // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2002. Vol. 282. P. 797–804.

Simonneaux V., Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters // Pharmacological Reviews. 2003. Vol. 55, N 2. P. 325–395.

Tomas-Zapico C., Coto-Montes A., Martinez-Fraga J., Rodriguez-Colunga M. J., Tolivia D. Effects of continuous light exposure on antioxidant enzymes, porphyrin enzymes and cellular damage in the Harderian gland of Syrian hamster // J. Pineal Res. 2003. Vol. 34. P. 60–68.

Tuney I., Munoz M. C., Feijoo M., Valdelvira M. E., Munoz-Castaneda J. R., Montilla P. Melatonin effect on renal oxidative stress under constant light exposure // Cell Biochem. Funct. 2003. Vol. 21. P. 35–40.

Vinogradova I. A., Anisimov V. N., Bukalev A. V., Semenchenko A. V., Zabezhinski M. A. Circadian disruption induced by light-at-night accelerates aging and promotes tumorigenesis in rat // Aging. 2009. Vol. 1, N 10. P. 855–865.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Хижкин Евгений Александрович

младший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: hizhkin84@mail.ru
тел.: (8142) 573107

Юнаш Виктория Дмитриевна

старший преподаватель кафедры фармакологии,
организации и экономики фармации
с курсами микробиологии и гигиены
медицинского факультета, к. м. н.
Петрозаводский государственный университет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: yunashvd@yandex.ru
тел.: (8142) 769871

Узенбаева Людмила Борисовна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: uzenb@bio.krc.karelia.ru
тел.: (8142) 573107

Khizhkin, Evgueny

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: hizhkin84@mail.ru
tel.: (8142) 573107

Yunash, Viktoria

Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: yunashvd@yandex.ru
tel.: (8142) 769871

Uzenbaeva, Lyudmila

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: uzenb@bio.krc.karelia.ru
tel.: (8142) 573107

Виноградова Ирина Анатольевна

зав. кафедрой фармакологии,
организации и экономики фармации
с курсами микробиологии и гигиены
медицинского факультета, д. м. н.
Петрозаводский государственный университет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: iri89569627@yandex.ru
тел.: (8142) 769871

Илюха Виктор Александрович

зав. лаб. экологической
физиологии животных, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: ilyukha@bio.krc.karelia.ru
тел.: (8142) 573107

Ильина Татьяна Николаевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: ilyina@bio.krc.karelia.ru
тел.: (8142) 573107

Баранова Юлия Павловна

старший преподаватель кафедры фармакологии,
организации и экономики фармации с курсами
микробиологии и гигиены медицинского факультета
Петрозаводский государственный университет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: piwitepisma@list.ru
тел.: (8142) 769871

Морозов Артем Владимирович

ведущий биолог
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: artem.morozow@yandex.ru
тел.: (8142) 573107

Vinogradova, Irina

Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: iri89569627@yandex.ru
tel.: (8142) 769871

Ilyukha, Victor

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: ilyukha@bio.krc.karelia.ru
tel.: (8142) 573107

Ilyina, Tatyana

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: ilyina@bio.krc.karelia.ru
tel.: (8142) 573107

Baranova, Yulia

Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: piwitepisma@list.ru
tel.: (8142) 769871

Morozov, Artyom

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: artem.morozow@yandex.ru
tel.: (8142) 573107

УДК 582.475:630*160.22:630*181.34

НАКОПЛЕНИЕ L-АРГИНИНА В ХВОЕ ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ ПРИ РЕГУЛЯЦИИ АЗОТНОГО И БОРНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ

Н. П. Чернобровкина, Е. В. Робонен, А. К. Морозов, Т. Н. Макарова

Институт леса Карельского научного центра РАН

Изучены показатели роста, содержания азота, бора и свободных аминокислот в хвое 5-летней ели европейской (*Picea abies* L.) в связи с различным обеспечением растений азотом и бором в условиях оптимума других элементов минерального питания. Оптимальным для роста растений было содержание в хвое азота 1,8 % и бора 280 мкг·г⁻¹ сухого вещества. Содержание L-аргинина в хвое увеличивалось в десятки раз при внесении десятикратной, по сравнению с оптимальной, дозы азота. Установлено многократное повышение количества этой аминокислоты в хвое при использовании высокой дозы бора и низкой – азота.

Ключевые слова: *Picea abies* (L.), азот, бор, аминокислоты, L-аргинин.

N. P. Chernobrovkina, E. V. Robonen, A. K. Morozov, T. N. Makarova. ACCUMULATION OF L-ARGININE IN NEEDLES OF NORWAY SPRUCE WITH REGULATED NITROGEN AND BORON AVAILABILITY

The parameters of growth, nitrogen, boron and free amino acid content in the needles of 5-year-old Norway spruce (*Picea abies* L.) were studied in relation with nitrogen and boron availability to the plants, the supply of other nutrients being optimal. Growth of the plants was optimized by a nitrogen content of 1.8 % and a boron content of 280 µg·g⁻¹ dry weight in the needles. L-arginine content in the needles increased tens of times upon application of a ten-fold, compared with the optimum, nitrogen dose. The amount of this amino acid in the needles multiplied when the plants were treated with a high dose of boron combined with a low dose of nitrogen.

Key words: *Picea abies* (L.), nitrogen, boron, amino acids, L-arginine.

Введение

Древесная зелень является источником большого числа органических соединений, до 30 % их составляют водорастворимые фракции, включающие свободные аминокислоты, которые применяются для лечения многих заболеваний человека и животных. Повышение в растительном сырье уровня доступных для усвоения аминокислот, обладающих высокой биологической активностью, и изменение их количественного соотношения в соответствии с кон-

кретными задачами можно осуществлять путем регуляции минерального питания растений. Разбалансированность минерального питания хвойных растений приводит к изменению состава свободных аминокислот в их тканях [Nasholm, Ericsson, 1990; Gezelius, Nasholm, 1993; Huhn, Schulz, 1996; Engvild, 2005]. При избытке азота, а также при дефиците фосфора у хвойных происходит накопление аминокислот с высоким содержанием азота – аргинина, лизина и орнитина. Влияние микроэлементов, в частности бора, на метаболизм растений интенсивно

исследуется [Ferrol, Donaire, 1992; Cakmak et al., 1995; Kobayashi et al., 1996; Camacho-Cristobal et al., 2008]. Ранее нами было показано стимулирующее влияние бора на накопление L-аргинина у сосны обыкновенной на фоне высокого обеспечения азотом и дефицита других элементов питания [Чернобровкина и др., 2010]. Разработка технологии повышения уровня L-аргинина у хвойных растений открывает возможности использовать хвою в фармацевтической промышленности в качестве сырья для получения этой аминокислоты и в ветеринарии в качестве кормовых добавок животным. Следует отметить, что данная аминокислота имеет большое значение для функциональной активности органов и тканей человека и животных [Западнюк и др., 1982; Дахно, 2000; Ульянов и др., 2010; Cengiz, Kucukersan, 2010]. Установлено значение L-аргинина как гипогликемического и антитромботического средства [Ульянов и др., 2010]. L-аргинин используется как иммуностимулятор при лечении фасциоза коров, инфекционных заболеваний бройлеров [Дахно, 2000; Cengiz, Kucukersan, 2010]. Получение L-аргинина, как и других аминокислот, осуществляют несколькими путями: с использованием биотехнологических процессов, путем химического синтеза, гидролизом природного белкового сырья [Волова, 1999]. Для производства лекарственных средств и пищевых добавок L-аргинин получают культивированием бактерии рода *Escherichia* [Рыбак и др., 2005]. Химический синтез дает рацемат – продукт, содержащий как L-, так и D-формы аминокислот, однако D-изомеры обладают токсичностью, что ограничивает возможности применения аминокислот, полученных таким способом. Производство оптически активных L-изомеров аминокислот из гидролизатов природных материалов растительного и животного происхождения связано с многоступенчатой и дорогостоящей очисткой [Волова, 1999]. Метод экстрагирования водорастворимых свободных аминокислот из растительного материала несложен и экологически безопасен.

Целью работы было исследование влияния азота и бора на накопление L-аргинина в хвое ели европейской.

Материалы и методы

Объектом исследования была 5-летняя ель европейская (*Picea abies* L.), произрастающая в условиях южной части Карелии. Супесчаные почвы характеризовались оптимальной для роста хвойных растений кислотностью (рН водн. 5,1), недостаточностью азота (0,14 % от сухой почвы) и бора (0,001 %). Сбалансированное содержа-

ние остальных элементов минерального питания (ЭМП) обеспечивали путем внесения комплексного удобрения, составленного без включения азота и бора.

В мае 2009 г. было заложено 35 вариантов опыта, которые различались обеспеченностью растений азотом и бором. В первой половине вегетационного периода трижды вносили в почву аммиачную селитру в дозах 0; 3; 10; 30; 100 г·м⁻² д. в. (N0–N100) и борную кислоту в дозах 0; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30 г·м⁻² (B0–B30). За контроль был принят вариант (N0B0), в котором азот и бор в почву не вносили. По окончании вегетационного периода, в октябре, определяли воздушно-сухую массу хвои и всего растения, включая корни, проводили анализ содержания азота, бора и аминокислот в хвое в расчете на абсолютно-сухой вес. Анализ свободных аминокислот в хвое проводили во всех вариантах азотного (N0–N100) при трех уровнях борного (B0, B1, B10) обеспечения. Фиксировали растительный материал методом лиофилизации. В работе использовано оборудование Института леса КарНЦ РАН. Химические элементы растений и почвы определяли на спектрофотолориметре КФК-3 (Загорский оптико-механический завод, Россия) и на атомно-абсорбционном спектрофотометре AA-6800 (Shimadzu, Япония). Извлечение свободных аминокислот из тканей осуществляли по методу Калинкиной и соавторов [1990], анализ содержания аминокислот в хвое проводили на автоматическом аминокислотном анализаторе AAA-339, L-аргинина – методом Сакагучи [Jesse, 1961].

Результаты и обсуждение

Внесение борной кислоты в почву в дозе 1 г·м⁻² максимально стимулировало рост растений 5-летней ели европейской при дозах азота в 10 и 30 г·м⁻² на фоне оптимального уровня других ЭМП (рис. 1: а, б). Максимум роста растений сохранялся также при дозе азота в 10 г·м⁻² и дозах борной кислоты в 3 и 10 г·м⁻², однако в этих вариантах отмечались признаки избытка бора в растениях. Максимальное увеличение сухой массы всего растения и хвои по сравнению с контролем (без внесения азота и бора) было соответственно в 3,8 и 4,0 раза. Увеличение сухой массы растений и хвои за счет оптимального внесения борной кислоты в варианте оптимума азота (N10B1) составило соответственно 44 % и 50 %. Более высокие дозы борной кислоты при всех уровнях азота оказались равнозначными или менее эффективными по сравнению с дозой в 1 г·м⁻², а доза в 30 г·м⁻²

ингибировала рост растений по сравнению с контролем при соответствующих уровнях азотного питания. Первые признаки избытка бора у растений – пожелтение кончиков хвои – отмечались при дозе борной кислоты в $3 \text{ г}\cdot\text{м}^{-2}$, при более высоких дозах хвоя приобретала желто-бурую окраску. Данные показали, что ель европейская испытывала дефицит в борном обеспечении, и эффект от внесения борной кислоты под растения зависел от обеспеченности их азотом.

Содержание азота в хвое ели было низким в контроле (N0B0) – $0,6 \%$ от сухой массы (рис. 2: а). Внесение аммиачной селитры при всех дозах борной кислоты увеличивало накопление азота в хвое, максимально до $3,5 \%$ от сухой массы (N100B1). При оптимизации борного питания ели отмечалось повышение (N0B1, N3B1) или тенденция к повышению (N100B1) содержания азота в хвое в $\%$ от сухой массы, за исключением вариантов с дозами азота в 10 и $30 \text{ г}\cdot\text{м}^{-2}$, что можно объяснить эффектом разбавления в результате значительного увеличения массы растений, поскольку в расчете на целое растение содержание азота в хвое увеличивалось и в этих двух вариантах (с 20 мг в контроле до 220 и 290 мг в вариантах N10B1 и N30B1 соответственно).

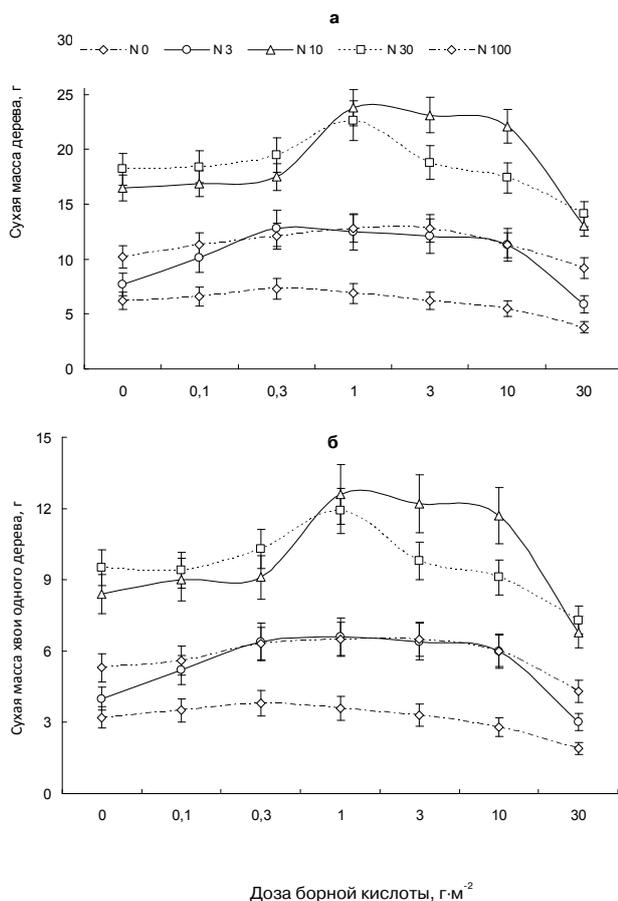


Рис. 1. Влияние обеспечения азотом и бором 5-летней ели европейской на сухую массу дерева (а) и хвои (б)

При содержании азота в хвое, равном $1,8 \%$ от сухой массы, отмечался максимум роста ели (N10B1). Ранее было показано стимулирующее влияние бора на накопление азота и у сосны обыкновенной [Чернобровкина, 2001].

Содержание бора в хвое ели в контроле составляло $110 \text{ мкг}\cdot\text{г}^{-1}$ сухого вещества (N0B0) (рис. 2: б). Уровень бора в хвое повышался с увеличением дозы внесения в почву борной кислоты при соответствующих уровнях обеспеченности растений азотом, максимально до $875 \text{ мкг}\cdot\text{г}^{-1}$ сухого вещества (N0B10). Исключением была доза борной кислоты в $1 \text{ г}\cdot\text{м}^{-2}$ в условиях токсичного влияния азота в дозе $100 \text{ г}\cdot\text{м}^{-2}$ – при ее внесении не отмечалось повышения уровня бора в хвое. При повышении доз аммиачной селитры содержание бора в хвое в расчете на сухую массу преимущественно понижалось или имело тенденцию к снижению – минимально до $44 \text{ мкг}\cdot\text{г}^{-1}$ в варианте N100B0. Внесение в почву азота и других макро- и микроэлементов под сосну обыкновенную также способствовало снижению поступ-

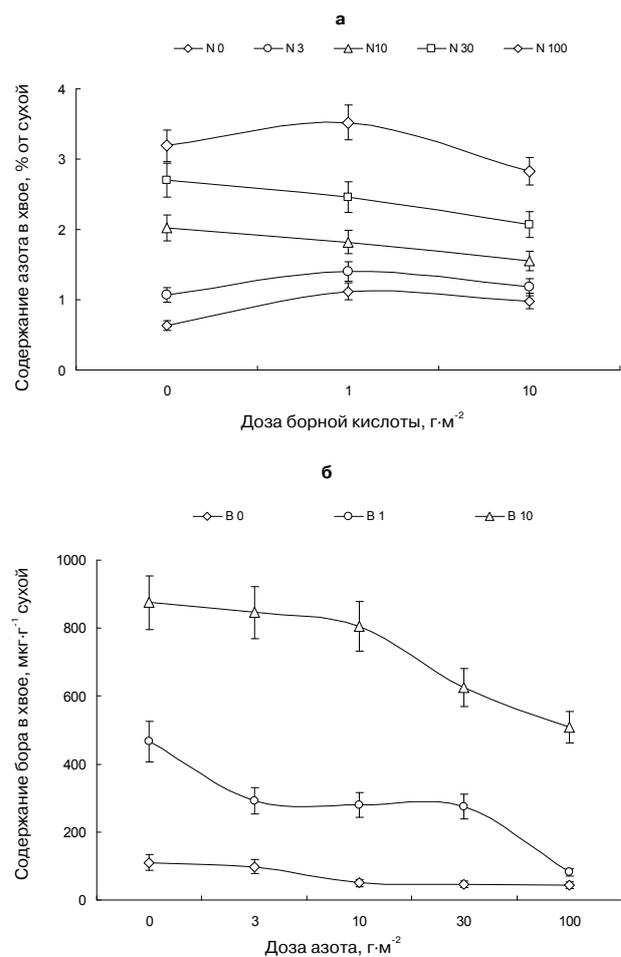


Рис. 2. Влияние обеспечения азотом и бором 5-летней ели европейской на содержание азота (а) и бора (б) в сухой хвое

ления бора в хвою [Чернобровкина и др., 2007]. В литературе отмечается, что в обеспечении бором древесных растений большое значение имеют почвенные условия – повышенное содержание в почве ионов NH_4^+ , Fe^{3+} , Al^{3+} и повышение pH почвы при известковании способствуют закреплению бора почвенными частицами [Wikner, 1983]. По нашим данным, для молодых растений ели европейской содержание бора в хвое на уровне $280 \text{ мкг}\cdot\text{г}^{-1}$ сухого вещества (N10B1) оказалось оптимальным для их роста в условиях достаточного обеспечения другими ЭМП. При содержании бора в хвое свыше $500 \text{ мкг}\cdot\text{г}^{-1}$ сухой массы отмечались признаки токсичности бора – желто-бурое окрашивание хвои.

В контроле в хвое ели европейской в осенний период содержалось 16 свободных аминокислот. Их сумма составила $1,5 \text{ мг}\cdot\text{г}^{-1}$ абсолютно сухой хвои. 57 % их массы составлял L-аргинин, который является подвижной формой азота, позволяющей регулировать содержание его минеральных форм, выполняет запасную функцию азота в хвойных растениях [Новицкая, Чикина, 1980; Gezelius, Nasholm, 1993; Huhn, Schulz, 1996]. Запасание L-аргинина в органах хвойных растений обеспечивает азотом процессы их раннего весеннего роста и сезонного развития.

Повышение доз внесения азота на всех фонах борного питания вызывало увеличение суммы свободных аминокислот в хвое, максимально в 26 раз – от $5,5 \text{ мг}\cdot\text{г}^{-1}$ сухой массы в контроле (N0B0) до $38,6 \text{ мг}\cdot\text{г}^{-1}$ сухой массы в варианте с самой высокой дозой азота и оптимальной дозой бора (N100B1) (рис. 3: а). При дозе бора, максимально стимулирующей рост ели, сумма аминокислот в хвое снижалась в 4 раза на оптимальном фоне азотного питания (N10B1). Снижение уровня свободных аминокислот в хвое происходило, предположительно, как за счет «эффекта разбавления», так и в результате включения их в состав белковых соединений.

При внесении высоких доз азота влияние бора на накопление суммы аминокислот в хвое практически не наблюдалось (N30B0; N30B1; N30B10) или было слабо отрицательным (N100B0; N100B1; N100B10). В контрольном по азоту варианте накопления аминокислот, естественно, не происходило независимо от обеспеченности бором. Интересная ситуация сложилась в варианте с первой, небольшой, дозой азота (N3B10), где сумма аминокислот в хвое под воздействием максимальной дозы бора возросла в 5 раз. Даже небольшое дополнительное обеспечение азотом ели способствовало накоплению в хвое свободных аминокис-

лот, которые не использовались в метаболических процессах, поскольку избыток бора ингибировал рост растения.

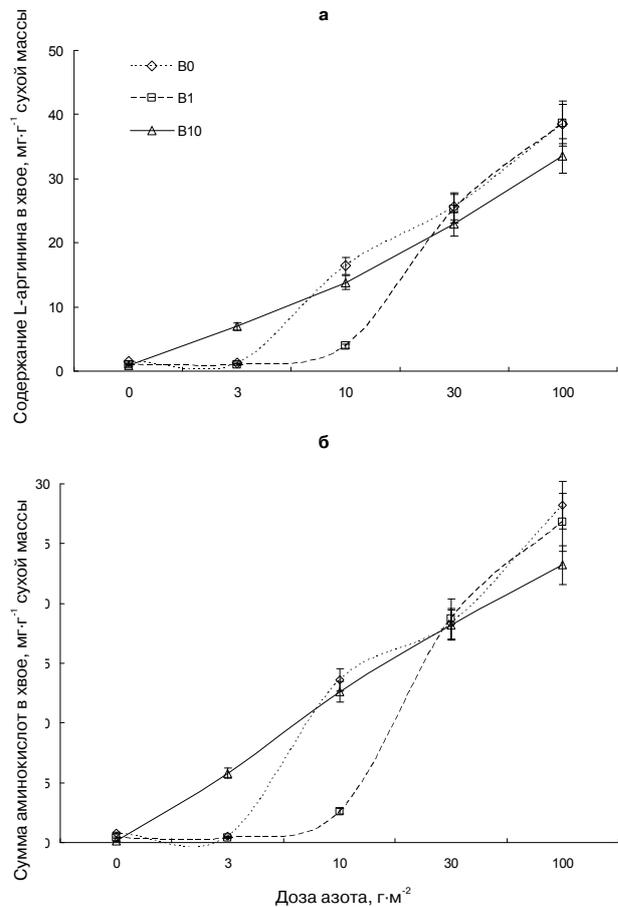


Рис. 3. Влияние обеспечения азотом и бором 5-летней ели европейской на содержание суммы аминокислот (а) и L-аргинина (б) в сухой хвое

L-аргинин составлял основную массу от суммы свободных аминокислот хвои ели не только в контроле, как было отмечено выше, но и во всех вариантах азотного и борного питания (рис. 3: б). Изменение содержания этой аминокислоты в хвое под воздействием азотного и борного обеспечения ели обуславливало динамику суммы аминокислот в различных вариантах. Максимально (в 33 раза по сравнению с контролем) уровень L-аргинина в хвое повышался в вариантах с самой высокой дозой азота без внесения бора и с дозой борной кислоты в $1 \text{ г}\cdot\text{м}^{-2}$ (N100B0 и N100B1). При избыточной дозе борной кислоты и первой дозе азота (N3B10) содержание L-аргинина повысилось в 7 раз. Под воздействием оптимальной дозы борной кислоты в условиях оптимального для роста ели уровня азота (N10B1) содержание аминокислоты в единице сухой массы хвои снижалось в 5 раз.

Данные показали, что максимальное накопление свободных аминокислот в хвое, включая L-аргинин, произошло под воздействием самой высокой дозы азота. Оптимизация борного питания ели не вызывала накопления L-аргинина в хвое в условиях достаточного обеспечения ЭМП. Как было показано нами ранее, в условиях высокого уровня азотного питания на низком фоне других ЭМП оптимизация борного обеспечения сосны обыкновенной в 20 раз повышала содержание L-аргинина в хвое [Чернобровкина и др., 2010].

Распределение азота между растворимыми фракциями в значительной степени зависит от обеспеченности растений азотом, фосфором и другими ЭМП. Рибулозо-1,5-бисфосфат-карбоксилаза/оксигеназа (Рубиско), аминокислоты и аммоний могут рассматриваться как соединения, в которых преимущественно накапливается азот, но аккумулируются они в органах и тканях при различных условиях [Warren, Adams, 2002]. С увеличением обеспеченности растений фосфором содержание Рубиско увеличивается, а при высоких дозах азота и низкой обеспеченности фосфором избыточный азот накапливается в форме азота аминокислот и аммония. При дефиците фосфора у сосны обыкновенной повышалось содержание L-аргинина в хвое [Nasholm, Ericsson, 1990]. В случае незначительного или краткосрочного воздействия азотом растения реагируют увеличением интенсивности синтеза белка, если другие элементы питания доступны в достаточном количестве [Huhn, Schulz, 1996]. Высокие дозы азота или долгосрочные воздействия азотом в сосновых древостоях приводят к изменениям в механизме детоксификации избытка азотных соединений. Чтобы избежать накопления токсичного аммиака в растительных клетках, ассимилируемые соединения азота детоксифицируются путем включения в состав свободных аминокислот, преимущественно в состав L-аргинина, имеющего наиболее низкое по сравнению с другими аминокислотами отношение C/N (1,5) [Huhn, Schulz, 1996]. В литературе показано, что сеянцы сосны обыкновенной накапливали и запасали до 80 % азота в форме L-аргинина в случае, если синтез белка был ограничен факторами, отличными от доступности азота [Gezelius, Nasholm, 1993]. Увеличение содержания L-аргинина и глутамина в хвое сосны обыкновенной в 25-летнем, а также 60–80-летнем древостоях указывало на поступление избыточного количества азота в хвойное растение [Huhn, Schulz, 1996]. Уровень этих аминокислот рассматривается как биохимический индикатор загрязнения азотом сосновых древостоев. Необходимо учитывать, однако, что состав и содер-

жание свободных аминокислот в хвое может варьировать в пределах кроны, имеет сезонную, суточную динамику, зависит от внешних воздействий [Новицкая, Чикина, 1980; Nasholm, Ericsson, 1990; Gezelius, Nasholm, 1993; Чернобровкина, 2001]. При внесении в течение 17 лет избыточного количества азота под деревья сосны обыкновенной в условиях Северной Швеции отмечалось значительное повышение уровня L-аргинина в хвое [Nasholm, Ericsson, 1990]. Максимальное количество аминокислоты в хвое в сезонной динамике было отмечено в феврале. При выращивании ели норвежской (*Picea abies* L.) в течение двух сезонов в вегетационных сосудах в условиях фона азотного питания, повышенного в 4 раза по сравнению с оптимальным, содержание свободного L-аргинина в хвое увеличивалось и составляло до 2 % сырого веса [Engvild, 2005]. Отмечалось увеличение содержания и других аминокислот с высоким содержанием азота – орнитина и лизина.

Наши и литературные данные позволяют заключить, что высокий уровень L-аргинина и других аминокислот в органах хвойных растений можно рассматривать как чувствительный биохимический индикатор разбалансированности их минерального питания. При высоком по сравнению с другими ЭМП поступлении азота в хвойное растение часть его органы и ткани не способны использовать для синтеза белков и запасают в форме аминокислот с высоким содержанием азота, прежде всего в форме L-аргинина. Дополнительное оптимальное обеспечение бором хвойного растения ускоряет процессы роста и вместе с тем усиливает дефицит других ЭМП, что приводит к повышению накопления в хвое L-аргинина. В условиях оптимального фона минерального питания многократное накопление аминокислоты в хвое происходит при избыточной дозе борной кислоты и невысокой дозе азота. Последнее обстоятельство представляет интерес с экономической точки зрения – при небольших затратах на азотные удобрения можно достигать значительного повышения уровня L-аргинина в хвое. Древесная зелень используется для производства биологически активных препаратов лечебно-профилактического и кормового назначения [Ягодин, 1981; Левин, Репях, 1984]. Повышение содержания L-аргинина в древесной зелени путем регуляции минерального питания хвойных растений открывает новые возможности использования ее в фармакологии. Предлагается испытание хвои, обогащенной L-аргинином, в качестве сырья для получения этой аминокислоты, а также в качестве иммуностимулятора для ветеринарии.

В заключение следует отметить, что содержание азота и бора в хвое, равное соответственно 1,8 % и 280 мкг·г⁻¹ сухого вещества, обеспечивает оптимальный рост 5-летней ели европейской в условиях оптимального фона других ЭМП. Уровень бора в хвое выше 500 мкг·г⁻¹ сухой массы является избыточным для ели и вызывает желто-бурое окрашивание хвои. Оптимизация борного питания ели способствует накоплению азота в хвое при его невысоком уровне – менее 1 % от сухой массы. При внесении азотных удобрений под растения ели отмечается преимущественно снижение уровня бора в хвое. Содержание L-аргинина в хвое ели увеличивалось максимально в 33 раза в условиях десятикратной по сравнению с оптимальной дозой азота. Установлено многократное повышение количества этой аминокислоты в хвое в варианте с использованием высокой дозы борной кислоты и низкой – азота.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы ФИ ОБН РАН «Биологические ресурсы России: динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий» в рамках проекта № 01201257867.

Литература

- Волова Т. Г. Биотехнология. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 1999. 252 с.
- Дахно И. С. Влияние иммуностимуляторов L-аргинина и РНК на иммунный статус коров при фасциозе // Вісник Полтавського державного сільського сподарського інституту. 2000. № 5. С. 32–34.
- Западнюк В. И., Купраш Л. П., Заика М. И. и др. Аминокислоты в медицине. Киев: Здоровье, 1982. 200 с.
- Калинкина Л. Х., Назаренко Л. В., Гордеева Е. Е. Модифицированный метод выделения свободных аминокислот для определения на аминокислотном анализаторе // Физиология растений. 1990. Т. 37. Вып. 3. С. 617–621.
- Левин Э. Д., Репях С. М. Переработка древесной зелени. М: Лесн. пром-сть, 1984. 120 с.
- Новицкая Ю. Е., Чикина П. Ф. Азотный обмен у сосны на Севере. Л.: Наука, 1980. 166 с.
- Рыбак К. В., Сливинская Е. А., Саврасова Е. А. и др. Способ получения L-аминокислот с использованием бактерий, принадлежащих к роду Escherichia. Патент на изобретение № 2304615, РФ. 2005.
- Ульянов А. М., Оберган Т. Ю., Шубина Т. А. и др. Исследование протектирующего действия комплекса аргинина с гепарином при экспериментальном развитии инсулинзависимого диабета // Известия РАН. Сер. биол. 2010. № 1. С. 109–114.
- Чернобровкина Н. П. Экофизиологическая характеристика использования азота сосной обыкновенной. СПб.: Наука, 2001. 175 с.
- Чернобровкина Н. П., Робонен Е. В., Иготти С. А., Дорофеева О. С., Шенгелиа И. Д. Влияние обеспеченности бором на рост сеянцев сосны обыкновенной // Лесоведение. 2007. № 5. С. 69–76.
- Чернобровкина Н. П., Робонен Е. В., Зайцева М. И. Накопление L-аргинина в хвое сосны обыкновенной при регуляции азотного и борного обеспечения // Химия растительного сырья. 2010. № 3. С. 71–75.
- Ягодин В. И. Основы химии и технологии переработки древесной зелени. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1981. 224 с.
- Cakmak I., Kurz H., Marschner H. Short-term effects of boron, germanium and high light intensity on membrane permeability in boron deficient leaves of sunflower // *Physiol. Plant.* 1995. Vol. 95. P. 11–18.
- Camacho-Cristóbal J. J., Rexach J., González-Fontes A. Boron in Plants: Deficiency and Toxicity // *Journal of Integrative Plant Biology.* 2008. Vol. 50. N 10. P. 1247–1255.
- Cengiz Ö., Kucukersan S. Effects of graded contents of arginin supplementation on growth performance, haematological parameters and immune system in broilers // *Revue Med. Vet.*, 2010. Vol. 161. P. 409–417.
- Engvild K. C. The «Red» Decline of Norway Spruce or «Røde Rødgraner» – Is it Ammonium Overload or Top-Dying? // *Risø National Laboratory.* April, 2005. 16 p.
- Ferrol N., Donaire J. P. Effect of boron on plasma membrane proton extrusion and redox activity in sunflower cells // *Plant Sci.* 1992. Vol. 86. P. 41–47.
- Gezelius K., Nasholm T. Free amino acids and protein in Scots pine seedlings cultivated at different nutrient availabilities // *Tree Physiology.* 1993. Vol. 13, N 1. P. 71–86.
- Huhn B.G., Schulz H. Contents of free amino acids in Scots pine needles from field sites with different levels of nitrogen deposition // *New Phytol.* 1996. Vol. 134. P. 95–101.
- Jesse P. Greenstein and Milton Winitz. *Chemistry of Amino Acids.* New York. London. John Veley and Sons, IV. 1961. P. 1847–1848.
- Kobayashi M., Matoh T., Junichi A. Two chains of ramnogalacturonan-2 are cross – linked by borate – diol ester bonds in higher plant cell wall // *Plant Physiol.* 1996. Vol. 110. P. 1017–1020.
- Nasholm T., Ericsson A. Seasonal changes in amino acids, protein and total nitrogen in needles of fertilized Scots pine trees // *Tree Physiology.* 1990. Vol. 6. P. 267–281.
- Warren C. R., Adams M. A. Phosphorus affects growth and partitioning of nitrogen to Rubisco in *Pinus pinaster* // *Tree Physiology.* 2002. Vol. 22. P. 11–19.
- Wikner B. Distribution and mobility of boron in forest ecosystems // *Communications Institution Forestalis Fenniae.* 1983. N 116. P. 131–141.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Чернобровкина Надежда Петровна

ведущий научный сотрудник, д. б. н.
Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: chernobr@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 768160

Робонен Елена Вильямовна

ведущий физик
Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: er51@bk.ru
тел.: (8142) 768160

Морозов Александр Константинович

зав. аналитической лабораторией
Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: amorozov@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 768160

Макарова Тамара Николаевна

ведущий химик
Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: chernobr@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 768160

Chernobrovkina, Nadezhda

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: chernobr@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 768160

Robonen, Elena

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: er51@bk.ru
tel.: (8142) 768160

Morozov, Alexandr

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: amorozov@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 768160

Makarova, Tamara

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: chernobr@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 768160

УДК 581.1

РЕАКЦИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА НА ПОСТОЯННОЕ И КРАТКОВРЕМЕННОЕ ПЕРИОДИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ

Е. Г. Шерудило, М. И. Сысоева, В. А. Илюха

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Изучали влияние постоянного (ПНТ) и кратковременного периодического (ДРОП) действия низкой температуры на активность каталазы и содержание низкомолекулярных антиоксидантов в листьях растения огурца. Установлено, что ПНТ снижает активность каталазы на фоне повышения холодоустойчивости, а ДРОП, напротив, индуцируя рост холодоустойчивости растений, повышает активность каталазы. Показано, что содержание низкомолекулярных соединений с антиоксидантной функцией выше по сравнению с контролем в варианте ПНТ и существенно ниже или не отличается от контроля при ДРОП-обработке. Отмечены взаимокompенсаторные изменения компонентов антиоксидантной системы в реакции растений огурца на два типа низкотемпературного воздействия.

Ключевые слова: *Cucumis sativus* L., кратковременные снижения температуры, каталаза, низкомолекулярные антиоксиданты, холодоустойчивость.

E. G. Sherudilo, M. I. Sysoeva, V. A. Ilyukha. RESPONSE OF THE ANTIOXIDANT SYSTEM IN CUCUMBER PLANTS TO CONTINUOUS AND PERIODIC SHORT-TERM LOW TEMPERATURE EXPOSURE

We studied the effects of continuous (CLT) and periodic short-term (DROP) low temperature exposure on catalase activity and low molecular antioxidant content in cucumber leaves. CLT inhibited catalase activity while promoting cold resistance, whereas DROP promoted catalase activity simultaneously with inducing a rise in cold resistance. We demonstrate that compared with the control CLT-treated plants had a higher content of low molecular antioxidants, whereas their content in DROP-treated plants was significantly lower or the same as in the control. Mutually compensating changes in components of the antioxidant system were observed in the response of the cucumber plants to the two low temperature effects.

Keywords: *Cucumis sativus* L., temperature drops, catalase, low molecular antioxidants, cold resistance.

Введение

При действии низкой неблагоприятной температуры в клетках растений развивается окислительный стресс, связанный с повышенной продукцией активных форм кислорода (АФК) [Prasad et al., 1994; Лукаткин, 2002; Oliveira et al.,

2007]. Для предотвращения негативного и опасного влияния АФК у растений существует двухкомпонентная антиоксидантная система защиты [Blokhina et al., 2003], включающая антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутаза, пероксидаза, каталаза и др.) и низкомолекулярные органические соединения (пролин, полиамины,

вещества фенольной природы – антоцианы, каротиноиды, флавоноиды и др.).

Одним из основных ферментов нейтрализации перекиси водорода, участвующих в стрессовых реакциях растений, в частности при низкотемпературном воздействии, является каталаза [Willekens et al., 1994], активность которой, как известно, снижается при холодовом стрессе [Lee, Lee, 2000; Xu et al., 2010] и повышается при действии низких субоптимальных температур [Saruyama, Tanida, 1995; Радюк и др., 2009], тесно коррелируя с устойчивостью растений к действию низких температур [Prasad, 1997; Kang, Saltviet, 2001; Kuk et al., 2003]. Причем особую роль она играет в детоксикации АФК у теплолюбивых растений [Volk, Feierabend, 1989; Kuk et al., 2003]. Однако участие каталазы в защите теплолюбивых растений от АФК при низкотемпературном стрессе в основном изучено при постоянном в суточном цикле действии низких повреждающих температур [Kang, Saltviet, 2001; Лукаткин, 2002] и лишь единично – их закаливающих значений [Xu et al., 2008].

Известно, что реакция растений на низкую температуру зависит не только от ее абсолютного значения, но и определяется характером ее воздействия в суточном цикле (постоянным или периодическим) [Марковская и др., 2008]. Так, именно периодическое действие низкой закаливающей температуры оказало наибольшее влияние на устойчивость теплолюбивых растений, величина которой существенно превышала уровень холодоустойчивости растений в условиях постоянного в течение суток холодового закаливания [Марковская и др., 2000]. Об участии различных компонентов антиоксидантной системы (АОС) в реакции теплолюбивых растений и ее связи с холодоустойчивостью при кратковременном периодическом действии низкой закаливающей температуры практически ничего не известно.

Целью настоящей работы было сравнительное изучение состояния ферментативного и неферментативного звеньев АОС теплолюбивого растения огурца при постоянном и кратковременном периодическом действии низкой закаливающей температуры и ее роли в процессе повышения холодоустойчивости.

Материалы и методы

Исследования выполнены с использованием приборно-аналитической базы Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН.

Опыты проводили с растениями огурца (*Cucumis sativus* L., гибрид Зозуля). Семена проращивали в термостате при 28 °С в течение

двух суток, высаживали в вазоны с песком (полив питательным раствором Кнопа с добавлением микроэлементов, рН 6,2–6,4) и помещали в камеру искусственного климата. Растения выращивали при температуре 23 °С, фотопериоде 12 ч, ФАР 120 мкмоль·м⁻²·с⁻¹, влажности воздуха 60–70 % в течение двух недель. По достижении фазы 1-го настоящего листа часть растений оставляли при 23 °С (вариант контроль), а остальные в течение 6 сут либо подвергали ежесуточным снижениям температуры (с 23 до 12 °С) на 2 ч в конце ночного периода (вариант ДРОП, от англ. drop – «падение»), либо выращивали при постоянной низкой температуре 12 °С (вариант ПНТ). По окончании низкотемпературных обработок определяли активность каталазы, содержание каротиноидов и пролина, а также холодоустойчивость листьев.

Для определения активности каталазы и содержания белка навеску листовой ткани растирали с 2 мл 0,05 М фосфатного буферного раствора (рН = 7,0), после чего гомогенат центрифугировали при 6000 g в течение 15 мин. Активность каталазы определяли спектрофотометрически (СФ-46, Россия) при 240 нм по количеству разложенной перекиси водорода [Bears, Sizer, 1952]. В кювету с 2,5 мл рабочего раствора H₂O₂ вносили 25 мкл супернатанта и регистрировали изменение экстинкции в течение 1 мин. Рабочий раствор готовили, растворяя 0,1 мл 30 % H₂O₂ в 100 мл 0,05 М фосфатного буферного раствора (рН = 7,0). Содержание белка определяли методом Лоури [Lowry et al., 1951] с использованием в качестве стандарта бычьего сывороточного альбумина. Активность каталазы выражали в мкмоль H₂O₂, разложенной за 1 мин. Активность фермента рассчитывали на 1 г сырой ткани, а удельную активность – на 1 мг белка.

Холодоустойчивость оценивали по температуре (ЛТ₅₀), вызывающей гибель 50 % палисадных клеток на высечках (площадью 0,5 см²) из 1-го настоящего листа после их 5-минутного тестирующего промораживания в термоэлектрическом термостате ТЖР-02-20 («Интерм», Россия) в интервале температур от –10 до –15 °С с шагом 0,4 °С [Дроздов и др., 1976].

Содержание каротиноидов определяли спектрофотометрически в 96%-й спиртовой вытяжке по общепринятой методике [Lichtentaler, Wellburn, 1983].

Содержание свободного пролина определяли с помощью кислого нингидринового реактива по методу Bates et al. [1973].

На рисунках представлены относительные (к контролю) данные, рассчитанные по средним арифметическим значениям из трех независимых опытов в четырех (каталаза, кароти-

ноиды, пролин) и шести (холодоустойчивость) аналитических повторностях. Данные обработаны статистически с использованием пакета программ Statgraphics for Windows 7.0.

В статье обсуждаются величины, достоверно различающиеся при $P < 0,05$.

Результаты

Низкотемпературное воздействие оказывало разнонаправленное влияние на активность каталазы в листьях растений огурца. При постоянном действии низкой температуры (вариант ПНТ) активность фермента почти на 30 % снижалась по отношению к контролю, а при кратковременном периодическом ее действии (вариант ДРОП) – напротив, повышалась (рис. 1: а).

Оба варианта низкотемпературного воздействия различались и по содержанию каротиноидов. Постоянное низкотемпературное воздействие по сравнению с контролем на 18 % увеличивало концентрацию каротиноидов в листьях. ДРОП-обработка практически не влияла на содержание каротиноидов, сохраняя их на уровне контроля (рис. 1: б).

Повышение накопления пролина в листьях растений огурца наблюдалось во всех вариантах низкотемпературного воздействия (рис. 1: в). При этом ПНТ к концу шестых суток индуцировала почти 5-кратное увеличение концентрации пролина по сравнению с контролем, свидетельствуя о его интенсивной аккумуляции в этих условиях. Кратковременное периодическое действие низкой температуры (вариант ДРОП) также сопровождалось накоплением пролина, но в меньшей степени, превышая уровень контроля в 1,9 раза.

Обе низкотемпературные обработки повышали холодоустойчивость растений огурца, однако прирост холодоустойчивости в вариантах ДРОП и ПНТ по отношению к контролю оказался неодинаковым (рис. 2). Если в варианте ПНТ холодоустойчивость возрастала на 0,5 °С, то ДРОП-обработка растений огурца в течение шести суток индуцировала увеличение холодоустойчивости уже на 1,8 °С.

Обсуждение

Низкотемпературное воздействие сопровождается развитием у растений окислительного стресса, вызывающего негативные явления на уровне мембран, белков и метаболических процессов. Одной из ответных защитных реакций растения выступает активизация АОС, представленной двумя основными компонентами – ферментативной и низкомолекулярными анти-

оксидантами. Характер взаимодействия между двумя компонентами системы может меняться в зависимости от вида растений, онтогенетических особенностей и действующего стрессового фактора [Радюкина и др., 2008; Половникова, Воскресенская, 2008]. Причем одни исследователи в качестве более эффективной защиты метаболизма растений от АФК выделяют ферментативную компоненту АОС [Zhang, Kirkham, 1994], другие – низкомолекулярные антиоксиданты [Blokhina et al., 2003].

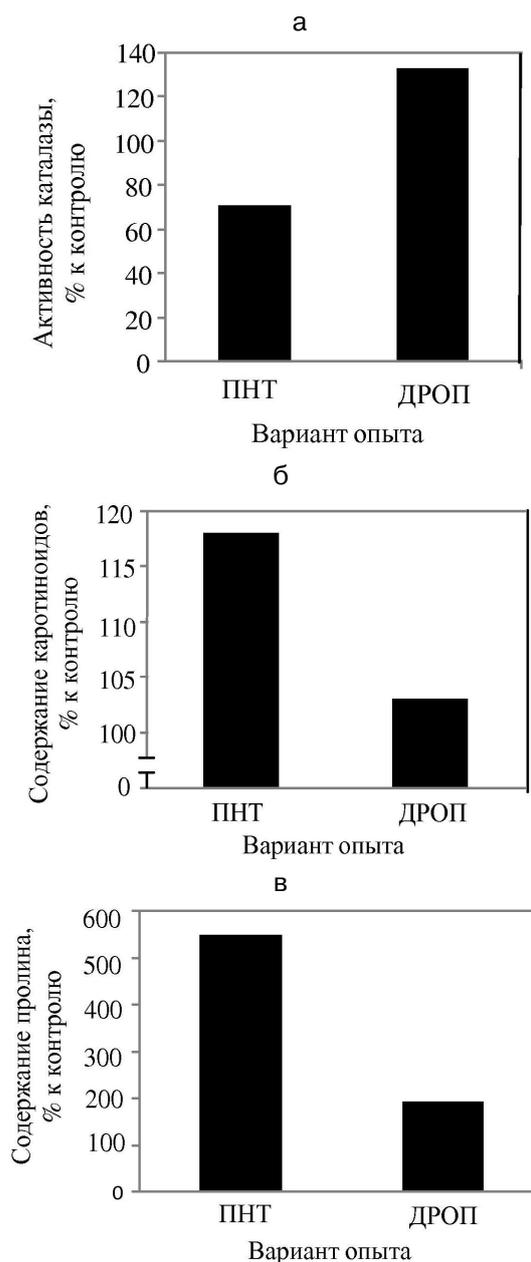


Рис 1. Влияние постоянного (ПНТ) и кратковременно-периодического (ДРОП) действия низкой температуры (12°С) на активность каталазы (а), содержание каротиноидов (б) и накопление пролина (в) в листьях растений огурца. Контроль принят за 100 %

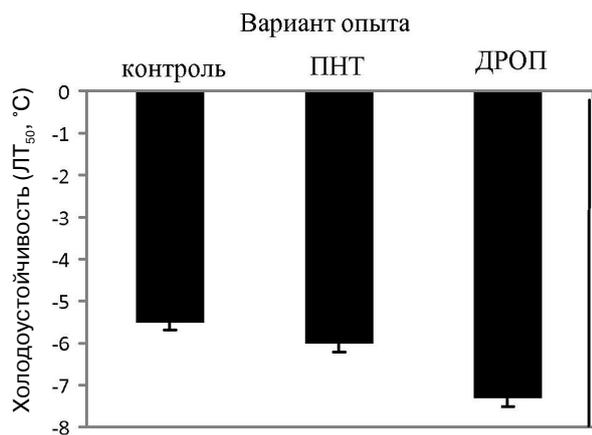


Рис. 2. Холодоустойчивость (ЛТ₅₀, °C) листьев растений огурца в контроле, при постоянном (ПНТ) и кратковременном периодическом (ДРОП) действии низкой температуры (12 °C).

Нами впервые в сравнительном аспекте проанализированы изменения различных компонентов антиоксидантной защиты при разных видах низкотемпературного воздействия – постоянном и кратковременном периодическом. Оказалось, что постоянное многосуточное действие низкой температуры (вариант ПНТ) снижало активность одного из ключевых ферментов расщепления перекиси водорода – каталазы, что согласуется со сведениями, имеющимися в литературе [Omran, 1980; Shen et al., 1999; Lee, Lee, 2000; Kang, Saltviet, 2001; Лукаткин, 2002]. Однако, согласно вышеприведенным данным, этот процесс у теплолюбивого растения огурца происходил на фоне снижения устойчивости растений и даже их повреждения. Выявленная нами обратнo-коррелятивная взаимосвязь между функционированием антиоксидантного фермента и повышением холодоустойчивости растений огурца при ПНТ может быть связана с тем, что использованная в наших опытах низкая положительная температура относится не к повреждающим, а к закаливающим значениям, индуцирующим рост устойчивости растений огурца.

Наряду с антиоксидантными ферментами в защите растений от АФК участвуют и низкомолекулярные соединения с антиоксидантной функцией – каротиноиды и пролин. Аккумуляцию пролина относят к неспецифическим и часто связывают с развитием устойчивости растений к действию разных стрессов, включая низкотемпературные [Xin, Li, 1993; Claussen, 2005; Apostolova et al., 2008]. Причем его интенсивное накопление необходимо для формирования холодоустойчивости только при действии на растения закаливающих тем-

ператур [Duncan, Widholm, 1987; Apostolova et al., 2008], повреждающие же температуры, напротив, снижают уровень содержания пролина [Duncan, Widholm, 1987]. В наших экспериментах повышение холодоустойчивости растений огурца, вызванное постоянным действием низкой закаливающей температуры, сопровождалось возрастанием содержания каротиноидов в листьях огурца и интенсивной аккумуляцией пролина, в 5 раз превышающей уровень контроля. Таким образом, при ПНТ активизация неферментативной компоненты АОС находится в прямой зависимости с ростом холодоустойчивости огурца.

Совершенно неожиданные данные были получены нами при изучении действия на растения огурца кратковременных периодических снижений температуры: повышение холодоустойчивости при ДРОП-обработках находилось в прямой коррелятивной зависимости с увеличением содержания каталазы в листьях. Ранее в литературе было показано, что периодическое низкотемпературное (день/ночь = 12/6 °C) воздействие на растения огурца снижало активность каталазы [Borowski, 2009]. Полученное противоречие может быть вызвано тем, что в исследованиях E. Borowski [2009] флуктуирующий температурный режим включал сочетание разных по характеру действия на растения огурца температур: дневной закаливающей 12 °C и ночной повреждающей 6 °C, что не только не повышало устойчивость растений огурца, а, напротив, повреждало их ткани, если судить по существенному (до 68,2 %) возрастанию выхода электролитов. В нашей работе мы снижали температуру с оптимальных до закаливающих значений, повышающих холодоустойчивость растений огурца.

Вариант ДРОП отличался и особенностями накопления низкомолекулярных антиоксидантов: количество каротиноидов было практически одинаковым с контролем, а содержание пролина превышало контроль значительно меньше, чем в варианте ПНТ.

Таким образом, при постоянном действии низкой закаливающей температуры основную роль в защите клеток растений огурца от окислительного стресса, по-видимому, играют низкомолекулярные соединения с антиоксидантными свойствами. В частности, это пролин, значительное накопление которого в растениях огурца при постоянном многосуточном низкотемпературном воздействии оказалось, по-видимому, достаточным для нейтрализации АФК и не требовало повышенной активности антиоксидантных ферментов.

Более того, установлено, что пролин, в свою очередь, способен снижать активность ферментов АОС у растений [Радюкина и др., 2008; Шевякова и др., 2009]. Помимо пролина к антиоксидантной функции подключались и другие низкомолекулярные соединения, а именно каротиноиды, количество которых также возрастало при ПНТ. В случае же кратковременных периодических низкотемпературных воздействий основная функция нейтрализации негативного влияния АФК переходит к антиоксидантным ферментам, в частности к каталазе, что подтверждается существенным повышением активности фермента в варианте ДРОП. Известно, что возрастание активности каталазы способствует лучшей защите растений от окислительного стресса и обеспечивает повышение жизнедеятельности в ответ на неблагоприятные воздействия [Prasad et al., 1994; Чиркова, 2002; Gill, Tuteja, 2010]. Активизация ферментной системы, вызванная кратковременными периодическими низкотемпературными воздействиями, по-видимому, приводит не только к более эффективной детоксикации H_2O_2 , но и способствует формированию более высокой, чем в варианте ПНТ, холодоустойчивости растений [Марковская и др., 2000], а также отмеченной нами ранее высокой функциональной активности и повышенной жизнедеятельности растений [Марковская и др., 2008]. Разнонаправленность изменений ферментативного и неферментативного компонентов могла быть связана как с их взаимокомпенсаторными взаимодействиями, так и с различной способностью взаимодействовать с разными АФК. Кроме того, ранее нами было показано, что растения варианта ДРОП отличались от варианта ПНТ повышенным содержанием сахарозы, а также продуктами ее распада – глюкозой и фруктозой [Марковская и др., 2010]. Известно, что сахара являются эффективными перехватчиками гидроксильных радикалов [Аверьянова, Лапикова, 1989; Дерябин и др., 2007], недостаток же сахарозы у растений, напротив, может способствовать развитию окислительного стресса, а именно – накоплению активных форм кислорода [Contento et al., 2004], и влиять на экспрессию генов, связанных с окислительным стрессом [Soueef et al., 2006]. Учитывая это, можно предположить, что растения варианта ПНТ с меньшим содержанием сахарозы по сравнению с вариантом ДРОП характеризовались и менее эффективным противодействием окислительному стрессу преимущественно за счет активизации низкомолекулярных антиоксидантов. Кроме того, АОС об-

ладает значительным количеством связей между ферментативными и неферментативными компонентами, что позволяет ей более тонко реагировать на нестабильные условия окружающей среды и использовать либо преимущественно быстрый, но энергозатратный, либо медленный пути адаптации. Также следует учитывать, что H_2O_2 является сигнальной молекулой, влияющей на экспрессию генов и процессы развития [Oliveira et al., 2007], что обеспечивает реакцию растительного организма на постоянно изменяющиеся условия среды.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 8050) и РФФИ (проект № 10-04-00097-а).

Литература

- Аверьянова А. А., Лапикова В. П. Взаимодействие сахаров с гидроксильным радикалом в связи с фунгитоксичностью выделений листьев // Биохимия. 1989. Т. 54. С. 523–533.
- Дерябин А. Н., Синькевич М. С., Дубинина И. М. и др. Влияние сахаров на развитие окислительного стресса, вызванного гипотермией (на примере растений картофеля, экспрессирующих ген инвертазы дрожжей) // Физиология растений. 2007. Т. 54. С. 39–46.
- Дроздов С. Н., Курец В. К., Будыкина Н. П., Балгурова Н. И. Определение устойчивости растений к заморозкам // Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды. Л.: Колос, 1976. С. 222–228.
- Лукаткин А. С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2002. 208 с.
- Марковская Е. Ф., Сысоева М. И., Харькина Т. Г., Шерудило Е. Г. Влияние кратковременного снижения ночной температуры на рост и холодостойкость растений огурца // Физиология растений. 2000. Т. 47, № 4. С. 511–515.
- Марковская Е. Ф., Сысоева М. И., Шерудило Е. Г. Феномен ежесуточного кратковременного влияния низких закалывающих температур на жизнедеятельность растения // Онтогенез. 2008. Т. 39, № 5. С. 323–332.
- Марковская Е. Ф., Шерудило Е. Г., Галибина Н. А., Сысоева М. И. Роль углеводов в реакции теплолюбивых растений на кратковременные и длительные низкотемпературные воздействия // Физиология растений. 2010. Т. 57, № 5. С. 687–694.
- Половникова М. Г., Воскресенская О. Л. Активность компонентов антиоксидантной защиты и полифенолоксидазы у газонных растений в онтогенезе в условиях городской среды // Физиология растений. 2008. Т. 55. С. 777–785.
- Радюк М. С., Доманская И. Н., Щербаков Р. А., Шалыго Н. В. Влияние низкой положительной температуры на содержание низкомолекулярных антиоксидантов в зеленых листьях ячменя // Физиология растений. 2009. Т. 56, № 2. С. 193–199.

- Радюкина Н. Л., Шашукова А. В., Шевякова Н. И., Кузнецов Вл. В. Участие пролина в системе антиоксидантной защиты у шалфея при действии NaCl и парахвата // Физиология растений. 2008. Т. 55. С. 721–730.
- Чиркова Т. В. Физиологические основы устойчивости растений. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2002. 244 с.
- Шевякова Н. И., Бакулина Е. А., Кузнецов Вл. В. Антиоксидантная роль пролина у галофита хрустальной травки при действии засоления и парахвата, инициирующего окислительный стресс // Физиология растений. 2009. Т. 56. С. 736–742.
- Apostolova P., Yordanova R., Popova L. Response of antioxidative defence system to low temperature stress in two wheat cultivars // Gen. Appl. Plant Physiol. 2008. Vol. 34. P. 281–294.
- Bates L. S., Waldern R. P., Teare I. K. Rapid determination of free proline for water stress studies // Plant Soil. 1973. Vol. 39. P. 205–208.
- Bears R. F., Sizes I. N. A spectral method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase // J. Biol. Chem. 1952. Vol. 195. P. 133–140.
- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review // Ann. Bot. 2003. Vol. 91. P. 179–194.
- Borowski E. Response to chilling in cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants treated with triacontanol and Asahi SL // Acta Agrobotanica. 2009. Vol. 62, N 2. P. 165–172.
- Claussen W. Proline as measure of stress in tomato plants // Plant Sci. 2005. Vol. 168. P. 241–248.
- Contento A. L., Kim S. J., Bassham D. C. Transcriptome profiling of the response of Arabidopsis suspension culture cells to Suc starvation // Plant Physiol. 2004. Vol. 135. P. 2330–2347.
- Couee I., Sulmon C., Gouesbert G., Amrani A. E. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen stress in plants // J. Exp. Bot. 2006. Vol. 57. P. 449–459.
- Duncan D. R., Widholm J. M. Proline accumulation and its implication in cold tolerance of regenerable maize callus // Plant Physiol. 1987. Vol. 83. P. 703–708.
- Gill S. S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // Plant Physiol. Biochem. 2010. Vol. 48. P. 909–930.
- Kang H.-M., Saltviet M. E. Activity of enzymatic antioxidant defense systems in chilling and heat shocked cucumber seedlings *radicales* // Plant Physiol. 2001. Vol. 113. P. 548–556.
- Kuk Y. I., Shin J. S., Burgos N. R. et al. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants // Crop Sci. 2003. Vol. 43. P. 2109–2117.
- Lee D. H., Lee C. B. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays // Plant Sci. 2000. Vol. 159. P. 75–85.
- Lichtenthaler H. K., Wellburn A. R. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents // Bioch. Soc. Transactions. 1983. Vol. 603. P. 591–592.
- Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randan R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 265–275.
- Oliveira E. S., Hancock J. T., Hermes-Lima M. et al. Implications of dealing with airborne substances and reactive oxygen species: what mammalian lungs, animals, and plants have to say? // Integr. Compar. Biology. 2007. Vol. 47. P. 578–591.
- Omran R. J. Peroxide level and the activities of catalase, peroxidase, and indolacetic acid oxidase during and after chilling cucumber seedlings // Plant Physiol. 1980. Vol. 65. P. 407–408.
- Prasad T. K. Role of catalase in inducing chilling tolerance in preemergent maize seedlings // Plant Physiol. 1997. Vol. 114. P. 1319–1376.
- Prasad T. K., Anderson M. D., Martin B. A., Stewart C. R. Evidence for chilling induced oxidative stress in maize seedlings and a regulating role for hydrogen peroxidase // Plant Cell. 1994. Vol. 6. P. 65–74.
- Saruyama H., Tanida M. Effect of chilling on activated oxygen-scavenging enzymes in low temperature-sensitive and -tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.) // Plant Sci. 1995. Vol. 109. P. 105–113.
- Shen W., Kazuyoshi N., Tachibana Sh. Effect of cold treatment on enzymic and nonenzymic antioxidant activities in leaves of chilling-tolerant and chilling-sensitive cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars // J. Japan. Soc. Hort. Sci. 1999. Vol. 68. P. 967–973.
- Volk S., Feierabend J. Photoinactivation of catalase at low temperature and its relevance to photosynthetic and peroxide metabolism in leaves // Plant Cell Envir. 1989. Vol. 12. P. 701–712.
- Willekens H., Villarroel R., Van Montagu M. et al. Molecular identification of catalases from *Nicotiana plumbaginifolia* L. // FEBS Lett. 1994. Vol. 352. P. 79–83.
- Xin Zh., Li P. H. Relationship between proline and abscisic acid in the induction of chilling tolerance in maize suspension-cultured cells // Plant Physiol. 1993. Vol. 103. P. 607–613.
- Xu P. L., Guo Y. K., Bai J. G. et al. Effect of long-term chilling on ultrastructure and antioxidant activity in leaves of two cucumber cultivars under low light // Plant Physiol. 2008. Vol. 134, N 4. P. 467–478.
- Xu Sheng-chun, Li Yong-ping, Hu Jin et al. Response of antioxidant enzymes to chilling stress in tobacco seedlings // Agricultural Sciences in China. 2010. Vol. 9. P. 1594–1601.
- Zhang J., Kirkham M. B. Drought-stress induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase in wheat species // Plant Cell Physiol. 1994. Vol. 35. P. 785–791.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Шеруди́ло Елена Георгиевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск
Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: sherudil@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 762706

Сысоева Марина Ивановна

главный научный сотрудник, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: sysoeva@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 762706

Илюха Виктор Александрович

зав. лаб. экологической физиологии животных, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: ilyukha@bio.krc.karelia.ru
тел.: (8142) 573107

Sherudilo, Elena

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk
Karelia, Russia
e-mail: sherudil@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 762706

Sysoeva, Marina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk
Karelia, Russia
e-mail: sysoeva@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 762706

Ilyukha, Victor

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk
Karelia, Russia
e-mail: ilyukha@bio.krc.karelia.ru
tel.: (8142) 573107

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 582.632:581.132:581.52

ИССЛЕДОВАНИЯ ФОТОСИНТЕЗА И ТРАНСПИРАЦИИ У КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ И БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ

В. К. Болондинский¹, Е. С. Холопцева²

¹ Институт леса Карельского научного центра РАН

² Институт биологии Карельского научного центра РАН

При оптимальных внешних условиях и хорошей оводненности почвы во время интенсивного роста побегов проводили исследования газообмена разновозрастных листьев саженцев березы повислой (*Betula pendula*) и березы карельской (*Betula pendula* var. *carelica*). Средние величины фотосинтеза у карельской березы (БК) и у березы повислой (БП) составляли – 11,39 и 12,30 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ соответственно, максимальные величины – 28,3 и 21,8 мкмоль·м⁻²·с⁻¹. Различия в транспирации составили 1,97 и 2,42 ммоль·м⁻²·с⁻¹ у БК и БП соответственно. Рассчитывали устьичную и мезофильную проводимость, сопротивление диффузии CO₂ и продуктивность транспирации. При достаточном количестве почвенной влаги у растений березы обеих форм имелись достоверные различия в средних величинах устьичной и мезофильной проводимости. Устьичная проводимость у листьев БК в среднем была на 25 % ниже, чем у БП. Фотосинтез у БК оставался на уровне, близком к БП, благодаря более высокой мезофильной проводимости. Продуктивность транспирации была у БК на 32 % выше, чем у БП. Снижение интенсивности фотосинтеза у листьев, заканчивающих рост, по сравнению с уже сформировавшимися было связано с уменьшением мезофильной проводимости, а также устьичной проводимости и содержания хлорофилла.

Ключевые слова: *Betula pendula*, CO₂-газообмен, транспирация, устьичная проводимость.

V. K. Bolondinskii, E. S. Kholoptseva. RESEARCH INTO THE PHOTOSYNTHESIS AND TRANSPIRATION IN KARELIAN BIRCH AND SILVER BIRCH

Gas exchange in leaves of different age was studied in silver birch (*Betula pendula*) and Karelian birch (*Betula pendula* var. *carelica*) seedlings during intensive shoot growth under optimal external conditions and adequate soil water content. Average photosynthesis in Karelian birch (KB) and silver birch (SB) was 11.39 and 12.30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$, respectively, the maximums being 28.3 and 21.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$. The differences in transpiration were 1.97 and 2.42 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ in KB and SB, respectively. We estimated stomatal and mesophyll conductance, CO₂ diffusion resistance, and transpiration efficiency. Where soil moisture was sufficient, the two birch forms differed reliably in terms of stomatal and mesophyll conductance means.

Stomatal conductance in *KB* leaves was on average 25 % lower than in *SB*. Photosynthesis in *KB* remained at a level similar to that in *SB* owing to higher mesophyll conductance. Transpiration efficiency was 32 % higher in *KB* than in *SB*. Photosynthesis in the leaves ceasing to grow was less intensive than in the fully developed leaves because of lower mesophyll conductance, as well as stomatal conductance and chlorophyll content.

Key words: *Betula pendula*, CO₂ exchange, transpiration, stomatal conductance.

Введение

На CO₂-газообмен растений помимо внешних факторов среды оказывают влияние также внутренние факторы, эдафические условия. Фотосинтез в значительной степени определяется фенологической фазой развития растения и соответствующим этой фазе запросом на ассимилянты. Транспирация листа зависит в основном от двух факторов: дефицита водяного пара в воздухе и устьичной проводимости. Как в природных условиях [Болондинский, 2010; Болондинский, Виликайнен, 2011], так и в факторостатных [Дроздов и др., 1995] не зафиксировано существенной разницы в средних величинах фотосинтеза у *БК* и *БП*. При этом известно, что ростовые процессы у *БК* по сравнению с *БП* снижены, и у первой происходит торможение камбиальной деятельности [Новицкая, 2008]. У *БК* одной из основных причин нарушений нормальной ритмики камбиальной активности и, как следствие, образования аномальной древесины является избыточное количество транспортных сахаров в камбиальной зоне [Галибина и др., 2011]. Продукты фотосинтеза поступают в камбиальную зону по проводящим элементам флоэмы в виде транспортных сахаров. Взаимодействие между источником ассимилятов и потребляющими их в процессе роста органами имеет сложный характер. Превышение концентрации ассимилятов в точках роста выше нормы не бывает продолжительным. Часто, если ростовые процессы замедляются, через систему прямых и обратных связей происходит репрессорное воздействие на активность фотосинтетического аппарата [Мокроносов, 1981]. Это может выражаться в снижении устьичной проводимости и скорости реакции карбоксилирования. Второй путь – создание буфера между фотосинтезирующими органами и использующими ассимилянты на рост. Известно достаточно много возможностей такого демпфирования [Мокроносов, 1981]. У карельской березы это также наблюдается, но имеет свои особенности. На опре-

деленном этапе роста происходило аномальное увеличение объема запасающей паренхимы, сахароза оттекала в периферийные слои коры [Новицкая, 2008]. Не совсем понятно, почему не реализовывался первый путь и CO₂-газообмен *БК* не снижался по сравнению с *БП*, где ростовые процессы протекали нормально, – связано ли это с недостаточной устьичной регуляцией или влияют какие-то другие метаболические причины?

Материалы и методы

Работа проводилась в начале июля 2011 г. на территории агробиологической станции КарНЦ РАН, расположенной в 2 км к югу от г. Петрозаводска. Использовались шесть растений *БП* и *БК* 7-летнего возраста, высотой около 4 м, росшие в 1 м друг от друга. Почва – смесь торфа и песка. Верхние горизонты до 50–60 см содержали примерно 50 % гальки и мелкого шунгизита. Горизонт 60–70 см – глина, смешанная с песком. Уровень грунтовых вод у объектов составлял в конце июня – начале июля 70–80 см. Каждый раз за день до проведения эксперимента растения обильно поливали. Эксперименты по изучению газообмена проводили в дневной динамике с 10 до 17 часов с помощью портативного газоанализатора LI-840 (Li-Cor, USA). Воздушный поток из 6-литровой форемкости, закрепленной на высоте 3–4 м, нагнетали в листовую камеру-прищепку оригинальной конструкции и далее через фильтры, краны, ротаметры – в газометрическую систему. Управление и запись данных осуществляла программа в компьютере, который через USB-порт подсоединяли к газоанализатору. Сначала измеряли параметры во входящем воздухе, затем лист вставляли в камеру-прищепку с площадью окошка 5,76 см² и измеряли параметры на выходе. При скорости потока воздуха через камеру 0,5 л·мин⁻¹ стабилизация параметров происходила в течение 1–1,5 минуты. Далее камеру затемняли, и примерно через 30 секунд замеряли уровень темного дыхания.

Температуру листа в камере контролировали с помощью медь-константановых термопар. При скоростях 0,4–0,5 л·мин⁻¹ воздух сменялся в камере каждые 0,5 сек, и перегрев листа не превышал на полном солнце 1,5 °С. Газоанализатор позволял измерять концентрации CO₂ в миллионных долях (ppm) и водяного пара в тысячных долях (ppt), а также точку росы (°С). На основании этих данных с учетом скорости движения воздуха через камеру рассчитывали нетто-фотосинтез (*P*) и транспирацию (*E*). По точке росы определяли насыщающую концентрацию водяного пара в воздухе, входящем в камеру, и дефицит давления водяного пара (*D*).

Устьичную проводимость листа для паров воды (*g_{sw}*) рассчитывали по формуле $g_{sw} = E / (W_i - W_a)$ [Барри, Даунтон, 1987], где *W_i* – насыщающая концентрация водяного пара в межклетниках при температуре листа; *W_a* – концентрация водяных паров во входящем воздухе (измеряли газоанализатором). Величину, обратную устьичной проводимости, – устьичное сопротивление для молекул CO₂ (*r_s*) определяли по формуле $r_s = 1,6/g_{sw}$ [Барри, Даунтон, 1987].

Скорость ассимиляции (*A*) определяли как сумму наблюдаемого фотосинтеза (*P*) и абсолютной величины темного дыхания (*R*). Суммарное сопротивление диффузии CO₂ (*r_t*) рассчитывали по формуле [Цельникер, 1978]:

$$r_t = (C_a - C_x) / A, \quad (1)$$

где *C_a* – концентрация CO₂ в воздухе, *C_x* – концентрация CO₂ в хлоропластах. *C_x* приравнивалась к углекислотному компенсационному пункту (*Γ*), который определяли ранее с помощью газометрической системы Li-6200. Величина *Γ* в условиях хорошего водоснабжения деревьев у освещенных листьев при температуре 22–27 °С была близка к 70 мкмоль·моль⁻¹, что несколько выше, чем для сосны (61–63 мкмоль·моль⁻¹) [Болондинский, 2008] или для других растений, включая березу [Лайск и др. 1998; Eichelmann et al., 2004]. Общее сопротивление *r_t* можно представить как сумму сопротивлений:

$$r_t = r_a + r_s + r_m, \quad (2)$$

где *r_a* – диффузионное сопротивление приграничного слоя листа, которое мы приравнивали к 0,5 с·см⁻¹ [Цельникер, 1978], *r_s* – устьичное сопротивление для CO₂, *r_m* – мезофильное сопротивление. С учетом уравнений (1) и (2) получаем формулу для расчета $r_m = (C_a - C_x) / A - r_s - 0,5$.

Пигментный состав разновозрастных листьев березы измеряли с помощью спектрофотометра СФ-2000 (ОКБ «Спектр», Россия) в спиртовой вытяжке [Lichtenthaler, Wellbern, 1983]. Обработку экспериментальных данных проводили методами дисперсионного и корреляцион-

ного анализов. Проверку гипотез и оценку существенных различий между средними величинами осуществляли с помощью критерия Стьюдента при 5-процентном уровне значимости.

Результаты и обсуждение

Измерения фотосинтеза и транспирации производили в теплые безоблачные дни начала июля. Листья на завершающем этапе роста и закончившие рост выбирали преимущественно в верхних освещенных частях крон деревьев. Средние величины *ФАР*, показанные датчиком, направленным на солнце, составляли 1800–2100 мкмоль·м⁻²·с⁻¹, температура воздуха – 22–23 °С и 24–27 °С в утренние и дневные часы соответственно, относительная влажность – 46–53 %, дефицит водяного пара в воздухе 1,4–1,6 кПа. Данные условия являлись оптимальными для CO₂-газообмена березы [Дроздов и др., 1995; Болондинский, 2010].

Расчеты, проведенные по всему массиву полученных результатов, не показали существенной разницы между параметрами для *БК* и *БЛ*. Проявились тенденции более высокой транспирации и устьичной проводимости у *БЛ* по сравнению с *БК*. Мезофильная проводимость и продуктивность транспирации, напротив, были выше у *БК* (табл.). Средние значения фотосинтеза, рассчитанные для сформировавшихся и молодых листьев карельской березы, составили соответственно 12,05 ± 4,13 и 9,01 ± 4,17 мкмоль·м⁻²·с⁻¹, у березы повислой – 13,53 ± 4,44 и 10,84 ± 3,65 мкмоль·м⁻²·с⁻¹. При этом различия между молодыми и сформировавшимися листьями как у карельской березы, так и у березы повислой были значимыми. Ранее подобный результат мы получили на не испытывавших недостатка в почвенной влаге саженцах в вегетационных сосудах [Болондинский, Виликайнен, 2011]. В нашем эксперименте оказались также значимыми различия как между средними величинами *r_s* у сформировавшихся листьев березы повислой и карельской березы, так и величинами *r_m*.

Значения транспирации у сформировавшихся и молодых листьев карельской березы составляли соответственно 1,97 ± 0,94 и 1,48 ± 0,80 ммоль·м⁻²·с⁻¹, у березы повислой – 2,42 ± 0,81 и 2,04 ± 0,60 ммоль·м⁻²·с⁻¹. Просматривается тенденция более интенсивной транспирации у березы повислой. Значения устьичной проводимости для водяного пара составили у сформировавшихся и у молодых листьев карельской березы соответственно 0,36 ± 0,20 и 0,32 ± 0,15 см·с⁻¹, у березы повислой 0,53 ± 0,19 и 0,41 ± 0,19 см·с⁻¹. Снижение транспирации у молодых и сформиро-

ровавшихся листьев *БК* по сравнению с *БП* в значительной степени было обусловлено устьичной проводимостью. Однако значения фотосинтеза, а следовательно, и общего сопротивления диффузии CO_2 у разных форм березы для сформировавшихся листьев были близки, в то время как устьичная проводимость различалась в 1,4 раза и стабильность r_t обеспечивалась низкими значениями r_m . Проводимость мезофилла ($g = 1/r_m$) или проводимость молекул CO_2 в жидкой фазе при их прохождении через клеточные стенки, мембраны, цитозоль и двойную мембрану хлоропласта к местам карбоксилирования в строме определяется прежде всего активностью ферментов [Лайск и др., 1998]. Более низкая устьичная проводимость у листьев карельской березы могла быть обусловлена снижением скорости движения влаги по стволу из-за свилеватости структурных элементов древесины, значительного уменьшения числа сосудов, увеличения количества клеток запасающей паренхимы и других структурных нарушений [Новицкая, 2008]. Это приводило к повышенному сопротивлению движению влаги по стволу, что находило отражение в уменьшении g_s . С другой стороны, уменьшение устьичной проводимости у *БК*, возможно, было связано с регуляцией фотосинтетической функции в рамках целого растения, вызванной торможением камбиального роста [Каспарова, 2006]. Однако у *БК* за счет активизации процессов карбоксилирования фотосинтез не снижался, а оставался в среднем по кроне на достаточно высоком уровне. Данная особен-

ность карельской березы поддерживать определенное время повышенную концентрацию сахаров в точках роста, возможно, и вызывает нарушение ростовой функции и приводит к образованию паренхимных включений в ксилемную ткань [Новицкая, 2008].

Снижение фотосинтеза молодых листьев у обеих форм березы по сравнению со сформировавшимися примерно в 1,3 раза было обусловлено: у *БП* – уменьшением устьичной (в 1,2 раза) и мезофильной (в 1,3 раза) проводимости; у *БК* устьичная проводимость почти не изменялась, в то время как мезофильная проводимость уменьшалась почти в 2,1 раза (табл.). Меньшее содержание хлорофилла (*Хл*) у молодых по сравнению с закончившими рост листьями являлось второй причиной более низкого поглощения ими CO_2 . Содержание *Хл а* в среднем уменьшалось у молодых листьев по сравнению со сформировавшимися в 1,8 и 1,7 раза у *БК* и *БП* соответственно, а *Хл b* – в 1,1 и 1,2 раза.

Сформировавшиеся листья *БК* имели в 1,3 раза более высокую мезофильную проводимость, чем листья березы повислой. Устьичная же проводимость у *БП* в 1,3 раза превышала таковую у *БК*. В результате суммарная проводимость (g_t), как и обратная величина – общее сопротивление диффузии CO_2 (r_t), у обеих форм березы были близки. Наблюдалась, как это показано в литературе [Корзухин и др., 2004], обратная зависимость g_s и g_m . У молодых листьев разница в величинах мезофильной проводимости была не столь существенной.

Средние значения фотосинтеза, транспирации и рассчитанных параметров листьев карельской березы и березы повислой

Параметры	<i>P</i>	<i>E</i>	r_s	g_s	r_m	g_m	r_t	r_s/r_t	<i>P/E</i>
	мкмоль·м ⁻² ·с ⁻¹	мкмоль·м ⁻² ·с ⁻¹	с·см ⁻¹	см·с ⁻¹	с·см ⁻¹	см·с ⁻¹	с·см ⁻¹	-	мкмоль CO_2 (ммоль H_2O) ⁻¹
Карельская береза									
М	11,39	1,86	4,8	0,25	7,3	0,21	12,6	0,40	7,4
δ	4,28	0,92	2,2	0,10	3,6	0,17	3,8	0,18	3,7
Береза повислая									
М	12,30	2,27	3,9	0,31	7,5	0,15	11,9	0,33	5,6
δ	3,38	0,75	1,8	0,11	2,8	0,06	3,6	0,10	1,5
Карельская береза, молодые листья									
М	9,01	1,48	4,0	0,26	11,2	0,11	15,7	0,27	8,5
δ	3,17	0,80	0,6	0,04	3,2	0,08	3,6	0,08	5,8
Карельская береза, сформировавшиеся листья									
М	12,05	1,97	5,1	0,25	6,2	0,23	11,8	0,44	7,2
δ	4,13	0,94	2,5	0,11	2,9	0,11	3,5	0,18	2,9
Береза повислая, молодые листья									
М	10,36	2,04	4,4	0,27	8,8	0,13	13,7	0,32	5,2
δ	3,65	0,60	1,9	0,10	2,9	0,05	3,8	0,10	1,4
Береза повислая, сформировавшиеся листья									
М	13,53	2,42	3,6	0,33	6,6	0,17	10,7	0,33	5,9
δ	4,44	0,81	1,8	0,12	2,4	0,06	3,1	0,11	1,6

Примечания. *P*, *E*, g_s , g_m – средние значения (М) нетто-фотосинтеза, транспирации, устьичной и мезофильной проводимости для CO_2 ; r_s , r_m , r_t – устьичное, мезофильное и общее сопротивление диффузии CO_2 соответственно; r_s/r_t – доля устьичного сопротивления в общем сопротивлении диффузии CO_2 ; *P/E* – продуктивность транспирации; δ – стандартное отклонение

Большой разброс значений фотосинтеза и транспирации листьев по кронам был вызван целым рядом факторов. Внешние факторы были достаточно стабильны, так как измерения проводились в солнечные дни. Значения $ФАР$, измеряемые датчиком, наведенным на солнце, практически не изменялись во времени, однако некоторые листья перед измерениями находились в полутени, а замеры фотосинтеза на них проводили при полном освещении. В ряде случаев листья реагировали на такую смену освещенности небольшим снижением фотосинтеза. Наблюдались слабые изменения температуры воздуха, D и r_s , значения которых возрастали примерно на 10–15 % к 15 часам по сравнению со значениями в 10–11 часов. Фотосинтез листьев в нижней части кроны был в среднем на 20 % ниже, чем в верхней. Побеги брахибластов поглощали CO_2 менее интенсивно, чем побеги ауксибластов. Из трех деревьев карельской березы лишь одно имело признаки узорчатой древесины. У двух других признаки «карелистости» были выражены очень слабо. Все эти факторы увеличивали вариабельность значений фотосинтеза и транспирации. Еще одна причина повышенной вариабельности, на наш взгляд, кроется в том, что листья *БК* вынуждены значительную часть времени работать в гиперфункциональном режиме. В целом такое состояние наблюдается у всех растений в период интенсивного роста. В соответствии с высоким уровнем запросов на ассимиляты возрастает и метаболическая нагрузка на фотосинтетический аппарат [Мокронос, 1981]. Работа фотосинтетического аппарата в гиперфункциональном состоянии не может продолжаться длительное время, и за очень высоким поглощением CO_2 следует спад фотосинтетической активности. Мезофильная проводимость была у некоторых листьев при низком фотосинтезе более чем в два раза ниже среднего уровня. Возможно, именно поэтому коэффициент вариации для данного параметра у карельской березы достигал очень большого значения – 62,4 %, в то время как у березы повислой он был существенно ниже. Устьичная проводимость также имела более высокий коэффициент вариации у карельской березы (37 %) по сравнению с березой повислой (12,6 %).

Фотосинтез у карельской березы в ряде измерений достигал значительных величин, но наблюдалась его большая вариабельность у различных листьев. Хотя мы старались выбирать освещенные листья, разброс данных по кронам деревьев был очень существенным. Максимальное значение фотосинтеза у березы повислой составили 21,8 $мкмоль·м^{-2}·с^{-1}$, у ка-

рельской березы – 28,3 $мкмоль·м^{-2}·с^{-1}$. При этом у карельской березы в один из дней на 40 измерений было зафиксировано 8 случаев, когда фотосинтез превышал 20 $мкмоль·м^{-2}·с^{-1}$, а у березы повислой – всего три. Коэффициенты вариации значений фотосинтеза у карельской березы и березы повислой составляли соответственно 44,8 и 33,6. Для молодых листьев коэффициенты вариации также были высоки.

Хотя средние значения фотосинтеза у *БК* поддерживались на уровне фотосинтеза *БП* за счет интенсивных обменных процессов, устьичная регуляция была достаточно высокой и отношение r_s/r_t составило у *БК* 44 %, в то время как у *БП* она была ниже – 33 %. Примерно в 30 % измерений r_s/r_t было больше 50 %, то есть устьичная регуляция являлась основной. Коэффициент корреляции P и r_s составил для сформировавшихся листьев *БК* и *БП* 0,50 и 0,62 соответственно, для молодых – 0,62 и 0,67. В целом механизм устьичного ограничения фотосинтеза у *БК* функционировал, но поглощение углекислоты не уменьшалось из-за повышенной мезофильной проводимости, и у *БК* какое-то время концентрация сахаров в камбиальной зоне поддерживалась на высоком уровне [Галибина и др., 2011].

Выводы

1. Средние величины фотосинтеза карельской березы и березы повислой, рассчитанные более чем по ста измерениям в освещенной части кроны деревьев, близки друг к другу. Транспирация и устьичная проводимость у листьев карельской березы в среднем на 25 % ниже, чем у березы повислой.

2. У карельской березы, несмотря на снижение устьичной проводимости, фотосинтез оставался на уровне березы повислой, что было обусловлено значительной величиной мезофильной проводимости и указывает на высокий уровень процессов карбоксилирования. Возможно, это вызвано нарушениями регуляции фотосинтеза в рамках целого растения, в результате чего, несмотря на повышенную концентрацию сахаров в камбиальной зоне, не происходило его снижения.

3. Продуктивность транспирации у листьев карельской березы была в среднем на 32 % выше, чем у березы повислой. Более экономный расход почвенной влаги у карельской березы по сравнению с березой повислой может способствовать сохранению у нее высокого фотосинтеза на начальных этапах засухи.

4. Причиной более низкого фотосинтеза у листьев, заканчивающих рост, по сравнению с уже сформировавшимися было не только

уменьшение содержания хлорофилла, но и более низкие значения устьичной и мезофильной проводимости.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 13-04-00827А).

Литература

Барри Д. А., Даунтон У. Д. С. Зависимость фотосинтеза от факторов окружающей среды // В кн.: Фотосинтез / Под ред. Говинджи. М.: Мир, 1987. Т. 2. С. 273–364.

Болондинский В. К. Исследование зависимости фотосинтеза от интенсивности солнечной радиации, температуры и влажности воздуха у растений карельской березы и березы повислой // Труды КарНЦ РАН. 2010. № 2. С. 3–10.

Болондинский В. К. Устьичная регуляция фотосинтеза у сосны обыкновенной // Материалы Всероссийской конференции «Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века». Часть 6. Экологическая физиология и биохимия растений. Петрозаводск, 2008. С. 15–17.

Болондинский В. К., Виликайнен Л. М. Исследование световой зависимости фотосинтеза у саженцев березы в норме и в условиях почвенной засухи // Материалы междунар. конференции «Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействием факторов среды». Петрозаводск, 2011. С. 38–42.

Галибина Н. А., Красавина М. С., Новицкая Л. Л., Софронова И. Н. Ферменты метаболизма сахарозы при формировании аномалий карельской березы // Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействи-

ем факторов среды. Петрозаводск: КНЦ РАН, 2011. С. 79–84.

Дроздов С. Н., Попов Э. Г., Курец В. К., Таланов А. В., Обшатко Л. А., Ветчинникова Л. В. Влияние света и температуры на нетто-фотосинтез и дыхание *Betula pendula* var. *pendula* и *Betula pendula* var. *carelica* (Betulaceae) // Бот. журн. 1995. Т. 80, № 3. С. 60–64.

Каспарова И. С. Эпигенетическая регуляция фотосинтетической ассимиляции O_2 у хлопчатника. Автореферат дис. ... канд. биол. наук, 2006. 27 с.

Корзухин М. Д., Выгодская Н. Н., Милюкова И. М., Татаринцев Ф. А., Цельникер Ю. Л. Применение объединенной модели фотосинтеза и устьичной проводимости для анализа ассимиляции CO_2 ели и лиственницы в лесах России // Физиол. раст. 2004. Т. 51, № 3. С. 341–354.

Лайск А., Расулов В. Г., Лорето Ф. Исследование теплового повреждения фотосинтеза методами газообмена и флуоресценции хлорофилла // Физиология растений. 1998. Т. 45. С. 489–499.

Мокронос А. Т. Онтогенетический аспект фотосинтеза. М.: Наука, 1981. 196 с.

Новицкая Л. Л. Карельская береза: механизмы роста и развития структурных аномалий. Петрозаводск, 2008. 143 с.

Цельникер Ю. Л. Физиологические основы теневыносливости древесных растений. Л.: Наука, 1978. 215 с.

Lichtenthaler H. K., Wellburn A. R. Determination of Total Carotenoids and Chlorophylls a and b of Leaf Extracts in Different Solvents // Biochemical Society Transactions. 1983. Vol. 11. P. 591–592.

Eichelmann H., Oja V., Rasulov B., Padu E., Bichele I., Pettai H., Mols T., Kasparova I., Vapaavuori E. & Laisk A. Photosynthetic parameters of birch (*Betula pendula* Roth) leaves growing in normal and in CO_2 and O_3 -enriched atmospheres // Plant, Cell and Environment. 2004. Vol. 27. P. 479–495.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Болондинский Виктор Константинович

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: bolond@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 768160

Холопцева Екатерина Станиславовна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: holoptseva@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 762712

Bolondinskii, Victor

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: bolond@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 768160

Kholoptseva, Ekaterina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910
Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: holoptseva@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 762712

УДК 639.3041.2:597.552.511

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ НОВОЙ КОНСТРУКЦИИ ГНЕЗДА-ИНКУБАТОРА ЛОСОСЕВОЙ ИКРЫ В РЕЧНЫХ УСЛОВИЯХ

**А. Е. Веселов¹, Д. С. Павлов², М. А. Скоробогатов², Д. А. Ефремов¹,
Г. А. Нагирняк³, М. А. Ручьев¹**

¹Институт биологии Карельского научного центра РАН

²Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН

³Варзугский НИЦ полярных экосистем

Применительно к речным условиям разработана и испытана новая конструкция гнезда-инкубатора лосося икры с выносным водозаборником для питания устройства естественно очищенным подрусловым потоком (патент на полезную модель № 110229). В инкубационной камере использованы индивидуальные лунки, в которые размещается омываемая потоком икра. Лунки закрыты слоем гальки, имитирующей условия выхода личинок на поверхность грунта. В опыте использована искусственно оплодотворенная икра пресноводного лосося. Испытания проходили с середины октября по первую декаду июня на пороге р. Лижма (бассейн Онежского озера). Эффективность выклева жизнестойких личинок достигла 83–96 %.

Ключевые слова: атлантический лосось, инкубация икры, гнездо-инкубатор.

**A. E. Veselov, D. S. Pavlov, M. A. Skorobogatov, D. A. Yefremov,
G. A. Nagirnyak, M. A. Ruch'ev. RESULTS OF TRIALS OF A NEW DESIGN
OF THE SALMON EGGS INCUBATION REDD IN FLUVIAL SETTINGS**

A new design of the salmon eggs incubation redd suited to fluvial conditions, fitted with a remote water intake device to feed naturally filtered underflow to the redd was developed and tested (utility model patent № 110229). The incubation chamber had individual wells to hold flow-bathed eggs. The wells were topped with a layer of gravel to simulate fry emergence conditions. The experiment was staged with artificially fertilized land-locked salmon eggs. The trials were carried out in a rapid in the Lizhma River (Lake Onega catchment) and lasted from mid-October to the first ten days of June. The hatching success of viable fry was 83–96 %.

Key words: Atlantic salmon, egg incubation, incubation redd.

Введение

В нашей стране и за рубежом уже более полувека интенсивно ведется разработка устройств, позволяющих инкубировать икру лосося в реках [Кузнецов, 1923; Гринюк, 1971; Vams, 1985; Donaghy, Verspoor, 2000; Лу-

пандин и др., 2005; Dumas, Marty, 2006; Веселов и др., 2007, 2011; Pander et al., 2009; Павлов и др., 2009, 2010]. Эти устройства позволяют получить непосредственно на местах будущего обитания жизнестойких личинок лосося, которые расселяются самостоятельно и далее их развитие происходит на естественной кормо-

вой базе. Вместе с тем устройства-инкубаторы, применяемые в странах с умеренным и теплым климатом (Германия, Франция), где на реках нет устойчивого ледового покрова, являются обслуживаемыми – в них периодически заменяют фильтры и удаляют погибших личинок [Der Lachs..., 2005]. Для сурового климата Северо-Запада России и длительного периода ледостава обслуживаемые устройства непригодны. Это означает, что в течение всего периода инкубации для омыwania икринок необходимо сохранить поступление чистой воды.

Мы продолжили поиски оптимальной системы водозабора естественно очищенного подруслового потока, а также совершенствование внутренней схемы проточности гнезда и индивидуальных лунок для икры. С этой целью разработана новая конструкция гнезда-инкубатора, защищенная патентом на полезную модель (№ 110229 «Устройство для инкубации икры лососевых рыб в естественных условиях»), в которой учтен предыдущий опыт проектирования подобных устройств.

Материалы и методы

Испытания гнезд-инкубаторов проводились с 29 октября 2010 г. по 6 июня 2011 г. на нижнем пороге лососевой нерестовой реки Лижма (62°22'39" с. ш., 34°29'47" в. д.). Использована икра шуйской популяции пресноводного лосося, оплодотворенная на рыбопункте Карельской рыболовной станции. Обе реки относятся к бассейну Онежского озера. Гнезда-инкубаторы устанавливались на глубине 0,7–0,8 м в двух метрах от берега. Полученные в конце опыта личинки лосося собирались в верхних накопителях гнезд-инкубаторов, выходные патрубки которых были закрыты сеткой (рис. 1). Этим не допускалось расселение личинок, обеспечивался точный учет выживших мальков и оценка состояния их развития по степени подвижности и рассасыванию желточного мешка.

Конструкции гнезд-инкубаторов

Испытываемые устройства состояли из выносного водозаборника и основного корпуса инкубатора, которые были соединены между собой гофрированной, устойчивой к смятию грунтом трубкой (рис. 1, 2).

Водозаборник представлял собой заглушенную с обоих концов вставками пластиковую трубку диаметром 50 мм и длиной 500 мм, которая была перфорирована с фронтальной к подрусловому потоку стороны. Водозаборник и соединительная гофрированная трубка длиной 1, 2 и 3 м для трех устройств (далее по длине

трубки будут нумероваться устройства), закапывались в грунт впереди гнезда-инкубатора. Вода поступала в водозаборник и затем по трубке – в корпус устройства. За счет перепада уровня, обеспечиваемого естественным уклоном порога, в испытываемых гнездах возникала проточность. Чем длиннее трубка, тем проточность была больше. Опытным путем, с применением красителя, впрыскиваемого в водозаборник, установлено, что если у поверхности скорость течения в реке 0,9–1,1 м/с, то расход воды, проходящей через гнездо-инкубатор, составлял для трубки длиной 1 м – 4,17 см³/с, при длине 2 м – 6,25 см³/с, а при длине 3 м – 12,5 см³/с.

Основной корпус гнезда-инкубатора разделен пластиной с лунками на две части. В нижнюю часть, или отстойник, очищенная вода поступает из водозаборника. Затем она проходит через лунки с инкубируемой в них икрой, далее через покровную гальку попадает в верхнюю накопительную камеру. Из нее вода вытекает по выпускному патрубку наружу (рис. 1). Вылупившиеся и окрепшие личинки протискиваются через слой покровной гальки в накопительную камеру, откуда они могут выплывать через выходной патрубок и расселяться в придонном межгалечном пространстве дна реки.

В лунки инкубационной пластины каждого гнезда закладывалось около 100 оплодотворенных икринок лосося. Точное их количество определялось по сделанным фотографиям. Пластина закреплялась в корпусе устройства. Сверху на лунки слоем 20 мм засыпалась покровная галька (диаметром 12–15 мм) и гнездо закрывалось крышкой. Расстояние от покровной гальки до крышки составляло около 15–18 мм, этого было достаточно для образования пространства накопительной камеры.

Устойчивое удержание гнезд-инкубаторов на дне надежно обеспечивалось весом покровной гальки. Корпуса устройств были выкрашены в черный цвет, что делало их незаметными.

Результаты испытаний и обсуждение

Промежуточную проверку процесса инкубации проводили 3 мая, подняв и вскрыв гнездо-инкубатор № 1 с коротким шлангом. Установлено, что личинки несколько дней назад вылупились из икры и находились в своих лунках. Они имели яркую оранжево-желтую окраску и крупный жировой мешок, лежали на боку и изредка совершали движения хвостовым стеблем, что приводило к их переворачиванию. Температура воды в реке к этому времени повысилась до 2,2 °С, ледовый покров сошел. Отметим, что полного учета выклюнувшихся

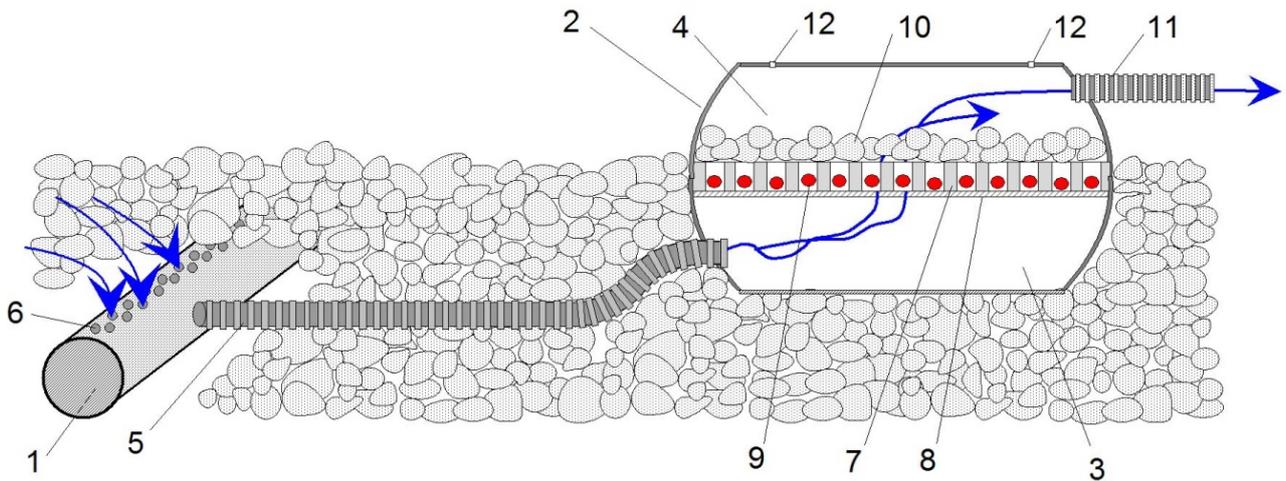


Рис. 1. Схема конструкции гнезда-инкубатора: 1 – выносной водозаборник, 2 – основной корпус, 3 – отстойник, 4 – накопительная камера, 5 – гофрированная трубка, 6 – перфорация, 7 – пластина с лунками, 8 – защитная сетка, 9 – икра, 10 – покровная галька, 11 – выходной патрубок, 12 – дренажные отверстия.



Рис. 2. Конструкция гнезда-инкубатора и установка его на дне реки

личинок в устройстве не проводили, т. к. открывали только часть покровной гальки. Затем гнездо было собрано и установлено на прежнее место с подсоединением гофрированной трубки водозаборника.

Полная проверка результатов инкубации икры в испытываемых устройствах была выполнена 6 июня. К этому времени вода в реке прогрелась до 10–11 °С. Со дна были подняты все три гнезда и открыты. Предварительно под

водой отсоединяли трубки водозаборников, а отверстия соединительных патрубков затыкали пробкой, удерживая воду в устройствах для предотвращения обсыхания личинок.

Почти все личинки в трех гнездах находились в накопительных отсеках. Они активно плавали, желточный мешок к этому времени полностью рассосался, спинка тела имела темно-серую окраску. После снятия покровной гальки установлено, что единичные личинки остались в лунках всех трех гнезд.

Гнездо-инкубатор № 1. В это устройство на инкубацию было заложено 96 икринок. Из них 4 остались в своих лунках и погибли (4 %), не пройдя все стадии эмбриогенеза. Остальные личинки были обнаружены в накопительной камере, где они активно плавали. Эффективность инкубации в этом устройстве оказалась самой высокой – 96 %.

Гнездо-инкубатор № 2. Из 93 икринок вылупилось 85 личинок, из них одна погибла в накопительном отсеке. В лунках осталось 7 икринок. Всего погибло 8 эмбрионов (9 %). Эффективность инкубации составила 91 %.

Гнездо-инкубатор № 3. Из 97 заложенных на инкубацию икринок погибло 16 (17 %). Эффективность инкубации составила 83 %.

Испытаниями установлено, что из трех инкубационных устройств, находящихся в одинаковых гидрологических условиях, наибольший выход жизнеспособных личинок лосося наблюдался в гнезде № 1. Отличительными особенностями новых гнезд-инкубаторов были: зарываемый в грунт выносной водозаборник, присоединяемый к корпусу шлангом, и покровная галька, отделяющая лунки с икрой от накопительного отсека. Как показала практика, питание устройства чистой водой из подрусового потока, а также сохранение икринок в индивидуальных лунках гарантирует высокий процент выклева и выхода в естественную среду личинок лососевых рыб [Лупандин и др., 2005; Веселов и др., 2007, 2011; Павлов и др., 2009, 2010].

В устройстве № 1 длина соединяющего водозаборник с корпусом шланга составляла 1 м, что позволило создавать скорость обтекания икринок в лунках 0,056 см/с. При более высоких скоростях течения, имеющих место в устройствах № 2 и 3 (длина шланга 2 и 3 м), значительно увеличивался процент гибели эмбрионов. Наибольший отход эмбрионов был обнаружен в гнезде-инкубаторе № 3 с самым высоким расходом воды – 12,5 см³/с. Здесь же наблюдалось покрытие погибших икринок мелкодисперсным илом, который проникал через зарытый в грунт водозаборник, частично оседая в отстойнике. Причем слой ила в отстойни-

ке достигал половины его объема. В устройстве № 2, с расходом 6,25 см³/с, также отмечен отход эмбрионов и заполнение илом отстойника, однако всего на 1/5 объема.

По-видимому, более важной характеристикой является не общая проточность устройства, а индивидуальная в лунках. Так, в каждой инкубационной пластине было высверлено по 100 лунок. Скорость течения в лунках зависела от диаметра входного отверстия на дне лунки. В нашем случае он составляет 12 мм, соответственно, с учетом расходов 4,17; 6,25 и 12,5 см³/с, скорость течения в лунках гнезда № 1 была 0,056 см/с, № 2 – 0,075 см/с, № 3 – 0,15 см/с.

Если сравнивать эти значения со скоростью подрусового потока в нерестовых гнездах лосося (0,03–1,2 см/с), то окажется, что скорость течения в устройствах находится в пределах природных значений, найденных В. Н. Леманом и Л. Б. Кляшториным [1987]. Это условие обеспечивает незаиливаемость икринок в естественном гнезде нерестового бугра и достаточную проточность для дыхания эмбрионов и оттока метаболитов [Леман, Кляшторин, 1987; Tonina, Buffington, 2009].

С помощью покровной гальки достигался необходимый вес устройства, позволяющий ставить гнездо на грунт без специального крепежа. Другая ее функция заключалась в имитации естественных условий выхода личинок на поверхность грунта, как это происходит в природных условиях [Phillips, Koski, 1969; Гринюк, 1971; Веселов, Калюжин, 2001]. Личинки успешно преодолевали гальку в испытываемых устройствах и собирались в накопителе. Затем они могли бы (при отсутствии защитной сетки) свободно покинуть устройство через выходной патрубок и самостоятельно расселиться по участкам обитания, как это нами было показано в эксперименте на р. Суна [Веселов и др., 2011].

Заключение

Таким образом, разработан новый тип гнезда-инкубатора с выносным водозаборником. Гнезда с оплодотворенной икрой атлантического лосося устанавливались на пороговый нерестово-выростной участок лососевой реки. Опытным путем была определена необходимая проточность гнезда и индивидуальных лунок для икринок. Испытания показали: при расходе воды в устройствах 4,17–12,5 см³/с скорость течения в лунках гнезд изменяется от 0,056 см/с до 0,15 см/с, что позволяет достичь эффективности инкубации 83–96 %. Полученный результат указывает на перспективность разработанной конструкции гнезда-инкубатора.

Работа выполнена по программе Отделения биологических наук «Биологические ресурсы России: динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий» (тема: «Разработка инновационной технологии и эффективных конструкций гнезд-инкубаторов для интенсивного воспроизводства лососевых рыб в реках», 2012–2014 гг.); при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (госконтракты 02.740.11.0280, 14.740.11.0165, 16.740.11.0174); Программы Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-719.2012.4; гранта Президента РФ 3682.2011.4.

Литература

- Веселов А. Е., Калюжин С. М. Экология, поведение и распределение молоди атлантического лосося // Петрозаводск: Карелия, 2001. 160 с.
- Веселов А. Е., Аликов Л. В., Скоробогатов М. А., Зубченко А. В., Калюжин С. М., Шустов Ю. А., Потуткин А. Г. Искусственная инкубация икры атлантического лосося *Salmo salar* L. в естественных условиях // Труды Карельского научного центра РАН. Вып. 11. Петрозаводск: КарНЦ РАН. 2007. С. 14–20.
- Веселов А. Е., Павлов Д. С., Скоробогатов М. А., Ефремов Д. А., Белякова Е. Н., Потапов К. Ю. Опыт искусственной инкубации икры атлантического лосося (*Salmo salar* L.) в р. Суне (бассейн Онежского озера) // Труды КарНЦ РАН. Серия «Экспериментальная биология». 2011. № 3. С. 28–38.
- Гринюк И. Н. Результаты опыта по разведению семги методом посадки икры на ранней стадии ее развития в искусственные гнезда. Фонды ПИНРО, № 2881. 1971. 11 с.
- Кузнецов И. И. Значение промысла лососевых Дальнего Востока и искусственное рыбозаведение как одно из главных средств для охранения рыбных запасов // Рыбные и пушные богатства Дальнего Востока: сб. статей. Владивосток: изд. Научпромбюро Дальрыбохоты, 1923. С. 134–214.
- Леман В. Н., Кляшторин Л. Б. Оценка состояния нерестилищ тихоокеанских лососей: методические указания. М.: ротопринт ВНИРО, 1987. 28 с.
- Лупандин А. И., Павлов Д. С., Веселов А. Е., Калюжин С. М. Искусственное воспроизводство атлантического лосося (*Salmo salar*) в естественных условиях // Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами. М: КМК, 2005. С. 434–445.
- Павлов Д. С., Скоробогатов М. А., Веселов А. Е., Калюжин С. М. Устройство для инкубации икры в естественных условиях. Патент на полезную модель № 83687. Заявка № 2008144253 от 20 июня 2009 г. 2009. 4 с.
- Павлов Д. С., Скоробогатов М. А., Веселов А. Е., Калюжин С. М. Способ инкубации икры в искусственных гнездах-инкубаторах, устанавливаемых в реках. Патент на полезную модель № 99688. Заявка № 2010124239, приоритет от 16 июня 2010 г. 2010. 4 с.
- Павлов Д. С., Веселов А. Е., Скоробогатов М. А., Волков Б. А. Устройство для инкубации икры лососевых рыб в естественных условиях. Заявка № 2011120652/13 от 20 мая 2011. 4 с.
- Bams R. A. Comparison of Three Instream Incubation Techniques for Coho Salmon // North American Journal of Fisheries Management. 1985. № 5. P. 159–172.
- Der Lachs kehrt zurück. Stand der Wiederansiedlung in Rheinland-Pfalz / Redaktion: Brenner T., Schneider J. (BFS). Ministerium für Umwelt und Forsten Rheinland-Pfalz (MUF). 2005. Mainz. 63 s.
- Donaghy M. J., Verspoor E. A New Design of Instream Incubator for Planting Out and Monitoring Atlantic salmon Eggs // North American Journal of Fisheries Management. 2000. N 20. P. 521–527.
- Dumas J., Marty S. A new method to evaluate egg-to-fry survival in salmonids, trials with Atlantic salmon // Journal of Fish Biology 68. 2006. P. 284–304.
- Pander J., Schnell J., Sternecker K., Geist J. The «egg sandwich» a method for linking spatially resolved salmonid hatching rates with habitat variables in stream ecosystems // Journal of Fish Biology 74. 2009. P. 683–690.
- Phillips R. W., Koski K. V. A fry trap method for estimating salmonid survival from egg deposition to fry emergence // Journal of the Fisheries Research Board of Canada. 1969. N 26. P. 133–141.
- Tonina D., Buffington J. M. A three-dimensional model for analyzing the effects of salmon redds on hyporheic exchange and egg pocket habitat // Canadian Journal Fish and Aquatic Science. Vol. 66. P. 2157–2173.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Веселов Алексей Елпидифорович

главный научный сотрудник, д. б. н., проф.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: veselov@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 767812

Павлов Дмитрий Сергеевич

директор, академик РАН
Институт проблем экологии и эволюции
им. А. Н. Северцова РАН
Ленинский пр., 33, Москва, Россия, 119071
эл. почта: pavlov@sevin.ru
тел.: (495) 9522088

Veselov, Aleksey

Institute of Biology, Karelian Research Centre
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: veselov@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 767812

Pavlov, Dmitry

Institute of Ecology and Evolution,
Russian Academy of Sciences
33 Leninskii pr., 119071 Moscow, Russia
e-mail: pavlov@sevin.ru
tel.: (495) 9522088

Скоробогатов Михаил Александрович
ведущий научный сотрудник, д. т. н., проф.
Институт проблем экологии и эволюции
им. А. Н. Северцова РАН
Ленинский пр., 33, Москва, Россия, 119071
эл. почта: skorobogatov1@rambler.ru
тел.: (495) 9522088

Ефремов Денис Александрович
научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: denisefremov@list.ru
тел.: (8142) 769810

Ручьев Михаил Андреевич
аспирант
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: lsstyle@yandex.ru
тел.: (8142) 769810

Skorobogatov, Mikhail
Institute of Ecology and Evolution,
Russian Academy of Sciences
33 Leninskii pr., 119071 Moscow, Russia
e-mail: skorobogatov1@rambler.ru
tel.: (495) 9522088

Yefremov, Denis
Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: denisefremov@list.ru
tel.: (8142) 769810

Ruch'ev, Mikhail
Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: lsstyle@yandex.ru
tel.: (8142) 769810

УДК 591.128.4+597.017.03

ВЕРХНЯЯ ЛЕТАЛЬНАЯ ТЕМПЕРАТУРА У МОЛОДИ ТЕПЛОЛЮБИВЫХ ВИДОВ РЫБ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ АККЛИМАЦИИ

Д. С. Капшай, В. К. Голованов

Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН

Экспериментально установлены значения верхней летальной температуры у молоди серебряного карася, сазана (обыкновенного карпа) и головешки-ротана – наиболее теплолюбивых видов рыб, обитающих в пресных водоемах Северо-Запада России. Диапазон исходной температуры акклимации составил от 4 до 32 °С. У всех исследованных видов с ростом температуры акклимации наблюдалось увеличение значений критического термического максимума (КТМ) и летальной температуры (ЛТ). При акклимации к температуре 4 °С максимальные значения КТМ и ЛТ отмечены у серебряного карася и головешки-ротана, при акклимации к температуре 32 °С – у серебряного карася и карпа. Увеличение значений КТМ с ростом температуры акклимации на 1 °С составило в среднем от 0,43 °С. Полученные значения КТМ и ЛТ у молоди данных видов рыб могут быть использованы при разработке критериев тепловой нагрузки на пресноводные водоемы в районах сброса подогретых вод тепловых и атомных станций, а также при действии аномально высокой температуры в естественных водоемах.

К л ю ч е в ы е с л о в а : рыбы, температура акклимации, термоустойчивость, верхняя летальная температура, критический термический максимум, летальная температура, хронический летальный максимум.

D. S. Kapshaj, V. K. Golovanov. UPPER LETHAL TEMPERATURE IN THE YOUNG OF THERMOPHILIC FISH DEPENDING ON THE ACCLIMATION TEMPERATURE

The values of the upper lethal temperature in young Prussian carp, common carp and Amur sleeper – the most thermophilic fish species living in freshwaters of Northwest Russia, were experimentally established. The initial fish acclimation temperature ranged from 4 to 32 °C. The critical thermal maximum and the lethal temperature values in all the investigated species increased at higher acclimation temperatures. At acclimation to a minimal temperature of 4 °C the most resistant were the Prussian carp and Amur sleeper; at acclimation to an abnormally high temperature of 32 °C the highest values of the critical thermal maximum and the lethal temperature were observed in Prussian carp and common carp. The critical thermal maximum increased by an average of 0.43 °C with every °C of rising acclimation temperature. The resultant values of upper lethal temperatures in juveniles of the given fish species can be used in developing the criteria for thermal pressure on freshwater bodies in areas with hot water plumes from heat and nuclear power stations, as well as where abnormal high temperature occurs in natural waters.

K e y w o r d s : fish, acclimation temperature, temperature resistance, upper lethal temperature, critical thermal maximum, lethal temperature, chronic lethal maximum.

Введение

Верхняя температурная граница жизнедеятельности рыб, обитающих в пресноводных водоемах России, находится в диапазоне от 30 до 40 °С [Голованов, 2009, 2012; Голованов и др., 1997]. В условиях «термального загрязнения» в районах сброса подогретых вод атомных и тепловых электростанций, число которых постоянно увеличивается, а также крупных промышленных предприятий верхняя летальная температура (ВЛТ) рыб может возрасти до максимально возможной [Power plants..., 1980; Шмидт-Ниельсен, 1982; Алабастер, Ллойд, 1984; Озернюк, 2000; Beitinger et al., 2000; Голованов, 2012]. В случае аномальной ситуации, которая наблюдалась на многих пресноводных водоемах Северо-Запада России в жаркое лето 2010 г., максимальный уровень ВЛТ был достигнут для окуневых и осетровых видов рыб, что приводило к их гибели как в естественных водоемах, так и в рыбоводных хозяйствах на подогретых водах. Вопрос о том, до какого предела может повышаться ВЛТ у разных видов пресноводных рыб, в том числе и у видов-вселенцев, изучен недостаточно, а такая информация представляет не только теоретический, но и практический интерес.

Цель настоящей работы – определение верхней сублетальной (по критерию критический термический максимум – КТМ) и летальной температуры (ЛТ) у молоди серебряного карася *Carassius carassius* (L.), сазана или обыкновенного карпа *Cyprinus carpio* (L.) и головешки-ротана *Perccottus glenii* Dybowski при акклимации в широком диапазоне температуры от 4 до 32 °С.

Материалы и методы

Работа выполнена в летне-осенний сезон 2010–2012 гг. на молоди наиболее теплолюбивых пресноводных видов рыб. Серебряный карась и головешка-ротан отловлены в прудах на побережье Рыбинского водохранилища. Карп выращен в прудах на стационаре полевых и экспериментальных работ «Сунога» Института биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН. Длина тела и масса сеголетков составляла $48,6 \pm 1,4$ мм ($37,5 - 68,9$ мм), $3,8 \pm 0,4$ г ($1,2 - 9,1$ г) у серебряного карася, $61,9 \pm 1,8$ мм ($42,4 - 68,3$ мм), $8,2 \pm 0,8$ г ($2,6 - 10,6$ г) у карпа и $53,4 \pm 1,0$ мм ($40,2 - 67,9$ мм), $2,3 \pm 0,2$ г ($1,2 - 3,8$ г) у головешки-ротана. Всего исследовано 180 экз.

рыб (по 60 экз. каждого вида). Температура предварительной акклимации всех рыб составляла 4, 12, 20, 28 и 32 °С, время акклимации – 10 суток [Голованов, 2012] при естественном фотопериоде. В течение акклимации всех рыб кормили 1–2 раза в сутки живым зоопланктоном и личинками хирономид в объеме 5–10 % от общей массы тела.

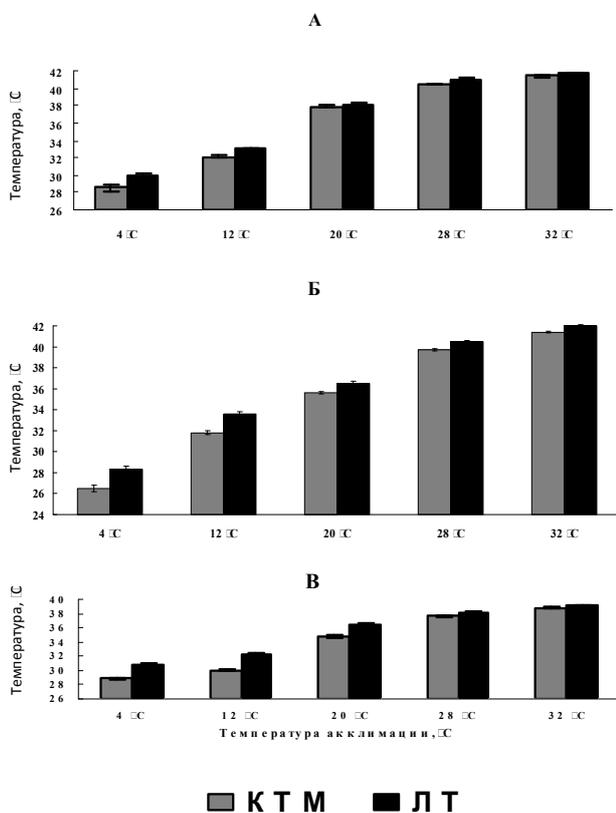
При определении КТМ и ЛТ группу рыб (по 6 экз. в каждой, две повторности) помещали в экспериментальный аквариум объемом 60 л, оборудованный системой нагрева и аэрации. Температуру воды в опытном аквариуме повышали со скоростью 8–10 °С/ч до нарушения локомоторной функции рыб – переворота на бок или кверху брюшком, сублетальное значение температуры фиксировали как КТМ [Becker, Genoway, 1979]. При прекращении нагрева и переносе рыб в воду с температурой на 3–4 °С ниже они сохраняли жизнеспособность. Продолжая нагрев до момента прекращения движения жаберных крышек, мы фиксировали значение ЛТ по этому показателю. Продолжительность эксперимента при скорости нагрева 8–10 °С/ч зависела от температуры предварительной акклимации молоди рыб. Все опыты проводились в условиях естественного фотопериода. Более подробно методика описана ранее [Голованов, 2012; Голованов и др., 2012].

Данные обработаны статистически с помощью пакета прикладных программ Statgraphics Plus 5.1 и Excel 2003. Результаты представлены в виде средних и их ошибок ($M \pm m$). При парном сравнении результатов достоверность различий между ними оценивали по критерию Стьюдента (t) при уровне значимости $p < 0,05$ [Sokal, Rolf, 1995].

Результаты и обсуждение

У всех исследованных видов наблюдается достоверный рост значений КТМ и ЛТ с повышением температуры акклимации от 4 до 32 °С (рис.). Так, у карася значение КТМ возрастает от 28,5 до 41,4 °С, у карпа – от 26,5 до 41,4 °С, у головешки-ротана – от 28,9 до 38,8 °С. Значения ЛТ превышают КТМ на 0,2–2,2 °С и возрастают с 30,0 до 41,7 °С у серебряного карася, с 28,3 до 42,0 °С у карпа и с 30,9 до 39,1 °С у головешки-ротана в том же интервале акклимационной температуры. При одной и той же температуре акклимации значения КТМ и ЛТ статистически достоверно отличаются у каждого вида. Различия в показателях между видами при всех температурах акклимации достоверны ($p < 0,05$), за некоторым исключением.

Так, близкие или равные значения КТМ получены у карася и карпа при температуре акклимации 12 °С и 32 °С (32,1 и 31,8 °С, 41,4 и 41,4 °С соответственно). При температуре акклимации 20 °С отмечены сходные значения ЛТ у карпа и головешки-ротана (36,5 и 36,4 °С), а при температуре акклимации 28 и 32 °С – у карася и карпа (41,0 и 40,5 °С, а также 41,7 и 42,0 °С соответственно). Полученные данные хорошо согласуются с результатами более ранних работ по определению уровня КТМ и ЛТ у серебряного карася и карпа в различные сезоны года [Лапкин и др., 1990; Голованов, Смирнов, 2007; Смирнов, Голованов, 2004, 2005; Голованов, 2012]. Однако в этих исследованиях диапазон температуры акклимации рыб не превышал летнего уровня в 20 °С.



Верхние летальные температуры серебряного карася (А), карпа (Б) и головешки-ротана (В). КТМ – критический термический максимум при скорости нагрева 8–10 °С/ч, ЛТ – летальная температура при аналогичной скорости нагрева

Сравнение величин КТМ и ЛТ показало, что с ростом температуры акклимации разница между значениями ЛТ и КТМ уменьшается. Так, если разница значения ЛТ и КТМ при температуре акклимации 4 °С составляла 1,5 °С у карася, 1,8 °С у карпа и 2,0 °С у головешки-

ротана, то при самой высокой температуре акклимации 32 °С она сокращалась и составляла 0,3; 0,6 и 0,3 °С соответственно.

Характерно, что максимальная термоустойчивость при минимальной температуре акклимации 4 °С наблюдается у серебряного карася и головешки-ротана (КТМ 28,5 и 28,9 °С, ЛТ 30,3 и 30,9 °С соответственно). У карпа значения КТМ и ЛТ составили лишь 26,5 и 28,3 °С. При самой высокой температуре акклимации 32 °С максимум термоустойчивости отмечен уже у карася и карпа (КТМ 41,4 °С у обоих видов, ЛТ 41,7 и 42,0 °С соответственно). Показатели термоустойчивости у головешки-ротана в данном случае существенно ниже (КТМ 38,8 °С, ЛТ 39,1 °С). Таким образом, акклимация к низким и аномально высоким температурам существенно изменяет верхнюю температурную границу жизнедеятельности самых теплолюбивых видов рыб. При этом карп, очевидно, менее устойчив в зимний, а ротан-головешка – в летний сезон года.

Существенный интерес представляет вопрос о том, насколько изменяется уровень ВЛТ при изменении температуры предварительной акклимации на каждый градус. Ранее были получены данные, характеризующие такую зависимость [Beitinger et al., 2000; Смирнов, Голованов, 2004, 2005; Голованов, Смирнов, 2007]. Обнаружено, что с повышением температуры акклимации (диапазон от 4 до 20 °С) на 1 °С у четырех видов – карпа, серебряного карася, речного окуня *Perca fluviatilis* L. и плотвы *Rutilus rutilus* (L.) – КТМ в среднем увеличивался на ~0,51 °С. Диапазон увеличения КТМ колеблется в зависимости от вида рыб и степени их теплолюбивости. Так, по данным Т. Бейтингера с соавторами [Beitinger et al., 2000], наименьшее изменение КТМ при повышении температуры акклимации на 1 °С было получено у холодолюбивого американского гольца *Salvelinus fontinalis* (Mitchill) (0,13 °С), а наибольшее – у теплолюбивого желтого окуня *Perca flavescens* (Mitchill) (0,63 °С).

Полученные нами данные показывают, что в диапазоне температуры акклимации от 4 до 32 °С у трех изученных видов рост значений КТМ варьирует от 0,13 до 0,72 °С (в среднем 0,43 °С) при изменении температуры акклимации на 1 °С. Минимальные и максимальные значения отмечены у головешки-ротана при изменении температуры предварительной акклимации от 4 до 12 °С и у карпа в диапазоне повышения температуры акклимации от 12 до 20 °С.

Хронический летальный максимум при низкой скорости нагрева 0,04 °С/ч или 1 °С/сутки, при которой рыбы постепенно

акклимируются к постоянно возрастающему уровню температуры, составляет у серебряного карася 38–39 °С, у карпа 38–41 °С и у головешки-ротана 37–39 °С [Голованов, 2012]. Полученные при акклимации к температуре 32 °С максимальные значения КТМ и ЛТ у карася (41,4 и 41,7 °С), карпа (41,4 и 42,0 °С) и головешки-ротана (38,8 и 39,1 °С) свидетельствуют о том, что при аномально высокой температуре акклимации в наших опытах значения КТМ и ЛТ не только близки к значениям ХЛМ у данных видов, но и несколько превышают их. Это совпадает с данными авторов, работавших на пресноводных теплолюбивых видах, акклимированных к температурам выше 32 °С [Beitinger et al., 2000].

В нашей работе рассмотрены наиболее теплолюбивые виды рыб из обитающих в пресных водах Северо-Запада России. У менее теплолюбивых видов рыб – леща *Abramis brama* (L.), уклейки *Alburnus alburnus* (L.), плотвы, речного окуня, обыкновенной щуки *Esox lucius* L., типичных представителей пресных водоемов этого региона России, – показатели КТМ и ЛТ при сезонной температуре акклимации на 2–5 °С ниже [Голованов, 2009, 2012]. У холодолюбивой радужной форели *Parasalmo (Oncorhynchus) mykiss* Walbaum они еще ниже, на ~10–11 °С (Голованов, Валтонен, 2000). Вероятно, акклимация этих видов рыб к температуре выше или ниже сезонной может изменять температурные границы выживаемости рыб.

Полученные результаты характеризуют термоустойчивость и возможности температурной адаптации более теплолюбивых пресноводных видов рыб при действии аномально высокой температуры как в целом по водоему, так и на конкретном биотопе, подвергающемся воздействию подогретых сбросных вод ГРЭС и АЭС. Известно, что значение температуры выше 30 °С для многих теплолюбивых видов рыб становится опасным [Мордухай-Болтовской, 1975]. Показано также, что в диапазоне температуры от 34 до 38 °С тепловой шок является генотоксичным, поскольку вызывает увеличение частоты аберраций хромосом в метафазе, а также приводит к одноцепочечным повреждениям ДНК у рыб [Anitha et al., 2000]. Аварийные ситуации на ГРЭС и АЭС часто приводят к гибели маточных стад, а также молоди разных видов рыб при воздействии на них сублетальной для конкретного вида температуры [Голованов и др., 2005].

Определение пессимальных, а также оптимальных значений температуры у разных видов необходимо для прогнозирования поведения и распределения рыб в естественных водоемах (в норме и при аномальных условиях), а также в зонах сброса подогретых вод ГРЭС, АЭС и крупных промышленных предприятий [Jobling, 1981; Power plants..., 1980; Голованов и др., 2005; Голованов, 2009, 2012]. На примере изученных нами видов рыб показано, что увеличение температуры акклимации рыб существенно влияет на верхнюю летальную температуру и повышает их термоустойчивость до максимально возможной. Полученные количественные значения критического термического максимума и летальной температуры могут стать основой при разработке нормативов допустимого температурного воздействия на молодь рыб, при акклиматизации различных видов, а также для оценки температурных требований видов-вселенцев.

Выводы

1. С повышением температуры акклимации от 4 до 32 °С термоустойчивость теплолюбивых рыб – серебряного карася, карпа и головешки-ротана – повышается. Максимальные значения КТМ и ЛТ отмечены у серебряного карася и карпа.

2. Значение ЛТ превышает значение КТМ на 0,2–2,2 °С. Бóльшая разница отмечена при самой низкой, минимальная – при самой высокой температуре акклимации молоди рыб.

3. При температуре акклимации 4 °С максимальной термоустойчивостью характеризуются серебряный карась и головешка-ротан, при температуре акклимации 32 °С – серебряный карась и карп.

4. Среднее увеличение значений КТМ при росте температуры акклимации на 1 °С составило 0,43 °С (минимум 0,13 °С отмечен у головешки-ротана в диапазоне температуры акклимации от 4 до 12 °С, максимум 0,72 °С – у карпа при увеличении температуры акклимации от 12 до 20 °С).

5. Полученные количественные характеристики выявляют особенности температурных адаптаций теплолюбивых видов рыб к аномально высокой температуре среды и необходимы для разработки критериев тепловой нагрузки на пресноводные водоемы.

Исследование выполнено при поддержке Программы фундаментальных исследований Отделения биологических наук РАН «Динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий» и Программы Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-719.2012.4.

Литература

Алабастер Дж., Ллойд Р. Критерии качества воды для пресноводных рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. 384 с.

Голованов В. К. Температурные критерии для пресноводных рыб Северо-Запада России // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера: материалы XXVIII Международной конференции (Петрозаводск, 5–8 окт. 2009 г.). Петрозаводск, 2009. С. 148–153.

Голованов В. К. Эколого-физиологические закономерности распределения и поведения пресноводных рыб в термоградиентных условиях: автореф. дис. ... докт. биол. наук. Москва, 2012. 47 с.

Голованов В. К., Валтонен Т. Изменчивость термоадаптационных свойств радужной форели *Oncorhynchus mykiss* Walbaum в онтогенезе // Биология внутр. вод. 2000. № 2. С. 106–115.

Голованов В. К., Свирский А. М., Извеков Е. И. Температурные требования рыб Рыбинского водохранилища и их реализация в естественных условиях // Современное состояние рыбных запасов Рыбинского водохранилища. Ярославль: ЯрГТУ, 1997. С. 92–123.

Голованов В. К., Смирнов А. К., Болдаков А. М. Воздействие термального загрязнения водохранилищ Верхней Волги на рыбное население: современное состояние и перспективы // Актуальные проблемы рационального использования биологических ресурсов водохранилищ. Рыбинск: изд-во ОАО «Рыбинский Дом печати», 2005. С. 59–81.

Голованов В. К., Смирнов В. К. Влияние скорости нагрева на термоустойчивость карпа *Cyprinus carpio* в различные сезоны года // Вопр. ихтиол. 2007. Т. 47, № 4. С. 555–561.

Голованов В. К., Смирнов А. К., Капшай Д. С. Сравнительный анализ окончательной избираемой и верхней летальной температуры у молоди некоторых видов пресноводных рыб // Труды КарНЦ

РАН. Сер. «Экспериментальная биология». 2012. № 2. С. 70–75.

Мордохай-Болтовской Ф. Д. Проблема влияния тепловых и атомных электростанций на гидробиологический режим водоемов (обзор) // Экология организмов водохранилищ-охладителей. Л.: Наука, 1975. С. 7–69.

Лапкин В. В., Голованов В. К., Свирский А. М., Соколов В. А. Термоадаптационные характеристики леща *Abramis brama* (L.) Рыбинского водохранилища // Структура локальной популяции у пресноводных рыб. Рыбинск, 1990. С. 37–85.

Озернюк Н. Д. Температурные адаптации. М.: Изд-во Московского ун-та, 2000. 205 с.

Смирнов А. К., Голованов В. К. Влияние различных факторов на термоустойчивость серебряного карася *Carassius auratus* L. // Биол. внутр. вод. 2004. № 3. С. 103–109.

Смирнов А. К., Голованов В. К. Сезонная динамика верхних летальных температур у молоди карповых и окуневых видов рыб // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера: матер. IV (XXVII) Междунар. конф. Ч. 2. (Вологда, 5–10 дек. 2005 г.). Вологда, 2005. С. 145–148.

Шмидт-Ниельсен К. Физиология животных. Приспособление и среда. Кн. 1. М.: Мир, 1982. 416 с.

Anitha B., Chandra N., Gopinath P. M., Durairaj G. Genotoxicity evaluation of heat shock in gold fish (*Carassius auratus*) // Mutat. Res. Genet. Toxicol. and Environ. Mutagen. 2000. Vol. 469, N 1. P. 1–8.

Becker C. D., Genoway R. G. Evaluation of the critical thermal maximum for determining thermal tolerance of freshwater fish // Environ. Biol. Fish. 1979. Vol. 4, N 3. P. 245–256.

Beitinger T. L., Bennet W. A., McCauley R. W. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature // Environ. Biol. Fish. 2000. Vol. 58, N 3. P. 237–275.

Jobling M. Temperature tolerance and the final preferendum – rapid methods for the assessment of optimum growth temperature // J. Fish. Biol. 1981. Vol. 19, N 4. P. 439–455.

Power plants. Effects on fish and shellfish behavior. N.Y.-London-Toronto-Sydney-San Francisco: Academic Press, 1980. 346 p.

Sokal R. R., Rolf F. J. Biometry. The principals and practice of statistics in biological research. New York: W. H. Freeman and Co., 1995. 887 p.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Капшай Дмитрий Сергеевич

аспирант
Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН
Ярославская обл., Некоузский р-н,
п. Новый Некоуз, Россия, 152730
эл. почта: kapshbio@rambler.ru
тел.: (48547) 21264.

Голованов Владимир Константинович

ведущий научный сотрудник, д. б. н.
Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН
а/я 9, Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл.,
Россия, 152742
эл. почта: vkgolovan@mail.ru
тел.: (48547) 24484.

Kapshaj, Dmitry

I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Water,
Russian Academy of Sciences
Novyi Nekouz, 152730, Yaroslavl Region, Russia
e-mail: kapshbio@rambler.ru
tel.: (48547) 21264

Golovanov, Vladimir

I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Water,
Russian Academy of Sciences
POB 9, Borok, 152742, Yaroslavl Region, Russia
e-mail: vkgolovan@mail.ru
tel.: (48547) 24484

УДК 504.37.054:597-1.111.2

ЭФФЕКТ БОРА В ХАРАКТЕРИСТИКЕ БУФЕРНЫХ СВОЙСТВ ГЕМОГЛОБИНА РЫБ

И. М. Камшилов, Р. А. Запруднова

Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН

Впервые изучали связь кислотоустойчивости рыб с функциональными свойствами гемоглобина (на представителях 15 видов из 6 семейств пресноводных костистых и проходных осетровых). Установлена связь между устойчивостью рыб к закислению воды, эффективностью гемоглобиновой буферной системы и величиной эффекта Бора. Последний показатель предлагается в качестве характеристики двух предыдущих.

К л ю ч е в ы е с л о в а : рыбы; гемоглобин; эффект Бора; кислотоустойчивость.

I. M. Kamshilov, R. A. Zaprudnova. THE BOHR EFFECT IN THE CHARACTERISTICS OF THE BUFFER PROPERTIES OF FISH HEMOGLOBIN

Correlations between acid-resistance and hemoglobin functional properties in fish were studied for the first time (using representatives of 15 species and 6 families: freshwater bony fishes and migratory sturgeons). A new finding is the correlation between the resistance of fish to high water acidity, performance of the hemoglobin buffer system, and the value of the Bohr effect. We suggest that the latter is used as a characteristic of the former two.

К e y w o r d s : fish, hemoglobin, the Bohr effect, acid resistance.

Введение

У рыб, как и у высших позвоночных, на долю гемоглобиновой буферной системы приходится до 70–75 % буферной емкости крови [Иванов, 2003]. Однако в настоящее время нет сведений об участии этой системы в адаптации рыб к изменению pH среды. В связи с увеличением закисления воды, главным образом под влиянием антропогенных факторов, наибольший интерес представляет определение кислотоустойчивости рыб и механизмов их адаптации к изменениям кислотности водоемов.

В настоящей работе у представителей 15 видов рыб (6 семейств) с различной устойчивостью к закислению среды изучали величину эффекта Бора. Этот показатель отражает об-

ратное отношение между pH и P_{50} (величиной полунасыщения гемоглобина кислородом), то есть снижение сродства гемоглобина к кислороду с понижением pH крови.

Материалы и методы

Изучали рыб, различающихся по экологии и систематике. Пресноводные костистые рыбы: семейство *Cyprinoidae* (карповые) – *Carassius auratus* (карась серебряный), *Tinca tinca* (лечь), *Cyprinus carpio* (сазан), *Rutilus rutilus* (плотва), *Abramis brama* (лещ), *Leuciscus idus* (язь), *Blicca bjoerknna* (густера), *Pelecus cultratus* (чехонь); сем. *Gadidae* (тресковые) – *Lota lota* (налим); сем. *Percidae* (окуневые) – *Perca fluviatilis* (окунь); сем. *Salmonidae* (лососи) – *Salmo*

gairdneri (радужная форель); сем. *Esocidae* (щуковые) – *Esox lucius* (щука). Проходные осетровые: сем. *Acipenseridae* (осетровые) – *A. guldensiaedtii* (русский осетр), *A. stellatus* (севрюга), *Huso huso* (белуга). Рыб отлавливали в бассейне Волги, форель взята с рыбоводного завода. Использовали свежее пойманных половозрелых особей. Величина pH в водоемах обитания рыб колебалась в диапазоне 7,5–8,2.

Функциональные свойства гемоглобина определяли спектрофотометрически при дезоксигенации инертным газом (N₂, He) уравновешенного с воздухом раствора гемоглобина в калий-фосфатной буферной системе с pH 6,6 и 7,2 и ионной силой 0,05M, имеющим экстинкцию E = 1,000 при длине волны 430 нм. Величину эффекта Бора определяли графически для 50%-го насыщения гемоглобина кислородом в соответствии с уравнением Дилла: $\Delta \lg P_{50} / \Delta \text{pH}$. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

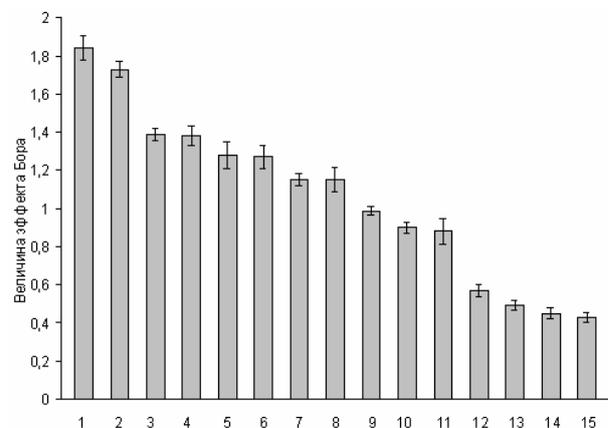
Результаты и обсуждение

На рисунке в порядке убывания представлена величина эффекта Бора у исследуемых рыб. Наибольшие значения этого показателя – у щуки и окуня. Наименьшие – у осетровых (между ними нет достоверных различий), к осетровым приближена форель (различия с которой достоверно значимы). Карповые занимают промежуточное положение между перечисленными видами рыб. Однако среди карповых диапазон колебаний величины эффекта Бора достаточно широк. Наиболее высокие значения этого показателя у линя и плотвы, несколько ниже (но достоверно не отличаются) у карася и сазана. Самые низкие (достоверно различаются) – у чехони, густеры и леща. Промежуточное положение по величине эффекта Бора между карповыми занимает язь, который достоверно отличается от леща и недостоверно – от карася и сазана. Одинаковые с язем значения исследуемого показателя имеет налим.

По результатам многочисленных исследований [EIFAC, 1986; Almer et al., 1974; Lee et al., 1983; Виноградов, 2000; Токсикозы..., 2006 и др.], проводимых как в природных, так и в лабораторных условиях, для большинства проанализированных рыб кислотоустойчивость известна, и определялась она по величине pH, вызывающей массовую гибель определенного процента рыб (LC50). Среди изучаемых нами рыб самыми устойчивыми к закислению воды являются щука и окунь: в кислых озерах они встречаются при pH 3,5. Карповые (наиболее изучены плотва,

линь, карп, карась, менее – лещ) относятся к среднеустойчивым: в природной среде могут обитать при pH 4,2–4,4. Налим также считается умеренно кислотоустойчивым видом рыб. Лососевые признаются наиболее чувствительными к кислотному загрязнению: для большинства из них (и форели в том числе) нижний предел безопасного уровня pH воды – 5,0. В литературе практически нет информации о кислотоустойчивости осетровых. Только в работе Н. С. Строганова [1968] указывается, что сеголетки осетра (длиной тела 5–8 см) погибали через 20 суток при pH 6,6. Общеизвестно, что с возрастом сопротивляемость рыб к крайним значениям pH увеличивается. Поэтому можно предположить, что взрослые особи осетра могли переносить закисление воды до pH 6,0 и немного ниже.

Исследуемые нами рыбы (рис.) по мере снижения величины эффекта Бора располагались в последовательности, аналогичной снижению кислотоустойчивости: щука, окунь > карповые, налим > лососевые > осетровые. Сужение границы толерантности (от щуки и окуня до осетровых) к низким pH среды почти в 2 раза сопровождалось уменьшением величины эффекта Бора почти в 5 раз (коэффициент корреляции $r = -0,94$).



Величина эффекта Бора у разных видов рыб:

1 – щука, 2 – окунь, 3 – линь, 4 – плотва, 5 – сазан, 6 – карась, 7 – налим, 8 – язь, 9 – лещ, 10 – густера, 11 – чехонь, 12 – форель, 13 – русский осетр, 14 – севрюга, 15 – белуга

В литературе межвидовые различия величины эффекта Бора связываются с экологией, главным образом с кислородными потребностями рыб, точнее – с ацидозом периферической крови из-за гипоксии. Принято считать, что активные пловцы отличаются более высокими значениями эффекта Бора, чем малоактивные, устойчивые к недостатку кислорода [Хочачка, Сомеро, 1977; Кляшторин, 1982 и др.]. Однако в природе встречается немало

исключений из этого правила. Например, у активного пловца форели эффект Бора значительно ниже, чем у менее подвижных и высокоустойчивых к гипоксии карася, линя, а также других представителей карповых и налима, уступающих форели в подвижности и превосходящих ее в устойчивости к недостатку кислорода. Щука и окунь, обладающие сходными высокими величинами эффекта Бора, существенно различаются по образу жизни. Эти примеры могут быть продолжены, в том числе и с включением представителей морских костистых [Парфенова, 2006].

Повышение величины эффекта Бора у рыб указывает на увеличение чувствительности гемоглобина к закислению крови. Наибольшей чувствительностью к закислению внутренней среды и более тонкой регуляцией величины рН в области низких значений обладают гемоглобиновые буферные системы рыб, наиболее устойчивых к закислению воды (щука, окунь). Таким образом, чем выше устойчивость рыб к низкому рН воды, тем сильнее гемоглобиновая буферная система противодействует закислению внутренней среды, то есть эффективность гемоглобиновой буферной системы повышается с повышением кислотоустойчивости рыб. Следовательно, полученные нами данные позволяют рассматривать эффект Бора в качестве важнейшей характеристики буферных свойств гемоглобина (или эффективности гемоглобиновой буферной системы) и как показатель кислотоустойчивости рыб.

На основании полученных результатов можно рекомендовать по величине эффекта Бора определять устойчивость рыб к низкому рН воды, для которых таковая не известна, и уточнять имеющиеся сведения по кислотоустойчивости, определенной традиционными способами, т. е. по основной токсикологической характеристике: LC50.

В адаптации рыб к низкому рН среды участвуют несколько буферных систем. Самым изученным является Na^+/H^+ обмен через жабры [Виноградов, 2000]. Нарушения в ионном обмене у устойчивого к закислению среды окуня наблюдались при величине рН воды, близкой к 3, у неустойчивых лососевых – при рН 5–6, у умеренно устойчивых карповых – в диапазоне рН, близком к 4. Таким образом, в отличие от гемоглобиновой буферной системы, чувствительность которой к низкому рН крови повышается с увеличением кислотоустойчивости рыб, чувствительность жаберной буферной системы к низкому рН воды с повышением кислотоустойчивости рыб, напротив, снижается. Известно также [Запруднова, Камшилов, 2008],

что устойчивые к закислению щука и окунь в сравнении с другими рыбами обладали самым интенсивным обменом Na^+/H^+ через мембрану эритроцитов, за счет которого происходит защелачивание внутриклеточной среды. Отсюда следует, что эффективность других буферных систем, как и гемоглобиновой, максимальна у наиболее кислотоустойчивых рыб.

Выводы

В настоящей работе впервые изучали связь кислотоустойчивости рыб с функциональными свойствами гемоглобина. Выявлена прямая зависимость между устойчивостью рыб к низкому рН среды и величиной эффекта Бора. На основании полученных данных эффект Бора предлагается в качестве характеристики буферных свойств гемоглобина и кислотоустойчивости рыб. Эффективность гемоглобиновой буферной системы снижалась с понижением устойчивости рыб к закислению среды.

Литература

- Виноградов Г. А. Процессы ионной регуляции у пресноводных рыб и беспозвоночных. М.: Наука, 2000. 216 с.
- Запруднова Р. А., Камшилов И. М. Межвидовые различия дыхательных функций эритроцитов некоторых пресноводных рыб // Вопросы ихтиол. 2008. Т. 48, № 4. С. 553–562.
- Иванов А. А. Физиология рыб. Учебник. М.: Мир, 2003. 284 с.
- Кляшторин Л. Б. Водное дыхание и кислородные потребности рыб. М.: Легкая и пищевая пром-ть, 1982. 168 с.
- Парфенова И. А. Функциональное состояние гемоглобина и эритроцитов морских рыб, устойчивых к внешней гипоксии: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Симферополь: Таврич. национал. ун-т. 2006. 20 с.
- Строганов Н. С. Акклиматизация и выращивание осетровых рыб в прудах. М.: МГУ, 1968. 377 с.
- Токсикозы рыб с основами патологии. Справочная книга / Авторы-составители Н. М. Аршаница, М. А. Перевозников. СПб.: ГОСНИОРХ, 2006. 179 с.
- Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир, 1977. 398 с.
- Almer B. W., Dickson W., Ekstrom G., Hornstrom E., Miller U. Effects of acidification on Swedish lakes. // Ambio. 1974. Vol. 3, N 3. P. 30–36.
- EIFAC. Water quality criteria for European freshwater fish. Report on extreme pH values and inland fisheries // Techn. Paper, Rome, 1968. N 4. P. 1–18.
- Lee R. M., Gerking S. D., Jezierska B. Electrolyte balance and energy mobilization in acid-stressed rainbow trout, *Salmo gairdneri* and their relation to reproductive success // Environ. Biol. Fishes. 1983. Vol. 8, N 2. P. 115–123.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Камшилов Игорь Михайлович

Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН
а/я 9, п. Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл.,
Россия, 152742
эл. почта: kim@ibiw.yaroslavl.ru
тел.: (48547) 24111

Запруднова Римма Анатольевна

Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН
а/я 9, п. Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл.,
Россия, 152742
эл. почта: rimma@ibiw.yaroslavl.ru
тел.: (48547) 24124

Kamshilov, Igor

I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters,
Russian Academy of Sciences
POB 9, 152742 Borok, Yaroslavl Region, Russia
e-mail: kim@ibiw.yaroslavl.ru
tel.: (48547) 24111

Zaprudnova, Rimma

I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters,
Russian Academy of Sciences
POB 9, 152742 Borok, Yaroslavl Region, Russia
e-mail: rimma@ibiw.yaroslavl.ru
tel.: (48547) 24124

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННЫХ ЕЖЕСУТОЧНЫХ СНИЖЕНИЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ ЗАРАЖЕННОГО НЕМАТОДОЙ КАРТОФЕЛЯ

М. И. Сысоева, В. В. Лаврова, Е. М. Матвеева

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Изучено влияние предобработки кратковременными ежесуточными снижениями температуры (ДРОП) на содержание фотосинтетических пигментов в листьях зараженных нематодой растений картофеля. По содержанию каротиноидов различий между здоровыми и зараженными растениями не установлено. Заражение нематодой контрольных растений сопровождалось повышением содержания хлорофиллов в листьях, а ДРОП-обработка вызывала их снижение. Предполагается, что выявленные различия по содержанию хлорофиллов могут быть связаны с метаболическим статусом растения на момент заражения. По-видимому, ДРОП-обработка является для растения праймингом, способствующим формированию устойчивости к нематодe.

К л ю ч е в ы е с л о в а : *Solanum tuberosum* L., кратковременные ежесуточные снижения температуры, нематодоустойчивость, фотосинтетические пигменты, картофельная цистообразующая нематода.

M. I. Sysoeva, V. V. Lavrova, E. M. Matveeva. EFFECT OF DAILY SHORT-TERM TEMPERATURE DROPS ON THE CONTENT OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS IN THE LEAVES OF NEMATODE-INFECTED POTATO PLANTS

We studied the effect of pretreatment with daily short-term temperature drops (DROP) on the content of photosynthetic pigments in the leaves of nematode-infected potato plants. No differences between healthy and infected plants were found as regards carotenoid content. Infection with nematode resulted in a rise in chlorophyll content in the leaves of the control plants, whereas DROP treatment caused it to decrease. Presumably, the differences in the content of chlorophylls may be related to the metabolic status of the plants at the time of infestation. DROP treatment appears to be a priming promoting the plants' resistance to the nematode.

Key words: *Solanum tuberosum* L., daily short-term temperature drops, nematode resistance, photosynthetic pigments, potato cyst nematode.

Введение

Температура является одним из факторов, регулирующих иммунный ответ растения на заражение патогенами [Zhu et al., 2010; Iorizzo

et al., 2011]. Особый интерес представляют работы по изучению флуктуирующей суточной температуры, широко распространенной в природе, особенно в условиях Севера. Согласно одному из сценариев изменения клима-

та суточные перепады температур могут усиливаться [IPCC, 2007], особенно в ранневесенний период [Филатов и др., 2003]. В предыдущих исследованиях нами установлено, что предобработка растений картофеля кратковременными ежесуточными снижениями температуры (ДРОП; от англ. drop – «падение») вызывает эффект кросс-адаптации, повышая не только холодоустойчивость, но и устойчивость растения к широко распространенному и высоковредоносному паразиту – картофельной цистообразующей нематоды *Globodera rostochiensis* Woll. [Сысоева и др., 2011]. В основе этого явления лежит активация экспрессии гена холодоустойчивости *ci7* [Лаврова и др., 2011] и гена устойчивости к нематоды *H1* [Сысоева и др., 2011]. Кроме того, действие переменной суточной температуры способно вызывать увеличение содержания в листьях гексоза [Марковская и др., 2010], что в случае проникновения нематоды является метаболическим сигналом для индукции экспрессии защитных генов [Bolton, 2009].

Известно, что одним из первых действие стресс-факторов разной природы воспринимает фотосинтетический аппарат растения. Заражение растений нематодой сопровождается значительными изменениями состава пигментов и их количества [Васильева и др., 2009; Ahmed et al., 2009], причем степень изменений зависит от устойчивости растения и уровня заражения нематодой [Соловьева и др., 1980]. К настоящему времени изучено действие кратковременных ежесуточных снижений температуры на функциональное состояние фотосинтетического аппарата в условиях заражения [Сысоева и др., 2010]. В то же время влияние периодических снижений температуры на содержание фотосинтетических пигментов при заражении нематодой остается неисследованным, что и явилось целью настоящей работы.

Материалы и методы

Мини-клубни картофеля (*Solanum tuberosum* L., с. Невский – восприимчивый к картофельной цистообразующей нематоды *Globodera rostochiensis* Woll., патотип Ro1), полученные в ГНУ «Карельская ГСХОС Россельхозакадемии», проращивали на свету в течение трех недель, высаживали в пластиковые сосуды с песком при поливе питательным раствором Кнопа с добавлением микроэлементов (рН 5,5–5,6) и выставляли в камеру искусственного климата при температуре 23 °С, фотопериоде (день/ночь) 16/8 ч и освещенности 10 клк. По достижении фазы трех листьев часть

растений оставляли при 23 °С (вариант контроль), а остальные подвергали в течение шести суток ежесуточным снижениям температуры (с 23 до 5 °С) на 2 ч в конце ночного периода (вариант ДРОП). На следующий день после завершения температурных обработок часть растений каждого варианта заражали нематодой (10 цист/растение), а часть оставляли незараженными. Здоровые и зараженные растения каждого варианта выращивали 1,5 месяца в оптимальных для роста и развития условиях. Листья для анализа отбирали по завершении температурных обработок до заражения (0-е сутки) и после заражения (на 2, 20 и 45-е сутки).

Содержание пигментов (хлорофиллов, каротиноидов) определяли на спектрофотометре СФ-2000 («Спектр», Россия) в спиртовом экстракте при величине оптической плотности 665, 649, 440,5 нм [Бернштейн, Каминский, 1986; Мерзляк и др., 1996]. Концентрацию пигментов рассчитывали по стандартным уравнениям [Lichtenthaler, Wellburn, 1983].

Измерения проводили в четырех биологических повторностях. На рисунках приведены средние арифметические значения из двух независимых опытов и их стандартные ошибки. Данные обработаны статистически с использованием пакета программ Statgraphics for Windows 7.0. В статье обсуждаются величины, достоверно различающиеся при $P < 0,05$. Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП ИБ КарНЦ РАН.

Результаты

По завершении кратковременных низкотемпературных обработок перед заражением (0-е сутки) содержание фотосинтетических пигментов у растений, обработанных ДРОП, не отличалось от контроля (рис. 1, 2).

Заражение растений нематодой в период до 20-х суток сопровождалось повышением хлорофиллов на 10 %, в основном за счет увеличения содержания хлорофилла *a* (рис. 1). В дальнейшем, к 45-м суткам содержание пигментов снижалось и было сопоставимо с таковым у контрольных растений.

Иная реакция была получена для растений, обработанных ДРОП. К 20-м суткам заражения отмечено снижение содержания зеленых пигментов на 28 % по сравнению с исходным уровнем, причем уровень хлорофилла *a* снижался начиная уже со 2-х суток заражения. К концу эксперимента содержание фотосинтетических пигментов у зараженных и незараженных растений не отличалось от контроля (рис. 1).

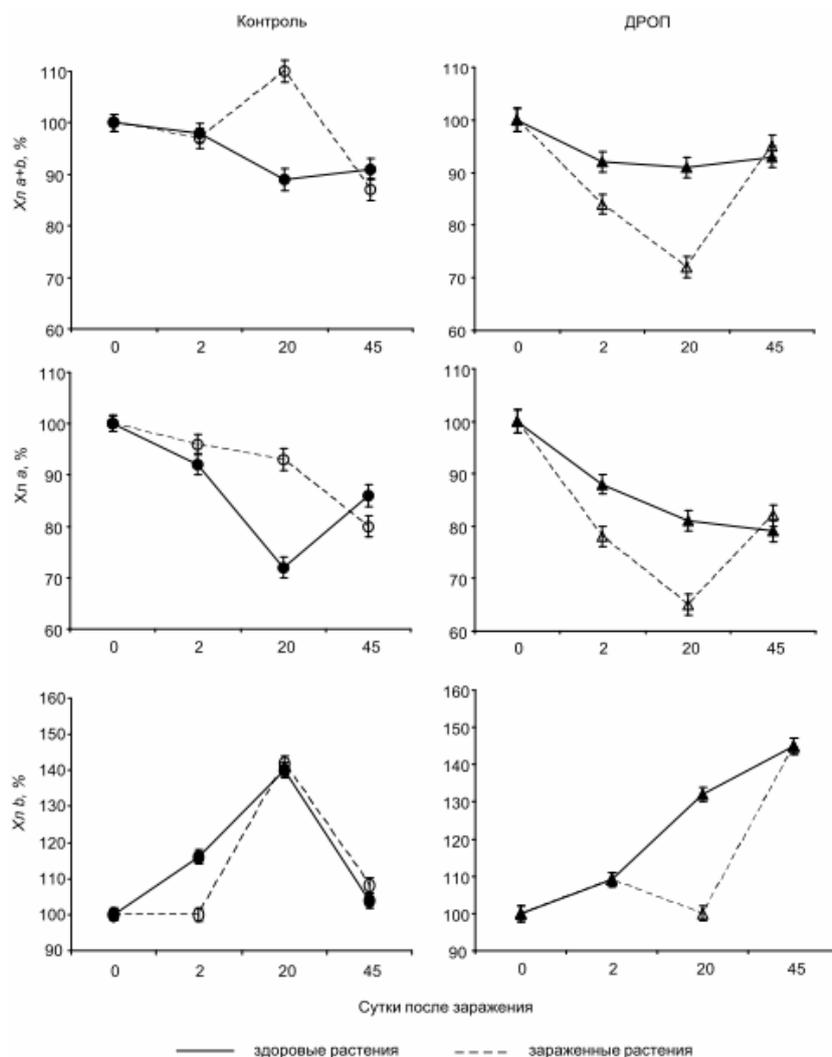


Рис. 1. Общее содержание хлорофиллов у контрольных и ДРОП-обработанных растений при заражении нематодой:

Хл a+b; 100 % = 9,9 мг/г сух. массы для контроля и 10,1 мг/г сух. массы для ДРОП; Хл a; 100 % = 7,4 мг/г сух. массы для контроля и 7,8 мг/г сух. массы для ДРОП; Хл b; 100 % = 2,5 мг/г сух. массы для контроля и 2,2 мг/г сух. массы для ДРОП

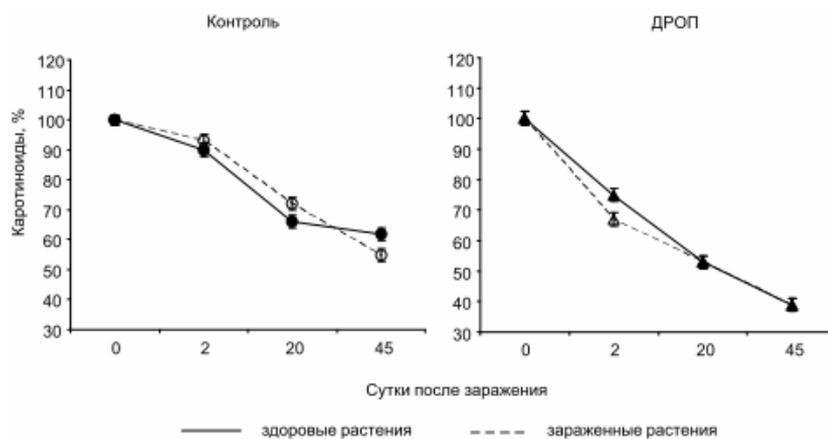


Рис. 2. Содержание каротиноидов у контрольных и ДРОП-обработанных растений при заражении нематодой:

100 % = 2,9 мг/г сух. массы для контроля и 3,6 мг/г сух. массы для ДРОП

Содержание каротиноидов снижалось на протяжении всего периода развития паразита, однако разницы между здоровыми и зараженными растениями не выявлено (рис. 2).

Обсуждение

Анализ полученных данных позволил установить разную реакцию пигментного аппарата зараженных растений картофеля в контроле и при ДРОП-обработке. Заражение контрольных растений сопровождалось повышением содержания хлорофиллов. В литературе имеются разные мнения, объясняющие этот факт. В частности, это может быть неспецифической реакцией растения в ответ на внедрение паразита. Личинки нематоды для активного роста и развития потребляют большое количество питательных веществ (углеводов), что по принципу обратной связи может стимулировать фотосинтетическую функцию, позволяя растениям обеспечить поддержание в норме своей жизнедеятельности, не снижая при этом продуктивности [Соловьева и др., 1980]. Увеличение содержания пигментов может быть и результатом стимулирующего действия самого паразита с целью формирования наиболее благоприятных условий для своего развития [Рубин и др., 1975]. Известно, что паразит изменяет метаболизм растения для получения доступа к питательным веществам [Goverse et al., 2000]. Однако такой эффект во многом зависит от уровня заражения. В наших экспериментах исходный уровень заражения соответствовал среднему, который, согласно литературным данным [Рийспере, Рийспере, 1973], способен вызвать стимуляцию фотосинтетических процессов. Обращает на себя внимание факт увеличения содержания хлорофиллов преимущественно за счет хлорофилла *a*, что согласуется с данными литературы об изменении в условиях биотического стресса содержания пигментов, и в первую очередь хлорофилла *a* [Ahmed et al., 2009]. Возможно, это связано с изменениями, происходящими в пигмент-белковых комплексах, в состав которых входят молекулы хлорофилла *a* [Shimada et al., 1990].

Предобработка растений кратковременными ежесуточными снижениями температуры вызвала снижение содержания хлорофиллов в период заражения вплоть до 20-х суток инфицирования. Подобная закономерность была отмечена и при изучении фотохимической активности фотосинтетического аппарата при заражении нематодой [Сысоева и др., 2010]. Вероятно, это связано с тем, что именно в данный период паразит характеризуется метаболической зависи-

мостью от растения-хозяина и оказывает наибольшее влияние на его физиологические процессы, включая развитие защитных реакций [Матвеева и др., 1997]. Основываясь на ранее проведенных исследованиях, показывающих повышение устойчивости картофеля к нематоды под действием ДРОП [Сысоева и др., 2011], можно предположить, что такая реакция связана с развитием защитных механизмов. В частности, в ответ на действие кратковременных ежесуточных снижений температуры происходит повышение содержания гексоз (глюкозы, фруктозы), обуславливая тем самым высокий метаболический статус растения [Марковская и др., 2010]. Согласно ряду исследований [Herbers et al., 1996; Essman et al., 2008; Rodaki et al., 2009], углеводный статус играет важную роль в развитии устойчивости растений к патогенам. У устойчивых растений при инвазии повышается содержание гексоз, которые, в свою очередь, оказывают влияние на активность генов, ответственных за биосинтез [Bilgin et al., 2010] или деградацию пигментов [Kariola et al., 2005], что может приводить к снижению их содержания. Таким образом, наблюдаемое снижение содержания фотосинтетических пигментов у ДРОП-обработанных растений при заражении можно связать с их высоким метаболическим статусом еще до момента внедрения паразита. Превалирование гексоз у ДРОП-растений может являться метаболическим сигналом для индукции экспрессии защитных генов, в частности, PR генов [Bolton, 2009]. Кроме того, известно, что при заражении гексозы транспортируются в клетку, снижая тем самым концентрацию углеводов в апопласте и ограничивая паразита в количестве потребляемых веществ, необходимых для его роста и развития. Полученные данные согласуются с ранее проведенными исследованиями, показывающими, что ДРОП-обработка снижает уровень заражения, способствуя большей жизнеспособности растения и угнетению паразита [Сысоева и др., 2011], поскольку известно, что условия размножения нематод ухудшаются при высокой интенсивности метаболизма растений [Рийспере, Рийспере, 1973].

В нашем исследовании различий в содержании общего пула каротиноидов между здоровыми и зараженными растениями как в контроле, так и в варианте ДРОП не обнаружено. Однако известно, что по изменению содержания различных представителей каротиноидов можно судить об окислительных процессах, происходящих в зараженных тканях растений [Васильева и др., 2009]. В работах, посвященных изучению состава фотосинтетических пигментов растений, инвазированных фитонематодой [Со-

ловьева и др., 1980; Васильева и др., 2009], было показано увеличение содержания неоксантина в общем пуле виоло-ксантинового цикла, свидетельствующее об усилении окислительных процессов под влиянием паразита. В связи с этим особый интерес для будущих исследований представляет изучение фракционного состава желтых пигментов у ДРОП-обработанных растений при заражении. Можно предположить, что переменные температуры изменяют метаболизм каротиноидов в сторону образования ксантофиллов, играющих важную роль в защите фотосинтетического аппарата от окислительных повреждений, вызванных заражением.

Таким образом, проведенное исследование показало различия в реакции пигментного аппарата контрольных и ДРОП-обработанных растений картофеля при заражении нематодой. Высокий метаболический статус ДРОП-обработанных растений способствовал снижению содержания хлорофиллов при заражении и развитию защитных механизмов. Это дает основание предполагать, что кратковременные снижения температуры являются для растения праймингом, обеспечивающим их подготовку к последующим стрессовым условиям, вызванным заражением нематодой.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 10-04-00097_а), Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 8050) и Программы фундаментальных исследований ОБН РАН «Биологические ресурсы России» (№ г. р. 01201262103).

Литература

- Бернштейн И. Я., Камминский Ю. Л. Спектрофотометрический анализ в органической химии // Л.: Химия, 1986. 199 с.
- Васильева И. С., Удалова Ж. В., Зиновьева С. В., Пасешниченко В. А. Стероидные фураностаноловые гликозиды – новый класс природных адаптогенов (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. Т. 45, № 5. С. 517–526.
- Лаврова В. В., Сысоева М. И., Шерудило Е. Г., Топчиева Л. В., Матвеева Е. М. Экспрессия гена *ci7* в листьях картофеля при действии кратковременных ежедневных снижений температуры // Труды КарНЦ РАН. Сер. «Экспериментальная биология». 2011. № 3. С. 73–77.
- Марковская Е. Ф., Шерудило Е. Г., Галибина Н. А., Сысоева М. И. Роль углеводов в реакции теплолюбивых растений на кратковременные и длительные низкотемпературные воздействия // Физиология растений. 2010. Т. 57. С. 687–694.
- Матвеева Е. М., Груздева Л. И., Евстратова Л. П. Влияние патогенов на ростовые процессы картофеля // Вестник РАСХН. 1997. № 4. С. 29–32.
- Мерзляк М. Н., Чивкунова О. Р., Лехимена Л., Белевич Н. П. Ограничения и дополнительные возможности спектрофотометрического анализа пигментов в экстрактах листьев высших растений // Физиология растений. 1996. Т. 43, № 6. С. 926–936.
- Рийспере У. Р., Рийспере А. Ю. О влиянии некоторых экзогенных факторов на развитие и формирование соотношения полов у картофельной нематоды // Борьба с картофельной нематодой: материалы симпозиума, Тарту. 1973. С. 67–70.
- Рубин А. Б., Арциховская Е. В., Аксенова В. А. Биохимия и физиология иммунитета растений. Высш. школа. 1975. 320 с.
- Соловьева Г. И., Потаевич Е. В., Кучко Л. А., Васильева А. П. Цистообразующая картофельная нематода и меры борьбы с ней. Петрозаводск: Карелия. 1980. 24 с.
- Сысоева М. И., Лаврова В. В., Марковская Е. Ф., Матвеева Е. М., Шерудило Е. Г. Влияние ежедневных кратковременных снижений температуры на состояние фотосинтетического аппарата растений картофеля в условиях заражения фитопаразитической нематодой // Труды КарНЦ РАН. Сер. «Экспериментальная биология». 2010. № 2. С. 41–46.
- Сысоева М. И., Лаврова В. В., Матвеева Е. М., Шерудило Е. Г., Топчиева Л. В. Кросс-адаптация растений картофеля к действию низких температур и заражению картофельной цистообразующей нематодой // Физиология растений. 2011. Т. 58, № 6. С. 853–858.
- Филатов Н. Н., Назарова Л. Е., Сало Ю. А., Семенов А. В. Динамика и прогноз изменения климата Восточной Финноскандии // Гидроэкологические проблемы Карелии и использование водных ресурсов. Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН, 2003. С. 33–39.
- Ahmed N., Abbasi M. W., Shaukat S. S., Zaki M. J. Physiological changes in leaves of mungbean plants infected with *Meloidogyne javanica* // Phytopathol. Mediterr. 2009. Vol. 48. P. 262–268.
- Bilgin D. D., Zavala J. A., Zhu J., Clough S. J., Ort D. R., DeLucia E. H. Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes // Plant, cell and environment. 2010. Vol. 33. P. 1597–1613.
- Bolton M. D. Primary metabolism and plant defense – fuel for the fire // MPMI. 2009. Vol. 22. N 5. P. 487–497.
- Essmann J., Bones P., Weis E., Scharte J. Leaf carbohydrate metabolism during defense // Plant Signaling & Behavior. 2008. Vol. 3, N 10. P. 885–887.
- Iorizzo M., Mollov D. S., Carputo D., Bradeen J. M. Disease resistance gene transcription in transgenic potato is unaltered by temperature extremes and plant physiological age // Eur. J. Plant Pathol. 2011. Vol. 130. P. 469–476.
- IPCC (2007). Climate Change 2007: Climate Change Impacts, Adaptation and Vulnerability. Fourth Assessment Report, Intergovernmental Panel on Climate Change.
- Goverse A., Overmars H., Engelbertink J., Schots A., Bakker J., Helder J. Both Induction and Morphogenesis of Cyst Nematode Feeding Cells Are Mediated by Auxin // MPMI. 2000. Vol. 13, N 10. P. 1121–1129.

Herbers K., Meuwly P., Frommer W. B., Metraux J., Sonnewald U. Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway // *Plant Cell*. 1996. Vol. 8. P. 793–803.

Kariola T., Brader G., Li J., Palva T. Chlorophyllase 1, a damage control enzyme, effects the balance between defense pathways in plants // *Plant Cell*. 2005. Vol. 17. P. 282–294.

Lichtenthaler H. K., Wellburn A. R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents // *Biochemical Society Transactions*. 1983. Vol. 11. P. 591–592.

Rodaki A., Bohovych I. M., Enjalbert B., Young T., Odds F. C., Gow N. A. R., Brown A. J. P. Glucose Promotes Stress Resistance in the Fungal Pathogen *Candida albicans* // *Molecular Biology of the Cell*. 2009. Vol. 20. P. 4845–4855.

Shimada Y., Tanaka A., Tanaka Y., Takabe T., Takabe T., Tsuji H. Formation of chlorophyll-protein complexes during greening 1. Distribution of newly synthesized chlorophyll // *Plant Cell Physiol*. 1990. Vol. 31, N 5. P. 639–647.

Zhu Y., Qian W., Hua J. Temperature modulates plant defense responses through NB-LRR-proteins // *PLoS Pathog*. 2010. Vol. 6. P. 1–12.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Сысоева Марина Ивановна

главный научный сотрудник, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: sysoeva@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 762706

Лаврова Виктория Витальевна

младший научный сотрудник
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: VVLavrova@mail.ru
тел.: (8142) 762706

Матвеева Елизавета Михайловна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: matveeva@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 762706

Sysoeva, Marina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: sysoeva@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 762706

Lavrova, Victoria

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: VVLavrova@mail.ru
tel.: (8142) 762706

Matveeva, Elizaveta

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: matveeva@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 762706

УДК 004.75

АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ СИСТЕМА РЕГИСТРАЦИИ СУТОЧНОГО ХОДА ТЕМПЕРАТУРЫ И ВЛАЖНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕСПРОВОДНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

В. В. Яковлев¹, А. Ю. Лукьянов², А. А. Когут², Д. А. Сысоев²

¹ Карельский научный центр РАН

² Петрозаводский государственный университет

Представлены методы построения и реализации автоматизированной системы сбора и анализа информации о различных физических параметрах окружающей среды в условиях длительных непрерывных измерений. Система разработана на базе микропроцессорных устройств с использованием беспроводных технологий и апробирована при проведении полевых экспериментов на болоте в районе стационара «Киндасово» и в теплицах на Агробиологической станции Института биологии КарНЦ РАН.

К л ю ч е в ы е с л о в а : автоматизированная система, параметры окружающей среды, полевые эксперименты, беспроводные технологии, сбор и передача информации.

V. V. Yakovlev, A. Yu. Luk'yanov, A. A. Kogut, D. A. Sysoev. AUTOMATED SYSTEM WITH WIRELESS TECHNOLOGIES FOR RECORDING DAILY TEMPERATURE AND HUMIDITY VARIATIONS

Methods for engineering and implementing the automated system for gathering and analysis of the information about the parameters of the physical environment in long-term non-stop observations are reported. The system architecture involves microprocessor-based units with wireless technology. Trial runs took place during field experiments in a mire near the Kindasovo research station and in greenhouses of the Agrobiological Station of the Institute of Biology, Karelian Research Centre of RAS.

K e y w o r d s : automated system, environmental parameters, field experiments, wireless technology, information gathering and transmission.

Введение

Температура и влажность являются одними из ведущих факторов жизнедеятельности растительных организмов, определяющих фотосинтетические процессы, а следовательно, их рост, развитие и продуктивность. Ввиду явно выраженной нелинейности температурных характеристик фотосинтеза [Дроздов и др., 1984] детальный анализ температурных условий требует инфор-

мации не только об общем количестве тепла, но и о суточном ходе температуры и тесно коррелирующей с ней влажности воздуха [Мищенко, 1962, 1984]. Для измерения базовых параметров окружающей среды, таких как температура, влажность, освещенность, концентрация углекислого газа, используются различные устройства и системы с разными схемами питания. Зачастую подобные системы полностью автономны и не позволяют удаленно получать эксперименталь-

ные данные, а также контролировать их работоспособность без непосредственного контакта с экспериментатором. Кроме того, как правило, подобные устройства обладают фиксированным набором функций, что может ограничивать их применение в различных экспериментах.

Данная работа посвящена разработке распределенной автоматизированной системы сбора информации о различных физических параметрах окружающей среды в условиях длительных непрерывных измерений на удаленном объекте. Система создается на базе микропроцессорных устройств с использованием беспроводных технологий.

Результаты и обсуждение

Методы построения. Основным функциональным элементом системы мониторинга физических параметров окружающей среды на экспериментальном участке в полевых условиях или в теплице является микроконтроллерный модуль, обеспечивающий сбор данных с различных измерительных преобразователей. Использование микроконтроллеров позволяет обеспечить основную задачу мониторинга и удовлетворяет требованиям по миниатюризации и энергоэффективности системы.

Отдельные модули системы могут функционировать как автономно, осуществляя накопление измерительной информации на ведущем устройстве за заданный интервал времени, так и, в некоторых случаях, в оперативном режиме. С помощью различных коммуникационных технологий данные поступают на ведущий узел системы, который производит их первичную обработку и далее по запросу или в установленное время передает на сервер доступа, а в экстренных ситуациях возможна передача данных и на мобильные телефоны. В целях повышения надежности системы мониторинга применение методов резервного копирования измерительной информации является неотъемлемой ее частью и внедряется на всех уровнях.

Для сокращения стоимости и трудозатрат, необходимых для развертывания системы, используется беспроводной метод передачи данных.

Общая схема автоматизированной системы представлена на рисунке.

Реализация. Базовым элементом нашей системы являются микроконтроллеры atmega328. Они экономичны, миниатюрны, работают со стандартным напряжением питания 3,3 и 5 В, легко сопрягаются с различными измерительными и передающими мо-

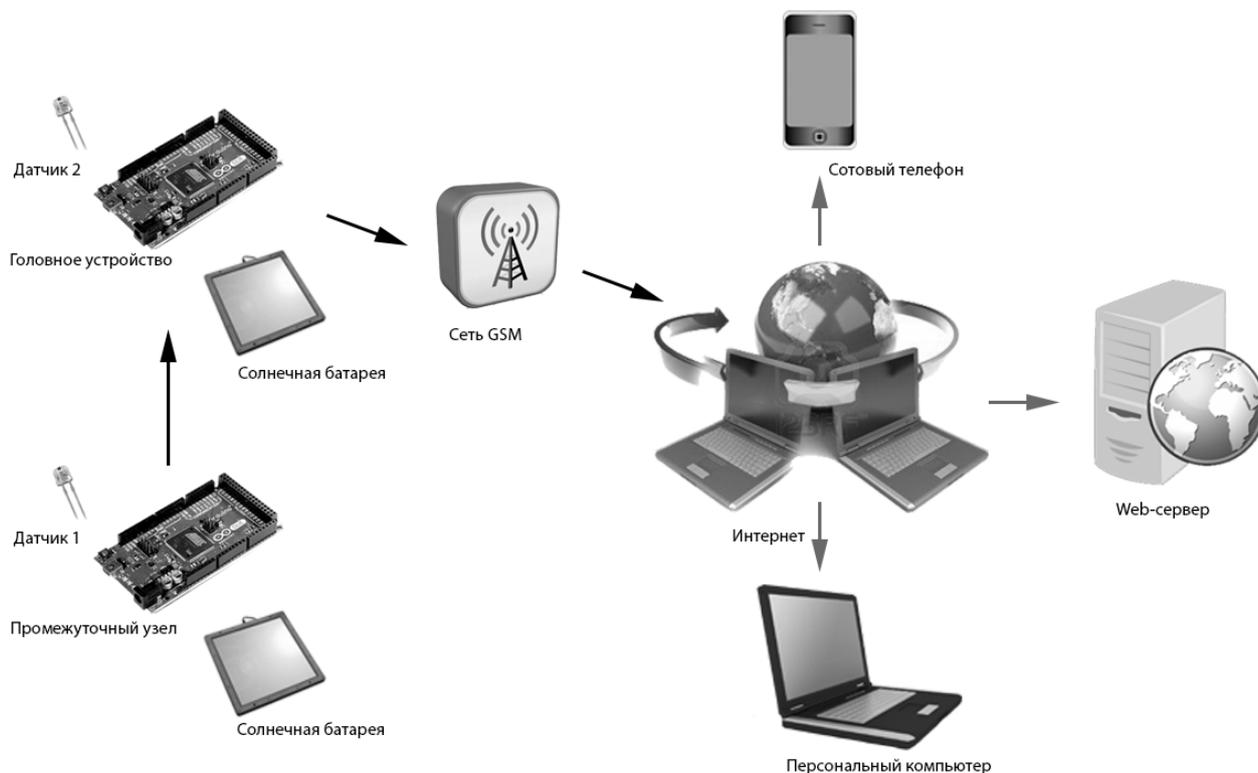


Схема автоматизированной системы сбора данных о физических параметрах окружающей среды на основе беспроводных технологий

дулями и имеют низкую розничную цену. Одним из основных языков программирования для микроконтроллеров является язык C++ [Страуструп, 2013].

Задача передачи данных с различных удаленных объектов может быть реализована с помощью множества телекоммуникационных технологий. Анализ существующих технологий [Kumar et al., 2008] показал, что наиболее разумно использовать для передачи данных готовую инфраструктуру операторов сотовой связи, раскинувшуюся на сотни и даже тысячи квадратных километров по всему миру, и поддерживаемые ими технологии. Для Российской Федерации это стандарты GSM 900/1800 и повсеместно предоставляемая услуга пакетной передачи данных GPRS. Аппаратным средством, позволяющим использовать данные возможности в нашей системе, стал GSM/GPRS модуль SIM 900. Поскольку разрабатываемая автоматизированная система будет эксплуатироваться в местах с отсутствием сетей питания (полевые условия), штатным режимом работы данного элемента является активация только в заданные моменты времени, с целью передачи накопленной информации на сервер, в остальное же время устройство должно быть выключено с целью экономии энергии. Вышеописанная передача данных на сервер происходит через сеть Интернет по протоколу передачи данных (FTP). Доступ потребителя к данным может осуществляться как по FTP, так и с использованием протокола передачи гипертекста (HTTP) в обработанном виде.

При проведении полевых экспериментов, а также опытов в защищенном грунте важно иметь возможность сбора информации о параметрах окружающей среды не только в отдельно взятой точке, но и в нескольких областях. В связи с этим нами было найдено техническое решение для сбора информации из нескольких точек экспериментальной площадки (теплицы). Поскольку использовать прямые каналы связи до сервера доступа в данной ситуации является нерациональным и неэкономичным решением как в плане материальных затрат, так и в плане расхода энергии, нами была выбрана схема подключения типа «звезда», в которой лишь центральное устройство имеет доступ к сети GSM, а многократно расходящиеся лучи могут охватывать достаточно большую территорию [Аллиев, 2011]. Удачными для нашей автоматизированной системы, с точки зрения охвата территории, энергопотребления и простоты инсталляции, оказались техноло-

гия ZigBee [Аникин, 2011] и беспроводные модули XBee Pro, имеющие контактные площадки, элементарно сопрягаемые с микроконтроллерами. Высокая мобильность точек измерения и способность к реконфигурации сети стали решающим фактором. Для увеличения числа точек измерений в пределах нескольких метров от конечных микроконтроллеров использована технология OneWire [Kusznir, 2010] и миниатюрные, простые в использовании и обслуживании датчики DS18B20 и DS1920. Данная технология не предъявляет жестких требований к проводникам, а ведущее устройство легко реализуется на микроконтроллере.

Для фиксирования времени измерения в автоматизированной системе использованы высокоточные часы реального времени (RTC) DS3231 со встроенными I2C-интерфейсом, термокомпенсированным кварцевым генератором (ТЧХО) и кварцевым резонатором.

В связи с тем, что полученные за установленный период времени данные передаются потребителю порциями, возникает необходимость локального хранения информации, что обеспечит ее сохранность на случай отказа или выхода из строя системы питания. Использование для хранения данных встроенной памяти микроконтроллера представляется неразумным, так как встроенная память достаточно мала. В связи с этим мы предлагаем использовать энергонезависимую память на базе SD-карт.

Заключение

Разработанная автоматизированная система апробирована для сбора и беспроводной передачи (посредством мобильных сетей и глобальной сети Интернет) информации о суточном ходе температуры и влажности воздуха при проведении мониторинговых исследований на болоте стационара «Киндасово» (полевые сезоны 2010–2012 гг.) и при проведении экспериментов с растениями томатов в теплице на Агробиологической станции ИБ КарНЦ РАН (вегетационный период 2012 г.). Обеспечено резервное копирование данных на SD-карту микроконтроллерного модуля. Актуальной остается задача энергосбережения, которую предлагается решить путем использования различных энергосберегающих технологий. Предполагается использование батарей емкостью в диапазоне от 2 до 6 Ah, а также источников альтернативного питания – солнечных батарей.

Литература

Аллиев Т. И. Сети ЭВМ и телекоммуникации. СПб.: СПбГУ ИТМО, 2011. 400 с.

Аникин А. Обзор современных технологий беспроводной передачи данных в частотных диапазонах ISM (Bluetooth, ZigBee, Wi-Fi) и 434/868 МГц // Беспроводные технологии. 2011. Т. 4, № 25. С. 6–12.

Дроздов С. Н., Курец В. К., Титов А. Ф. Терморезистентность активно вегетирующих растений. Л.: Наука, 1984. 168 с.

Мищенко З. А. Суточный ход температуры воздуха и его агроклиматическое значение. Л.: Гидрометеоздат, 1962. 198 с.

Мищенко З. А. Биоклимат дня и ночи. Л.: Гидрометеоздат, 1984. 280 с.

Страуструп Б. Программирование, принципы и практика использования C++. М.; СПб.; Киев: изд-во «Вильямс», 2013. 1248 с.

Kumar B. R., Reddy L. C., Hiremath P. S. Performance comparison of Wireless mobile Ad-Hoc routing protocols // IJCSNS Intern. J. Computer Sci. and Network Security. 2008. Vol. 8, N 6. P. 337–343.

Kusznir J. Designing lightweight software architectures for smart environments // Abstr. 6th Intern. conf. Washington State Univ. Pullman WA USA. 2010. P. 220–224.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Яковлев Владимир Викторович

главный инженер-программист
Карельский научный центр РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: velvol@mail.ru
тел.: (8142) 785329

Лукьянов Александр Юрьевич

аспирант
физико-технический факультет ПетрГУ
пр. Ленина, 33, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: luausr@gmail.com
тел.: (8142) 719682

Когут Антон Андреевич

аспирант
физико-технический факультет ПетрГУ
пр. Ленина, 33, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: kogutanton@gmail.com
тел.: (8142) 719682

Сысоев Дмитрий Алексеевич

студент
лесоинженерный факультет ПетрГУ
пр. Ленина, 33, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: mopik@sampo.ru
тел.: (8142) 700674

Yakovlev, Vladimir

Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: velvol@mail.ru
tel.: (8142) 785329

Luk'yanov, Alexandr

Faculty of Physical Engineering
Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: luausr@gmail.com
tel.: (8142) 719682

Kogut, Anton

Faculty of Physical Engineering
Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: kogutanton@gmail.com
tel.: (8142) 719682

Sysoev, Dmitry

Faculty of Forest Engineering
Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: mopik@sampo.ru
tel.: (8142) 700674

ЮБИЛЕИ И ДАТЫ

ИНСТИТУТУ БИОЛОГИИ КАРЕЛЬСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РАН – 60 ЛЕТ

Приказ о штатном расписании Института биологии Карельского филиала АН СССР (ИБ) был подписан 29 апреля 1953 года. Среди организаторов ИБ и его подразделений можно назвать таких выдающихся известных биологов, как чл.-корр. АН СССР Ю. И. Полянский, чл.-корр. АН СССР Н. И. Пьявченко, доктора наук И. Ф. Правдин, А. С. Лутта, В. Д. Лопатин. Следует отметить выдающуюся роль в дальнейшем развитии ИБ председателя Президиума Карельского филиала АН СССР профессора В. П. Дадыкина, директоров – к. б. н. И. А. Петрова, д. б. н. А. И. Коровина и особенно д. б. н., профессора, заслуженного деятеля науки Российской Федерации и КАССР С. Н. Дроздова, руководившего ИБ в 1961–1995 гг.

В дни юбилеев принято вспоминать о пройденном пути, оценивать настоящее, размышлять о будущем. Создание нашего института в начале пятидесятых годов символично. Именно этот период – важнейший рубеж в истории биологии XX века. В рамках традиционных биологических наук возникли отдельные дисциплины, области и направления исследований, претендующие на автономное существование. Прогресс биологии в целом стал возможен благодаря разработке и широкому применению новых методов исследований, базирующихся на достижениях физики, химии, математики, техники. Чрезвычайно быстрыми темпами стали развиваться новые представления о биохимических основах жизни, изменившие весь облик биологии, что позволило выйти на понимание механизмов биологических процессов на органном, клеточном, субклеточном, молекулярном уровнях. Возникла совершенно новая отрасль – молекулярная биология. В этот период были сделаны многочисленные открытия, удостоенные Нобелевской премии.

Молекулярная диагностика и терапия, создание трансгенных животных и растений, высокие генные биотехнологии в сельском хозяйстве, медицинской и пищевой промышленности, разработка биологически возобновляемых источников энергии, внедрение экологически чистых биотехнологий, экологическое биотестирование и биомониторинг окружающей среды, сохранение биоразнообразия экосистем – основные направления биологических исследований конца XX – начала XXI веков, имеющие значение не только для развития теоретической и практической биологии, но и для решения проблемы биологической безопасности. Стало ясно, что для выполнения этих задач необходимо поддерживать высокий уровень биологической науки в стране.

Особо следует сказать о важной биологической составляющей – экологии. Когда в 1866 г. Э. Геккель впервые употребил слово «экология», обозначив им биологическую науку, изучающую взаимоотношения организмов и окружающей среды, он, наверное, не подозревал о том, что через сто с небольшим лет слово это, многократно повторенное газетами и журналами всего мира, станет своеобразным символом своего времени.

Широкий спектр условий, в которых формировалась экологическая наука России в текущем столетии, определил ее специфику, сочетающую масштабность и системность в охвате явлений с познанием тонких глубинных механизмов, лежащих в их основе.

Негативные стороны таких видов деятельности человека, как развитие промышленности, транспорта, добыча полезных ископаемых, массированное уничтожение лесов, загрязнение пресноводных и морских акваторий, имеют глобальные экологические последствия. Речь идет

о нарушении функционирования природных сообществ живых организмов, совокупная деятельность которых обеспечивает саму возможность существования жизни на Земле. В этом плане человек представляет собой лишь одну из форм жизни – высокоразвитую, владеющую на современном этапе эффективными способами воздействия на природу.

Установить взаимоотношения с природными процессами, обеспечивающими устойчивое поддержание жизни на нашей планете, можно лишь на основе знания законов формирования и поддержания активного функционирования биологических систем, обеспечивающих глобальный круговорот веществ. Такой биоцентрический подход отражает наиболее фундаментальные проблемы экологии как науки. Именно это научное направление является одним из приоритетных в Отделении биологических наук РАН и одним из важнейших в исследованиях ИБ.

Исследования, проводимые в ИБ, охватывают различные отрасли биологии – ботанику, зоологию, ихтиологию, паразитологию, экологию, биохимию, физиологию растений и животных, генетику, молекулярную биологию, иммунологию, биофизику, почвоведение. Это позволяет выполнять научные исследования в биологических системах как надорганизменного (биоценозы и популяции), так и клеточного и молекулярного уровней.

Возглавляют эти исследования доктора наук П. И. Данилов, Е. П. Иешко, В. А. Илюха, П. В. Красильников, О. Л. Кузнецов, Н. Н. Немова, Е. К. Олейник, О. П. Стерлигова, М. И. Сысоева, А. Ф. Титов, кандидаты наук А. С. Горюнов, О. Н. Лебедева.

Научные исследования проводятся по нескольким фундаментальным направлениям биологических наук: биология популяций, биоценозы, генезис и структура почв, биоразнообразие, палеоботанические аспекты эволюции, фотосинтез, экологическая физиология растений и животных, экологическая биохимия и биофизика, биология развития, охрана и рациональное использование природных ресурсов. Все они имеют четко выраженную экологическую направленность, и одно лишь перечисление основных результатов вышеназванных научных исследований, полученных за 60 лет существования института, заняло бы не одну страницу.

Среди важнейших результатов здесь следует назвать работы по реконструированию динамики растительности и составлению биостратиграфической схемы позднеледникового и голоцена для севера европейской части Рос-

сии, а также прогноз развития болот и лесов на следующее тысячелетие. Впервые разработана детальная тополого-экологическая классификация типов растительных сообществ болот Европейского Севера России и выполнена их ординация; проведен анализ флоры сосудистых растений болот Европейского Севера России и Финляндии, бриофлоры, постмелиоративной динамики растительного покрова болот среднетаежной Карелии и луговой растительности Карелии. Разработаны картосхемы продуктивности ягодных растений болот (лаборатория болотных экосистем).

Выявлены закономерности пространственного распределения почвенных свойств и пространственной неоднородности почв лугов Южной Карелии, а также показана зависимость формирования урожайности многолетних трав от комплекса факторов (лаборатория экологии и географии почв).

Выявлены высокий динамизм и неустойчивость ареалов и численности популяций охотничьих животных, характерные для северо-запада России и Фенноскандии. Для одних видов отмечается выраженная тенденция продвижения на север, для других – на юг и на запад. Ряд видов демонстрируют неопределенную пульсацию ареалов – смену сплошного ареала на фрагментированный и обратный процесс. Установлено, что расширение ареалов инвазийных видов на территории Восточной Фенноскандии сопровождается формированием сложных биоценологических отношений с аборигенными животными. Многолетний мониторинг орнитофауны позволил выявить основные тенденции ее динамики, раскрыть механизмы расселения видов за границы ареалов и закрепления на новых территориях (лаборатория зоологии).

Впервые выявлено, что относительная эффективность передачи вещества и энергии с одного трофического уровня на другой близка у различных по трофности водных систем от тундры до тропиков (абсолютные величины могут изменяться в десятки, сотни раз). Полученные результаты могут быть использованы для построения балансовых моделей водных экосистем. Определены продукционные возможности водоемов Карелии, находящихся под разными видами антропогенного воздействия. Предложена классификация лососевых нерестовых рек Восточной Фенноскандии по эколого-гидрологическим характеристикам, биологическим особенностям и запасам атлантического лосося, позволяющая оценить их репродуктивный потенциал (лаборатория экологии рыб и водных беспозвоночных).

Разработана концепция формирования фауны паразитов рыб эвтрофируемых пресноводных экосистем; определен круг видов, формирующих и поддерживающих очаги опасных гельминтозов птиц, рыб и человека; показано, что основным фактором, определяющим активность природного очага клещевого энцефалита на территории средней тайги, является численность ведущего носителя инфекции и основного прокормителя таежного клеща – европейской рыжей полевки; выявлен общий характер ответных реакций сообществ почвенных нематод на широкий диапазон воздействующих факторов при естественной и антропогенной трансформации (лаборатория паразитологии животных и растений).

На основе тест-системы температурозависимой хлорофиллдефектности многолетнего перекрестноопыляющегося злака *Festuca pratensis* Huds. показано, что изучаемый тип хлорофиллдефектности находится под защитой генетических (супрессия) и популяционных механизмов: формирование особого морфо-физиологического комплекса признаков с индивидуальной светочувствительностью и действие стабилизирующего отбора, который обеспечивает в популяции высокую частоту особей с фотопротекторными признаками. В северных природных популяциях *Arabidopsis thaliana* (модельного объекта генетических исследований) выявлен повышенный уровень генетического разнообразия по микросателлитным маркерам, который представляет собой основу для адаптивных процессов в популяциях, расположенных на северной границе ареала (лаборатория генетики).

Изучение физиологических, биохимических, генетических особенностей адаптации живых организмов в условиях Севера позволило выявить закономерности изменения устойчивости, роста и развития растений, комплекса структурно-функциональных особенностей фотосинтетического аппарата при действии неблагоприятных температур и тяжелых металлов. Также показана возможность модификации реакции растений на действие неблагоприятных факторов внешней среды с помощью синтетических регуляторов роста; показано участие в механизмах холодовой адаптации растений АБК-зависимых и АБК-независимых генов и кодируемых ими транскрипционных факторов и стрессовых белков; выявлено изменение уровня экспрессии генов устойчивости *H1* и *Gro 1-4* при кратковременном (ДРОП) и постоянном (ПНТ) действии низкой закалывающей температуры у устойчивого и восприимчивого к заражению картофельной цистообразующей нематодой сортов картофеля (лаборатория экологической физиологии растений).

Выявлены механизмы физиологической адаптации животных к световому фактору с использованием подхода по «функциональному» выключению регулятора ритмов – эпифиза – с помощью постоянного освещения; установлено изменение антиоксидантной системы, изоферментного спектра лактатдегидрогеназы и состава лейкоформулы в условиях постоянного освещения как самок крыс в период беременности, так и их потомства, а также влияния мелатонина на возрастную динамику элементов крови лабораторных животных, содержащихся при различных световых режимах, и у хищных млекопитающих – при естественном освещении (лаборатория экологической физиологии животных).

Исследованы уровень энергетического и пластического обмена, особенности метаболизма белков, липидов и углеводов и взаимосвязь этих процессов, регуляция интенсивности и направления ключевых реакций метаболизма, состояние и функционирование мембран клеток, действие защитных систем гидробионтов для оценки происходящих изменений в их органах и тканях, а также для изучения адаптационных процессов при воздействии различных природных и антропогенных факторов на водные экосистемы Европейского Севера (лаборатория экологической биохимии).

Методом компьютерного моделирования показано, что в бислоях, которые образованы молекулами липидов с ненасыщенными цепями ацилов, сосуществуют протяженные участки с различным характером ориентационного упорядочения связей, различными степенями анизотропии кривых распределения по ориентациям связей относительно оси, перпендикулярной к поверхности бислоя (лаборатория экологической биохимии).

Изучение механизмов устойчивости белковых молекул и клеточных мембран при их взаимодействии с углеродными наноструктурами природного и искусственного происхождения позволило выявить механизмы воздействия физико-химических факторов на биологические системы, включая клетку и ее плазматическую мембрану, имеющие как общие, так и специфические черты. Вскрыты некоторые особенности реализации этих механизмов на молекулярном уровне, включающие взаимодействие нанougлерода с мембраной эритроцита и модификацию структурного состояния глобулярных белков. Эти результаты показывают, что механизмы, компенсирующие модифицирующее действие нанодисперсных углеродных структур на биосистему, реализуются уже на молекулярном уровне и, вероятно, представляют собой первичный – неспецифический

физико-химический – уровень механизма адаптации и устойчивости организмов (группа молекулярной биофизики).

Выявлено, что иммунная система может выполнять двойственную роль в патогенезе сосудистых заболеваний головного мозга (инсульты, атеросклероз и т. п.) человека. При этом происходят изменения в функциональном состоянии лимфоцитов и в системе регуляторных клеток Трег, отвечающих за иммунную супрессию. В острой фазе активизируются механизмы, приводящие к иммунному воспалению, а в дальнейшем, как компенсаторный механизм, развивается иммуносупрессия. Ключевую роль в развитии иммунной супрессии играют клетки с фенотипом CD127^{low/-}CD25^{high}. Эти результаты могут быть использованы при оценке иммунного статуса больных сосудистыми заболеваниями головного мозга (группа иммунологии).

Установлен повышенный риск сердечно-сосудистых заболеваний у жителей Карелии – носителей определенных генотипов полиморфных вариантов циркадных генов *CLOCK* и его зависимость от пола (группа молекулярной биологии).

Число научных публикаций сотрудников института в отечественных и международных изданиях только за последние 10 лет составляет около 3000, в том числе 73 монографии, 29 тематических сборников, 54 научно-методических и информационных издания. Сотрудники института получили в общей сложности 26 патентов на изобретение и полезную модель, свидетельств на базы данных и на другие объекты интеллектуальной собственности.

Особую оценку результаты фундаментальных исследований имеют в том случае, если содержат инновационную составляющую и охраноспособны. Это направление в исследованиях института также представлено. Вот отдельные примеры.

Многолетние наблюдения за условиями инкубации икры лососевых рыб на нерестовых реках Карелии и Кольского полуострова после естественного нереста стали основой для разработки технологий инкубации икры лососевых видов рыб в естественных условиях речного потока. Технологии апробированы и адаптированы к гидрологическим и гидравлическим условиям разнообразных озерно-речных систем с учетом биологических характеристик икры и эмбрионов. Данные технологии могут быть использованы при восстановлении численности лососевых рыб на рекультивированных нерестовых участках рек, ранее разрушенных лесосплавом, гидростроительством или воздействием других видов хозяйственной деятельно-

сти. По итогам работы получено два патента на полезную модель. Результаты исследований были представлены на международной выставке-конгрессе «Высокие технологии, инновации, инвестиции» в Санкт-Петербурге (2008). Получен диплом I степени (с вручением золотой медали) за данную разработку в номинации «Лучший инновационный проект в области технологий живых систем». Автору разработки д. б. н., профессору А. Е. Веселову вручено Благодарственное письмо Главы Республики Карелия за большой вклад в реализацию государственной политики в области разработки и внедрения инновационных технологий.

Выполнены комплексные исследования, включающие гидрологию, гидрохимию, гидробиологию и рыбное население 94 водоемов в 14 районах Республики Карелия, которые позволили оценить запасы биоресурсов и определить рыбопродуктивность озер. Создана база данных, содержащая тематические карты исследуемых озер с нанесением на них географических координат и топографических названий участков промышленного, любительского и спортивного рыболовства, а также промышленного рыбоводства. Электронная база данных по состоянию внутренних водоемов Республики Карелия передана в Министерство экономического развития и Министерство сельского, рыбного и охотничьего хозяйства Республики Карелия (д. б. н. О. П. Стерлигова).

Предложена технология предпосадочной обработки клубней картофеля с помощью кратковременного низкотемпературного воздействия, преимуществом которой является снижение степени заражения растений опасным вредителем культуры – картофельной цистообразующей нематодой, а также повышение урожая картофеля за счет увеличения доли крупных клубней, улучшение их качества за счет большего содержания в клубнях крахмала и витамина С. Технология запатентована (д. б. н. М. И. Сысоева).

Предложен способ, включающий культивирование оздоровленных растений картофеля *in vitro* путем черенкования на питательную среду, содержащую макро- и микроэлементы, получение меристемных растений-регенерантов и высадку растений в грунт. Способ позволяет улучшить жизнеспособность растений-регенерантов при пересадке в грунт, повысить холодостойкость растений картофеля и устойчивость растений к картофельной цистообразующей нематодой, а также повысить урожайность картофеля. Способ прост, доступен и экологически безопасен для использования в практике сельского хозяйства. Получено положительное решение на изобретение (д. б. н. М. И. Сысоева).

Применение тест-системы – «комплекса биохимических показателей» позволило проанализировать действие различных природных и антропогенных факторов в водных экосистемах Европейского Севера и дать оценку состояния водных организмов и среды их обитания. Такого рода исследования важны как для решения проблем рационального природопользования, так и для прогноза возможных изменений гидробионтов в водоеме, и могут стать основой для научного обоснования рыбохозяйственных мероприятий (член-корр. РАН Н. Н. Немова).

Результаты исследований, проводимых в ИБ, находят применение в различных областях производственной деятельности и социальной сферы.

Министерству по природопользованию и экологии Республики Карелия ежегодно передаются сведения о растительном и животном мире для издания Государственного доклада о состоянии окружающей среды Республики Карелия – разделы «Мир растений, грибов и животных, их состояние, использование и охрана»; «Природно-очаговые и зооантропонозные инфекции» (д. б. н. П. И. Данилов, д. б. н. О. Л. Кузнецов, д. б. н. Е. П. Иешко, О. П. Стерлигова).

Значителен вклад ИБ в области охраны природы РК. Совместно с российскими и финскими специалистами изданы Красная книга Карелии, Красная книга Республики Карелия и Красная книга Восточной Фенноскандии. На базе научных обоснований, разработанных нашими учеными, приняты постановления Правительства РФ и Правительства РК о создании ряда природных охраняемых территорий федерального и регионального уровней.

Успешно развивается научное сотрудничество с институтами и вузами Карелии, различных регионов нашей страны, ближнего и дальнего зарубежья. Прежде всего это научные коллективы Института леса КарНЦ РАН и Института водных проблем Севера КарНЦ РАН, эколога-биологического, медицинского и агротехнического факультетов ПетрГУ, естественно-географического факультета КГПА, ведущих институтов РАН и вузов Москвы, Санкт-Петербурга, Екатеринбурга, Сыктывкара, Мурманска и других городов России.

Международные научные связи традиционно развиваются с университетами и учреждениями Финляндии, Швеции, Норвегии, Германии, Польши, Венгрии, Мексики и некоторых других стран. С 2003 г. выполнены исследования по 46 двусторонним и многосторонним международным проектам.

ИБ участвует в выполнении ряда конкурсных проектов в рамках федеральных целевых, ведомственных и региональных научно-технических программ, получая гранты российских и международных научных фондов. Это ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы, «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники на 2006–2013 гг.»; программы фундаментальных исследований Президиума РАН («Биологическое разнообразие», «Живая природа», «Фундаментальные науки – медицине»); программы фундаментальных исследований ОБН РАН («Биологические ресурсы России: фундаментальные основы рационального использования», «Биологические ресурсы России: оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга», «Биологические ресурсы России: динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий»); РЦП «Экология и природные ресурсы Республики Карелия на 2004–2010 гг.», Министерства сельского, рыбного хозяйства и экологии РК, «Прикладные научные исследования и разработки». За последние 10 лет выполнены исследования по 204 конкурсному проектам и 32 договорам с хозяйствующими субъектами.

В ИБ сложилось шесть научных школ: отечественная школа промысловой зоологии и популяционной экологии (руководители д. б. н., профессор П. И. Данилов, чл.-корр. РАН Э. В. Ивантер), экологической физиологии растений (руководители д. б. н., профессор С. Н. Дроздов и чл.-корр. РАН А. Ф. Титов), болотоведения (руководитель д. б. н. О. Л. Кузнецов), паразитологии (руководитель д. б. н., профессор Е. П. Иешко), ихтиологии и гидробиологии (руководитель д. б. н. О. П. Стерлигова), экологической биохимии (руководитель чл.-корр. РАН Н. Н. Немова). Коллектив научной школы экологической биохимии животных с 2003 года получает гранты Президента РФ для государственной поддержки научных исследований, проводимых ведущими научными школами РФ.

Экспертная деятельность – одно из направлений работы научных сотрудников. Это прежде всего работа в диссертационных советах, в редакционных коллегиях научных журналов, в различных экспертных и научно-консультативных советах и комиссиях региональных органов государственной и исполнительной власти.

ИБ осуществляет подготовку кадров высшей квалификации по шести специальностям: зоология, ихтиология, экология, биохимия, физиология, а также физиология и биохимия

растений. Аспиранты и молодые ученые проходят стажировки на базе институтов РАН, вузов и международных научных организаций, используя финансовую поддержку различных российских и международных фондов. Молодые ученые ИБ также получают гранты Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук, гранты ФЦП, РФФИ, международных организаций и университетов. За период с 2003 г. защитили кандидатские диссертации 51 человек, из них 75 % – молодые ученые в возрасте до 35 лет, докторские диссертации защитили 14 человек.

При ИБ действует эколого-биологический учебно-научный центр. Студенты вузов-партнеров (ПетрГУ и КГПА), 60–80 человек ежегодно, проходят учебную и производственную практику, готовят курсовые и дипломные работы, участвуют в выполнении научных исследований под руководством научных сотрудников ИБ. За последние 10 лет защитили дипломные работы около 300 студентов. Наиболее способные и проявившие интерес к исследовательской работе поступают в аспирантуру ИБ. Научные сотрудники ИБ занимаются педагогической деятельностью в вузах г. Петрозаводска, издают учебные и учебно-методические пособия, совместно с представителями вузов выполняют исследования по конкурсным проектам ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы, РФФИ, привлекая к этой работе аспирантов и студентов.

Сотрудники ИБ принимают активное участие в работе научных мероприятий различного уровня в России и за рубежом, получая финансовую поддержку различных фондов. На базе ИБ регулярно проводятся конференции, симпозиумы, семинары российского и международного значения по разным проблемам биологии. Следует отметить, что о научном уровне проводимых нами конференций говорит тот факт, что они систематически находят финансовую опору в российских и международных фондах поддержки науки.

Организационная деятельность включает развитие Центра коллективного пользования научным оборудованием (ЦКП) «Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера», созданного на базе структурных подразделений института. Экспериментальные возможности ЦКП используют как научные сотрудники и аспиранты института, так и внешние пользователи: студенты, аспиранты, научные работники вузов и институтов РАН. Как правило, исследования выполняются в рамках совместных конкурсных проектов. Подобный подход позволяет аккумулировать и экономить материальные ресурсы, а также получать финансирование по конкурсным проектам.

За значительный вклад в развитие фундаментальных и прикладных исследований, подготовку научных кадров, педагогическую деятельность сотрудники Института биологии награждены государственными наградами РФ, наградами РК, РАН и других ведомств. В юбилейный год д. б. н., профессор Петр Иванович Данилов награжден орденом Дружбы, а кандидат наук Светлана Александровна Мурзина получила золотую медаль Российской академии наук с премией для молодых ученых РАН.

ИБ продолжает активную исследовательскую работу, развивая новые передовые биологические направления исследований, осуществляет активную подготовку научных кадров, обеспечивая преемственность поколений в науке, и мы надеемся, что достижения российской науки в целом будут востребованы обществом и бизнесом и она будет успешно развиваться во имя НАУКИ и ОБЩЕСТВА.

*Н. Н. Немова,
член-корр. РАН, директор ИБ КарНЦ РАН;
О. Н. Лебедева,
к. б. н., заместитель директора по научной
работе ИБ КарНЦ РАН*

ИЗ ВОСПОМИНАНИЙ ПРОФЕССОРА ВЛАДИМИРА КОНСТАНТИНОВИЧА КУРЦА

В Карело-Финский филиал АН СССР я был принят 5 ноября 1957 г. Просматривая газету, наткнулся на объявление: «Карельскому филиалу АН СССР требуется инженер по оборудованию. Оклад 1200 руб.» Пошел. Меня принял Михаил Васильевич Иванов – зам. председателя Президиума филиала по общим вопросам. Это был первый мой шаг в Храм науки. Необходимость в должности, которую я занял в филиале, возникла в связи с предписанием Академии наук «Об организации систематической поверки измерительной аппаратуры лабораторий». Человечество познает мир, по Менделееву, через меру и вес. От точности приборов, которыми пользуется ученый, соответствия их общепринятым эталонам зависит сопоставимость результатов исследований лабораторий всего мира. Помимо организации строгого контроля над соблюдением графика Госповерок особо точных приборов необходимо было наладить ведомственную поверку подлежащих ей приборов лабораторий.

Филиал имел небольшую экспериментальную мастерскую, стеклодува-лабораторника, столяра. Всем этим хозяйством ведал заместитель председателя по общим вопросам. Разумеется, он не имел возможности вникать во все дела, с которыми обращались сотрудники лабораторий в мастерскую, конструировать даже простейшие приборы и приспособления. Все это дело М. В. Иванов поручил инженеру по оборудованию, т. е. мне. Стеклодув, мой земляк И. И. Пелля, был достаточно опытен, мог выполнять все работы по ремонту и изготовлению лабораторной посуды и приборов из стекла. Стекло, в виде стеклянных трубочек разного диаметра – дрота, поступало к нам из «Дружной горки». Столяр, которого тоже можно было назвать лабораторником, тоже земляк, М. И. Мюллери, начал свою столярную деятельность еще в институте Павлова в Колтушах. Все вспоминал, как строили там «комнату тишины». Уровень его квалификации был очень высок – я многому научился у него. Электрические схемы приборов

чинил Борис Галашов, недавно демобилизованный с флота радист. Токарным делом занимался В. В. Тычинин. Но он был увлечен, вместе с сотрудником-лесоводом Т. И. Кищенко, конструированием «лесной сеялки» на базе бензопилы «Дружба», и поймать его для выполнения токарных работ было трудно.

Вернувшись в конце зимы с ББС «Картеш» в филиал, принялся было за организацию поверки и обслуживания лабораторной измерительной и прочей техники. Но тут обратился ко мне новый директор Института биологии Аркадий Иванович Коровин. Он исследовал влияние холодных почв Севера на минеральное питание и различные физиологические показатели растений с целью поиска путей повышения урожайности. Опыты под его руководством проводили вегетационным методом, растения выращивали до урожая в вазонах (сосудах) на песке, в который вносили заданные дозы основных удобрений – азота, фосфора и калия, а также микроэлементы – создавались модели почв разного минерального состава. Поливались сосуды по весу, благодаря чему в почве поддерживалась постоянная влажность. Для снижения температуры почвы сосуды размещали в ваннах, через которые протекала вода из расположенного выше по склону родника, с температурой порядка 9°. Регулируя краном подачу воды, можно было, в ограниченных пределах, регулировать температуру почвы. Для сравнения было интересно знать, как поведут себя подобные растения при повышенных температурах почвы. Сделали А. И. Коровину ванну с электроподогревом под днищем и простейшим регулятором температуры. Опыты стали информативнее. Они, как и полевые наблюдения, позволили Аркадию Ивановичу сформулировать положение об использовании в северных условиях «тройной дозы удобрений». Директор агробазы М. М. Цыба критиковал опыты А. И.: «Это все равно что сидеть в парилке, опустив ноги в тазик с холодной водой», отмечая, что само-то растение было в тепле оранжереи, в которой проводили опыты.

Для того чтобы показать влияние температуры почвы в грунте под открытым небом, Коровин попросил меня устроить «термоплощадку» с участками (грядками) трех типов – холодным, теплым и контрольным. На складе Филиала нашлись 50-миллиметровые стальные трубы и соединительные муфты к ним. Я разработал «проект». На всех участках, на глубине 30 см укладывались вдоль по 4 трубы. На теплой делянке они посредством коллекторов и возвратной трубы подключались к баку (бочке 200 л) с электродным подогревателем, на холодной делянке в трубы поступала вода, сливаемая из «холодных» ванн оранжереи, а трубы контроля были уложены только для «утеснения» корней растений, как и на других участках, при естественном ходе температуры почвы. Сварить коллекторы удалось за 50 рублей наличными в мастерской Горводопровода.

Почва на участках была выровнена по содержанию элементов минерального питания. Участки были разбиты на делянки, на которых посеяли семена разных культур – пшеницы, кукурузы, гороха и клубни картофеля. Разница в температурах почвы на делянках была небольшой, но проявилась она, к моему, Цыбы и самого Аркадия Ивановича удивлению, очень сильно, весьма наглядно! Забавно отметить, что термоплощадка подвергалась нападению хищников. Поскольку на ней использовалось напряжение сети 380 В, помимо обязательных мер электробезопасности, вокруг нее были дополнительно выставлены плакаты – белый череп на черном фоне. И ближе к осени, когда ночи стали темными, какая-то хищная птица атаковала плакат, приняв белеющее изображение черепа за зверька, и оставила на нем свои когти автограф.

В Институт биологии прибыл молодой кандидат наук, выпускник Пушкинского СХИ Станислав Николаевич Дроздов. При выборе направления его деятельности А. И. Коровин, к этому времени уже доктор наук, предложил ему заняться изучением очень актуального для земледелия большей части страны вопроса – влияния летних заморозков, когда растения активно растут, на урожай. (Об актуальности темы свидетельствуют не только ученые. Вспомним кинофильм «Свадьба с приданым» – интрига во многом крутится вокруг летнего заморозка.) К этому времени вопросы холодоустойчивости зимующих, подготовившихся физиологически к понижениям температуры ниже нулевой растений были изучены довольно-таки полно. Но заморозкоустойчивость активно растущих растений оставалась малоизучен-

ной. Основной причиной этого было то, что эти исследования проводились при естественных заморозках, время и ход которых, предшествующие и последующие условия, возраст растений были различными, и для выявления общих закономерностей необходимо было огромное количество наблюдений.

К концу 50-х годов прошлого века искусственный холод уже широко применялся и в промышленности, и в быту. Обычными стали домашние холодильники, поезда и автомобили рефрижераторы, торговля оснастилась холодильными камерами, и в городском хозяйстве появились специалисты и предприятия по монтажу и обслуживанию холодильной техники. Вот эту-то технику и было решено использовать для получения искусственных заморозков. Поскольку в те годы все оборудование и материалы приобретались по «заявкам», которые подавались в «Центракадемснаб» на следующий год, а родившаяся идея требовала быстрой реализации – мысль-то не остановишь! – было решено приступить к исследованиям, не дожидаясь оборудования по заявкам, немедленно! Познакомились с техническим руководителем местного Торгмонтажа, ведающим холодильным делом, Кюном (бывшим летчиком, перегонявшим лендлизовские самолеты через Сибирь). Кюн обещал содействие в приобретении малой фреоновой холодильной машины и ее монтаже.

Установку для проведения искусственных заморозков решили сделать двухкамерной – на два варианта опыта. А. Гора (плотник) сколотил из досок две камеры и тамбур перед ними, навес для холодильной машины. Кюн фактически бесплатно предоставил холодильный агрегат – оплачивался только монтаж, повесил испаритель (ту часть машины, в которой кипит фреон, поглощая тепло) – в одну камеру большей, в другую – меньшей частью, чтобы температуры были разные, смонтировал трубопроводы. Подтянули кабель от лаборатории, поставили щиток управления. А тут и зима наступила, снег пошел. Для защиты от летнего тепла было решено засыпать все сооружение снегом, а с наступлением морозов залить его водой из родника. Это дело оказалось не таким уж простым! Затем построили вокруг этого снежного «вигвама» стены и крышу из подручных материалов и заполнили это сооружение опилками для теплоизоляции. (Часть снега в этом сооружении сохранилась до следующей осени.)

Исходя из того, что предшествующие условия влияют на исход заморозка, заказали столяру Института биологии два остекленных вегета-

ционных шкафа, кубометра по два объемом, для установки в естественных условиях. Один шкаф имел электрический подогрев, другой – охлаждение родниковой водой. Все эти «сооружения» были подготовлены к следующему лету. Надо было приобрести дистанционный термометр для измерения температуры листьев – объектов очень тонких – во время искусственного заморозка. Вспомнил о статье в журнале «Радио» с описанием дифференциального электротермометра с термопарами медь-константан. На складе Филиала была обнаружена катушка константанового провода 0,1 мм, ну а с медью такого диаметра проблем не было! В запасах приборов Филиала нашелся необходимый нулевой гальванометр, и термометр был смонтирован. Термопара, изолированная лаком для ногтей, прижималась к листу зажимом из тонкой стальной проволоки (струны) с наконечниками из пенопласта. Температура листа измерялась относительно температуры тающего льда.

Предполагалось, что разработанная система камер, шкафов и ванн – корневых термостатов позволит исследовать устойчивость растений к заморозкам на разных фазах роста в зависимости от силы заморозка, предшествующих температур почвы и воздуха и уровня минерального питания – то есть даст возможность изучить влияние комплекса факторов среды и работать целой группе исследователей. Степень повреждения растений при этом предполагалось оценивать визуально, по пятибалльной шкале. Весной выселили семена пшеницы в вегетационные сосуды и стали проводить опыты на разных фазах роста растений. Результаты опытов оказались новыми и столь интересными, что были приняты к публикации журналом «Доклады АН» (т. 136, № 4, 1961 г.). Участие в этой работе было первым моим шагом в строй «Служителей Храма Науки».

Затем поступила заказанная через «Академснаб» торговая холодильная камера с более мощным холодильным агрегатом, которая была переоборудована нами в камеру искусственных заморозков с принудительной циркуляцией воздуха, благодаря чему температура выравнивалась по всему ее объему. Но – удивительное дело! Устойчивость растений в этой камере была выше, чем в первой, примитивной. В той пшеница повреждалась заморозками –2, –3 градуса, а в этой переносила без видимых повреждений и –5, и –6 градусов! Вода в тканях растений находилась при таких заморозках в переохлажденном состоянии, и повреждающий ткани растения лед не образовывался. Нанося на листья растений перед искусственным заморозком кристалли-

ки льда, удавалось предотвратить переохлаждение воды в тканях растений. Позже было установлено, что степень переохлаждения воды во время заморозка определяется уровнем влажности воздуха. Со снижением влажности воздуха возрастает степень переохлаждения. Холодильный агрегат, охлаждая воздух, конденсирует влагу и тем самым снижает его влагосодержание – «сушит» его. В примитивной камере, благодаря снежной «рубашке» во время заморозка влажность воздуха была всегда высокой, как при естественном заморозке, поэтому и результаты опытов не противоречили наблюдениям в природе.

Самое мое первое участие в опытах с растениями показало, что при изучении воздействия на них различных факторов среды необходимо учитывать и прочие сопутствующие условия, поскольку их изменения проявляются в силе влияния изучаемого фактора. На систему растения воздействует система среды. Так что если первым соприкосновением с наукой биологией младшего агронома и сельского инженера-электрика была усвоенная от В. В. Кузнецова идея о необходимости закалки ограничением жизненных благ в ранний период роста для повышения жизнестойкости организма – а ведь это один из основополагающих тезисов Мичурина применительно к молодым растениям! – то первым шагом стало восприятие необходимости системного подхода при изучении влияния среды на живой организм.

Экспериментальные исследования действия всего лишь одного природного явления – ночного заморозка – на устойчивость растений показали необходимость учета влияния не только изучаемого, но и сопутствующих факторов, и что для решения этой задачи нужен комплекс установок искусственного климата для «расчленения» системы на отдельные элементы с целью их изучения общепринятыми однофакторными методами. (Системный подход применительно к растениям был разработан много позже. Однофакторная идеология в ботанике главенствует до сей поры, а под системным подходом зачастую понимают изучение в одном опыте нескольких показателей.)

Вот Аркадий Иванович Коровин и предложил нам со Станиславом Николаевичем, так плодотворно поработавшим при изучении заморозков и организации опытов, взяться за подготовку Задания на проектирование комплекса камер – Станции искусственного климата для изучения влияния экстремальных отклонений условий среды на урожай растений. И к весне Задание было отпечатано, снабжено десятками схем и чертежей и переплетено. На

основании этого Задания А. И. Коровин подготовил доклад о необходимости строительства Станции искусственного климата для изучения влияния экстремальных отклонений условий среды на урожай растений. К этому времени в жизни Карельского филиала АН СССР произошли большие перемены. На смену геологу Слодкевичу Председателем Президиума был назначен физиолог растений Всеволод Петрович Дадыкин. Дадыкин относился к той части советской интеллигенции, которая успела получить домашнее воспитание до революционных потрясений и пройти курс наук в гимназиях. Культура поведения, широкий кругозор, правильная речь – отличительные черты этого поколения.

Всеволод Петрович планировал исследовать спектры поглощения света растениями в естественных условиях, для чего нужен был полевой спектрофотометр. Чертежи прибора ему подготовили в Институте биофизики АН, оптическую сферу и дифракционную решетку для разложения спектра на составляющие он добыл. Воспринимать спектр должен был вакуумный фотоумножитель с линейной спектральной характеристикой. Для выполнения этой и прочих работ по изготовлению оригинальных приборов и устройств была расширена площадь мастерской и увеличен ее штат. Мне не очень хотелось встречать в изготовлении полевого спектрографа, поскольку наши производственные условия не позволяли выполнять особо точные работы, это направление было не в сфере моих интересов, да и особых достижений при использовании этого, довольно-таки примитивного, прибора я не ожидал. Но мой помощник А. Платонов заказ принял – пришлось этот прибор мастерить.

Плиты основания прибора разметили и расточили на координатно-расточном станке на Онегзаводе. Всю механику делали мы, в мастерской уже был квалифицированный токарь Г. С. Кочанов, а для разработки и монтажа усилителя прибора был приглашен к нам на работу опытный радиотехник из ПГУ Б. Н. Грушевский.

Поработав с прибором, позволявшим только поочередно записывать спектры пропускания и отражения листа, что позволяло лишь приближенно оценивать его светопоглощение, пришли к необходимости разработки и изготовления дифференциального прибора с двумя оптическими сферами, позволяющего автоматически суммировать спектры пропускания и отражения, что позволяло получать спектр поглощения света листом. Получилось! Но лабораторные сферы малого диаметра имели большие светопотери, поэтому решено было

сделать дифференциальный прибор со сферами диаметром 400 мм. А где их взять? Как «выдавить» их в наших примитивных, условиях? В итоге они были выколочены из алюминиевых тазиков на деревянной болванке руками, печатающими эти заметки...

С дифференциальным прибором первого типа Грушевский и Лилия Викторовна Потаевич ездили снимать спектры поглощения аж на Памир! А каждое воскресенье Всеволод Петрович брал их вместе с прибором, садился за руль филиальской «Волги» и ехал на измерения куда-либо в лес. Ни Памир, ни лес особых результатов не дали (сбылся мой пессимистический прогноз), а вот поездки на «Волге» эффект дали. Энергичный, деятельный по натуре Всеволод Петрович «подстегивал» коллектив, ускорял его деятельность. В АН добился притока новых сил – 20 молодых специалистов пополнили ряды подразделений Филиала. Он смело двигал вверх молодежь, вовлекал ее в ряды КПСС. В Институте биологии на смену уехавшему в Иркутск А. И. Коровину поставил молодого кандидата наук С. Н. Дроздова, согнал с трибуны «вечного» секретаря парторганизации Филиала картографа П. Веденева, жевавшего свои речи с трибуны вместе со спичкой, зажатой в уголке рта, и добился избрания на это место молодого геолога В. А. Соколова. Двинул строительство здания Филиала на улице Пушкинской – очередной «первый камень» был заложен в «День мира второй» – мероприятие, некогда основанное М. Горьким.

Что показало мне пребывание в «рядах обслуживания» Карельского филиала? Во-первых, это наличие свободы творчества (у старших научных сотрудников). Занимаясь организацией опытов по заморозкоустойчивости растений, разработкой наметок для проектирования фитотрона, я фактически находился на этой ступени научной «табели о рангах». Во-вторых, большое поле для творчества вследствие слабой технологической оснащенности исследований. Все привязано к наличному приборному оснащению, а отсюда дух: «Мы бы сделали, но у нас нет...», что сочетается с низкой осведомленностью о смежных областях исследований. В-третьих, что и ученым «ничто человеческое не чуждо»: идеи и разработки нижестоящего по «табели о рангах» иногда как-то сами оказываются в публикациях без ссылки на их авторов. Но все это – впечатления «свежего» в науке человека.

То, что заронил мне в душу Владимир Васильевич Кузнецов, – это насчет закалки организмов – привело меня, электрика с биологи-

ческим образованием на уровне младшего агронома, к заинтересованному участию в исследованиях заморозкоустойчивости растений; как инженера – к разработке экспериментальных условий для экологических исследований; сомнения в достоверности однофакторных опытов – к необходимости использования элементов системного подхода при изучении жизнедеятельности растений. Все это и определило мой дальнейший путь в науке.

За годы работы в должности инженера по оборудованию Карельского филиала АН, помимо работ на ББС и с физиологами растений, я успел «натворить» довольно-таки много и для других лабораторий. В содружестве с товарищами по экспериментальной мастерской Б. Галашовым, Г. С. Кочановым, В. В. Тычининим, М. И. Мюллери и другими мы разработали несколько типов электротермометров для воды, льда, тканей растений, несколько типов вегетационных камер и шкафов и камер заморозков, несколько типов самопишущих водомерных устройств (сериями!) для мелиораторов, устройства для регистрации подвижности животных при клеточном содержании, глубоководную вертушку для определения скорости и направления течений на разных глубинах с использованием дистанционного авиационного компаса и бесконтактного датчика скорости (используется, видимо, до сей поры). Тарировать вертушку ездили в Каунас – ближе опытного бассейна для гидрометеоприборов не было. По просьбе молодого орнитолога Володи Зимина мы с Кочановым сделали станок для сверления гнезд-дуплянок для птиц. Испытание станка проводили на месте применения – в заповеднике «Кивач» (в те годы он входил в состав Филиала). Заодно и порыбачили на удочку в ковше под водопадом. Лучшей рыбалки у меня не было! Для лесовода Н. И. Казиминова с Тычининим «сваляли» мотокосилку для прореживания пионерных пород в посадках сосны на базе мотопилы «Дружба» с угловым редуктором из шестерен подвесного мотора «Москва». Теперь такую косилку можно купить, а тогда, 50 лет назад, это было новинкой! Для гидрологов, руками преимущественно В. В. Тычинина, сделали мотолебодур.

После моего возвращения из Иркутска директор Института биологии предложил мне принять должность заместителя по науке. Принял и вскоре был утвержден Отделением биологии АН. Лабораториями института ведали опытные исследователи, и вторгаться в их деятельность я не считал возможным, но условия их труда, за исключением лабораторий, размещенных в главном здании филиала, были весь-

ма убоги. На Агробазе летние лаборатории ютились в ветхих сарайчиках, гараж не имел бокса для ремонта техники и постоянно подтоплялся, урожай семян «собирали» ножницами и обрабатывали где придется. Еще во время моей работы в экспериментальной мастерской были оснащены электроприводом молотилка и веялка – все это было прежними «хозяевами» Агробазы сдано в утиль. Стационары ютились в арендованных в совхозах помещениях – в «романтических» условиях (было бы где со спальным мешком приткнуться!).

Первым делом взялись за ремонт лабораторных сараев на Агробазе – это разрешалось без санкции Москвы. Под эту марку снесли парочку сарайчиков и построили заново летнюю лабораторию. Материалы удавалось приобретать в то скудное время «нормирования» всего благодаря энергии и связям в среде строителей директора Агробазы. А работали на этой стройке (прирабатывали) шофера гаража, лишённые временно прав – обычно за спиртное. (Они так и называли Агробазу – исправительной базой). Появилась летняя лаборатория с водопроводом, электроотоплением, биохимической комнатой для анализов, помещением камер заморозков, светоконнатой для выращивания рассады, помещением для лаборатории паразитологии, бытовкой и помещением ночного дежурного. Все – с ровными и окрашенными полом и потолком, стенами, настоящими окнами и хорошим освещением. Отделаны, с целью повышения удобства в работе, менее дряхлые сараи. Разобран вегетационный домик с падающими стеклами и смонтирован новый, в металлических конструкциях и с разбирающейся на зиму кровлей. А главное – была механизирована заготовка семян овсяницы луговой сорта «Карельская», автором и распространителем которого являлся институт.

Под видом ремонта сушилки для снопов (осталась со времен И. А. Петрова, выращивавшего на Агробазе «новые сорта ячменя, полученные методом вегетативной гибридизации») был построен молотильный сарай с сушилкой на втором этаже, приобретена в ВИРе сложная молотилка для обмолота селекционного материала. Благодаря этому институт получил возможность рассылать семена в значительных объемах. Через Сельхозснаб, которым ведал очень отзывчиво относившийся к институту М. П. Харонен, удалось приобрести навесное экскаваторное оборудование для трактора «Беларусь» и с его помощью не только сделать сухим гараж, но и предотвратить весенние затопления делянок лабораторий генетики и растительных ресурсов.

Много внимания пришлось уделить проекту постройки капитального лабораторного здания на Агробазе, но этот проект финансирования АН не получил, так и остался в бумагах, а времени съел много. Но зато проект Корзинского мелиоративного стационара в Эссойле реализовать удалось, и он гордо возвышается над шоссейной

и железной дорогами, против переезда. Еще удалось соорудить из подручных средств Лижемский ихтиологический опорный пункт и сделать всякие прочие дела, вроде клюквенной делюшки на ручье Агробазы или Опытного поля.

(Опубликовано в авторской редакции).

ВЕРА ВИКТОРОВНА ТАЛАНОВА (к 60-летию со дня рождения)



23 июля 2013 г. исполняется 60 лет ведущему научному сотруднику лаборатории экологической физиологии растений Института биологии Карельского научного центра РАН, доктору биологических наук Вере Викторовне Талановой.

В 1970 году после окончания 9-й средней школы г. Петрозаводска В. В. Таланова поступила на биологический факультет Петрозаводского государственного университета. Уже в студенческие годы она проявила большой интерес к научным исследованиям в области физиологии растений. В частности, на третьем курсе на базе ВИР ею была проведена работа по изучению изменения экзосмоса электролитов из проростков озимой пшеницы при закаливании и промораживании. На протяжении следующих двух лет под руководством Л. Д. Музалевой продолжалось освоение физиологических и биохимических методов исследования, проводились эксперименты на разных растительных объектах, в том числе древесных.

В 1975 году, завершив учебу в университете, Вера Викторовна была принята на постоянную работу в лабораторию физиологии и экологии

растений Института биологии, возглавляемую С. Н. Дроздовым, где активно включилась в исследования, направленные на изучение устойчивости растений к низким и высоким температурам. С 1979 по 1982 гг. В. В. Таланова обучалась под руководством С. Н. Дроздова и А. Ф. Титова в очной аспирантуре по специальности «физиология растений», а в 1985 году успешно защитила кандидатскую диссертацию по теме «Эколого-физиологические аспекты устойчивости томатов к низким и высоким температурам (ранние этапы развития)».

В последующие годы основные научные интересы Веры Викторовны были связаны с изучением феноменологии и механизмов устойчивости растений к низким и высоким температурам, засолению, тяжелым металлам. Особое внимание уделялось роли и участию фитогормонов в неспецифических и специализированных механизмах адаптации растений к неблагоприятным воздействиям. Проводимые ею исследования позволили выявить, что формирование повышенной устойчивости растений к факторам абиотической природы (низкие и высокие температуры, хлоридное засоление, тяжелые металлы) сопряжено с изменением уровня отдельных фитогормонов, в частности АБК и ИУК, а также их баланса. Полученные данные убедительно доказали тот факт, что участие АБК в формировании устойчивости растений к абиотическим факторам связано не только со способностью гормона регулировать различные физиолого-биохимические процессы, но и с активацией им экспрессии отдельных генов. Результаты этих исследований нашли свое отражение в докторской диссертации на тему «Фитогормоны как регуляторы устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды», которая была успешно защищена Верой Викторовной в 2009 году.

В настоящее время В. В. Таланова является высококвалифицированным специалистом в области физиологии растений. Она проводит оригинальные исследования, связанные с изучением физиолого-биохимических и молекулярно-генетических механизмов адаптации растений

к низким температурам и тяжелым металлам. Эксперименты с использованием современного оборудования позволили выявить существование зависимости между уровнем экспрессии генов, кодирующих транскрипционные факторы и белки холодового ответа, в листьях холодостойких растений, с одной стороны, и процессом формирования повышенной устойчивости в условиях действия низкой температуры, с другой. Выявлено участие как АБК-зависимых, так и АБК-независимых генов в адаптации растений к действию низких температур и тяжелых металлов. Полученные в результате этих исследований данные вносят важный вклад в разработку физиологических основ устойчивости растений, получивший признание как в нашей стране, так и за рубежом.

В целом за годы исследований В. В. Таланова опубликовала (самостоятельно и в соавторстве) более 230 научных работ, в том числе 4 монографии, 2 учебных пособия. Результаты ее исследований представлены в ведущих отечественных и зарубежных журналах, таких как «Доклады Академии наук», «Физиология растений», «Физиология и биохимия культурных растений», «Журнал общей биологии», «Доклады РАСХН», «Известия РАН», «Journal of Experimental Botany», «Biologia Plantarum», «Physiologia Plantarum» и др. Исследования, проводимые Верой Викторовной в рамках тем лаборатории, получают постоянную поддержку научных фондов и научных организаций в форме грантов (РФФИ, INTAS, ФЦП, Президиума РАН).

Наряду с научно-исследовательской работой В. В. Таланова активно занимается педагогической деятельностью: ведет лабораторные и практические занятия у студентов естественно-географического факультета КГПА, руководит подготовкой студенческих дипломных и курсовых работ. Под ее руководством осуществляется также подготовка кандидатских диссертаций. Помимо этого, Вера Викторовна является членом ученого совета ИБ КарНЦ РАН и специализированного диссертационного совета ДМ 212.087.02 по защите докторских диссертаций по специальностям «биохимия» и «физиология» при КГПА.

За плодотворную научную и научно-практическую деятельность В. В. Таланова награждена почетной грамотой РАН и почетными грамотами КарНЦ РАН.

От всей души поздравляем Веру Викторовну с юбилеем! Желаем крепкого здоровья, творческих успехов, реализации всех намеченных планов и новых блестящих идей.

А. Ф. Титов, Н. М. Казнина

СПИСОК ОСНОВНЫХ НАУЧНЫХ ТРУДОВ В. В. ТАЛАНОВОЙ

1980. Влияние хлорамфеникола и температуры на биосинтез хлорофилла в семядольных листьях проростков огурца // В кн.: Физиологические аспекты формирования терморезистентности и продуктивности сельскохозяйственных растений. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР. С. 79–88. (Совместно с А. Ф. Титовым.)

1981. Количественная оценка эффектов хлорамфеникола на экспрессию некоторых морфологических признаков у проростков огурца // Физиол. и биохим. культ. растений. Т. 13, № 3. С. 274–278. (Совместно с А. Ф. Титовым.)

Влияние хлорамфеникола на рост, развитие и некоторые физиологические показатели растений огурца в раннем онтогенезе // Онтогенез. Т. 12, № 5. С. 503–508. (Совместно с А. Ф. Титовым.)

Некоторые закономерности изменчивости холодо- и теплоустойчивости листьев томата под влиянием температуры // Биол. науки. 14 с. (рукопись деп. в ВИНТИ, №3931-81 Деп.). (Совместно с А. Ф. Титовым.)

1982. К вопросу о функциональной автономности систем, контролирующей закаливание теплолюбивых растений к холоду и теплу // Докл. АН СССР. Т. 263, № 3. С. 766–768. (Совместно с А. Ф. Титовым, С. Н. Дроздовым, С. П. Критенко.)

О термоадаптивных возможностях растений томата // С.-х. биология. Т. 17, № 4. С. 463–469. (Совместно с А. Ф. Титовым, С. Н. Дроздовым.)

Влияние специфических ингибиторов транскрипции и трансляции на холодовое и тепловое закаливание растений томата // Физиология растений. Т. 29, № 4. С. 790–793. (Совместно с А. Ф. Титовым, С. Н. Дроздовым.)

Влияние температурного фактора на терморезистентность и дыхательный газообмен листьев томата // В кн.: Влияние факторов внешней среды и физиологически активных веществ на терморезистентность и продуктивность растений. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР. С. 14–27. (Совместно с С. Н. Дроздовым, Т. В. Акимовой, А. Ф. Титовым.)

О функциональной автономности внутриклеточных систем, контролирующей адаптивное повышение холодо- и теплоустойчивости активно вегетирующих растений // В кн.: Влияние факторов внешней среды и физиологически активных веществ на терморезистентность и продуктивность растений. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР. С. 83–94. (Совместно с А. Ф. Титовым, С. П. Критенко.)

Дыхательный газообмен листьев огурцов и томатов в зависимости от температуры // Фи-

зиол. и биохим. культ. растений. Т. 14, № 6. С. 579–583. (Совместно с С. Н. Дроздовым, Т. В. Акимовой, А. Ф. Титовым.)

Влияние закаливающих и повреждающих температур на терморезистентность и некоторые физиологические показатели листьев томата // Биол. науки. 16 с. (рук. депонир. в ВИНТИ, №4958-82 Деп.). (Совместно с Т. В. Акимовой, С. Н. Дроздовым, А. Ф. Титовым.)

1983. О роли специфических и неспецифических реакций в процессах термоадаптации активно вегетирующих растений // Физиология растений. Т. 30, № 3. С. 544–551. (Совместно с А. Ф. Титовым, С. Н. Дроздовым, С. П. Критенко.)

Действие и последствие экстремальных температур на дыхательную активность листьев *Lycopersicon esculentum* Mill. (Solanaceae) // Бот. журнал. Т. 68, № 8. С. 1073–1078. (Совместно с С. Н. Дроздовым, А. Ф. Титовым, Т. В. Акимовой.)

Effect of temperature on the thermoresistance and respiration of tomato leaves (*Lycopersicon esculentum* Mill.) // Biochemie und Physiologie der Pflanzen. В. 178, h. 8. P. 601–605. (Совместно с А. Ф. Титовым, С. Н. Дроздовым, Т. В. Акимовой.)

Сравнительное изучение прямого и косвенного методов оценки холодо- и теплоустойчивости активно вегетирующих растений // В кн.: Терморезистентность и продуктивность сельскохозяйственных растений. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР. С. 84–92. (Совместно с А. Ф. Титовым, С. П. Критенко.)

1984. Динамика физиолого-биохимических процессов в листьях томата при последовательной смене режимов холодого и теплового закаливания // В кн.: Терморезистентность и продуктивность сельскохозяйственных растений. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР. С. 23–30. (Совместно с Т. В. Акимовой, А. Ф. Титовым.)

Влияние температуры воздуха и почвы на интенсивность видимого фотосинтеза растений томата // В кн.: Терморезистентность и продуктивность сельскохозяйственных растений. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР. С. 93–97. (Совместно с В. К. Курцом, Т. В. Акимовой, Э. Г. Поповым, А. В. Талановым.)

Модификация процессов холодого и теплового закаливания растений томата с помощью экзогенных фитогормонов // Биол. науки. № 10. С. 88–91. (Совместно с А. Ф. Титовым, С. Н. Дроздовым.)

The effect of temperature on cold and heat resistance of growing plants. I. Chilling-sensitive species // Journal of Exp. Botany. Vol. 35, № 160. P. 1595–1602. (Совместно с S. N. Drozdov, A. F. Titov, S. P. Kritenko, E. G. Sherudilo, T. V. Akimova)

Физиологическая адаптация огурцов и томатов к холоду и повышенным температурам // Физиол. и биохим. культ. растений. Т. 16, № 6. С. 589–593. (Совместно с А. Ф. Титовым, Т. В. Акимовой, С. П. Критенко.)

1985. Влияние абсцизовой кислоты на устойчивость активно вегетирующих растений к низким и высоким температурам // Физиология растений. Т. 32, № 3. С. 565–572. (Совместно с А. Ф. Титовым, С. Н. Дроздовым, С. П. Критенко.)

Эколого-физиологические аспекты устойчивости томатов к низким и высоким температурам (ранние этапы развития) // Автореф. дис. ... канд. биол. наук, Казань. 20 с.

1986. Влияние цитокининов на холодо- и теплоустойчивость активно вегетирующих растений // Физиол. и биохим. культ. растений. Т. 18, № 1. С. 64–69. (Совместно с А. Ф. Титовым, С. Н. Дроздовым, С. П. Критенко, Е. Г. Шерудило.)

Скорость теплового закаливания как критерий оценки теплоустойчивости сортов сои // С.-х. биология. № 4. С. 64–66. (Совместно с А. Ф. Титовым, С. Н. Дроздовым, Т. В. Акимовой.)

Реакция теплолюбивых растений на действие повышенных температур: динамика тепло- и холодоустойчивости // Журн. общей биологии. Т. XLVII, № 3. С. 374–380. (Совместно с А. Ф. Титовым, С. Н. Дроздовым, Т. В. Акимовой.)

Влияние цитокининов на устойчивость незакаленных растений к экстремальным температурам и процессы температурной адаптации и реадаптации // В кн.: Термоадаптация и продуктивность растений. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР. С. 80–90. (Совместно с А. Ф. Титовым, Е. Г. Шерудило, С. П. Критенко.)

1987. О механизмах повышения теплоустойчивости растений при краткосрочном и длительном действии высоких температур / Физиология растений. Т. 34, № 1. С. 173–177. (Совместно с А. Ф. Титовым, С. Н. Дроздовым, Т. В. Акимовой.)

Исследование реакции растений сои на действие температуры. Границы температурных зон // Физиология растений. Т. 34, № 2. С. 350–355. (Совместно с А. Ф. Титовым, С. Н. Дроздовым, Т. В. Акимовой.)

Влияние актиномицина Д и циклогексимида на процесс адаптации сои к высокой температуре // Физиол. и биохим. культ. растений. Т. 19, № 2. С. 146–149. (Совместно с А. Ф. Титовым, С. Н. Дроздовым, Т. В. Акимовой.)

1988. Изменения теплоустойчивости проростков томата при комбинировании краткосрочных и длительных закалок // Физиология растений. Т. 35, № 1. С. 158–164. (Совместно с А. Ф. Титовым, Т. В. Акимовой.)

Сравнительная оценка теплоустойчивости растений по температурной зависимости замедленной флуоресценции хлорофилла и температуре гибели клеток листа // В кн.: Влияние факторов среды и физиологически активных веществ на продуктивность и устойчивость растений. Петрозаводск: КФ АН СССР. С. 124–128. (Совместно с В. А. Виролайнен, А. А. Филимоновым.)

Раздельное и совместное влияние фитогормонов и ингибиторов белкового синтеза на холодо- и теплоустойчивость растений // В кн.: Влияние факторов среды и физиологически активных веществ на продуктивность и устойчивость растений. Петрозаводск: КФ АН СССР. С. 89–97. (Совместно с Т. В. Акимовой, А. Ф. Титовым, С. П. Критенко, Е. Г. Шерудило.)

1989. Действие экзогенных гормонов и ингибиторов синтеза белка при повреждающих низких и высоких температурах // Физиол. и биохим. культ. растений. Т. 21. № 1. С. 45–48. (Совместно с А. Ф. Титовым.)

1990. Динамика содержания абсцизовой и индолилуксусной кислот в листьях растений огурца при тепловой адаптации // Физиол. и биохим. культ. растений. Т. 22, № 2. С. 153–157. (Совместно с А. Ф. Титовым, Г. Р. Кудояровой.)

Динамика содержания эндогенных АБК и ИУК в листьях растений огурца при тепловой адаптации // В кн.: Иммуноферментный анализ регуляторов роста растений. Применение в физиологии растений и экологии. Уфа. С. 89–97. (Совместно с Г. Р. Кудояровой, А. Ф. Титовым.)

Влияние физиологически нормальных температур на холодо- и теплоустойчивость растений томата и пшеницы // В кн.: Эколого-физиологические аспекты устойчивости, роста и развития растений. Петрозаводск: КНЦ АН СССР. С. 17–26. (Совместно с Н. И. Балагуровой, А. Ф. Титовым.)

Влияние экзогенного ауксина на теплоустойчивость растений озимой пшеницы при адаптации к высоким температурам // В кн.: Эколого-физиологические аспекты устойчивости, роста и развития растений. Петрозаводск: КНЦ АН СССР. С. 26–35. (Совместно с Р. И. Волковой.)

1991. Изменения в системе ауксинов в начальный период теплового и холодного закаливания вегетирующих растений // Физиология растений. Т. 38, № 3. С. 538–544. (Совместно с Р. И. Волковой, А. Ф. Титовым, С. Н. Дроздовым.)

Изменение уровня эндогенной абсцизовой кислоты в листьях растений под влиянием холодной и тепловой закалки // Физиология растений. Т. 38, № 5. С. 991–997. (Совместно с А. Ф. Титовым, Н. П. Боевой.)

1992. Исследование реакции проростков огурца и пшеницы на хлоридное засоление // В кн.: Биологические исследования раститель-

ных и животных систем. Петрозаводск: КНЦ РАН. С. 17–23. (Совместно с С. В. Минаевой, С. Е. Солдатовым, А. Ф. Титовым.)

Влияние актиномицина Д и циклогексимида на уровень абсцизовой кислоты в листьях проростков огурца при тепловой адаптации // В кн.: Влияние внешних факторов на устойчивость, рост и развитие растений. Петрозаводск: КНЦ РАН. С. 52–59. (Совместно с А. Ф. Титовым.)

1993. Раздельное и комбинированное действие засоления и закаливающих температур на растения // Физиология растений. Т. 40, вып. 4. С. 584–588. (Совместно с А. Ф. Титовым, С. В. Минаевой, С. Е. Солдатовым.)

1994. Endogenous abscisic acid content in cucumber leaves under the influence of unfavourable temperatures and salinity // J. Exp. Bot. Vol. 45, № 276. P. 1031–1033. (Совместно с А. F. Titov.)

Влияние регуляторов роста на устойчивость и гормональный статус растений капусты в зависимости от условий среды // В кн.: Адаптация, рост и развитие растений. Петрозаводск: КНЦ РАН. С. 60–69. (Совместно с Р. И. Волковой, Л. А. Обшатко, Т. Ф. Алексеевой, Л. Н. Соловьевой, С. Н. Дроздовым.)

Сравнительное изучение реакции растений пшеницы на действие неблагоприятных факторов разной природы // В кн.: Адаптация, рост и развитие растений. Петрозаводск: КНЦ РАН. С. 22–29. (Совместно с А. Ф. Титовым, С. В. Минаевой.)

1995. Влияние ионов свинца на рост проростков пшеницы, ячменя и огурца // Физиология растений. Т. 42, № 3. С. 457–462. (Совместно с А. Ф. Титовым, Н. П. Боевой, С. В. Минаевой, С. Е. Солдатовым.)

Динамика содержания абсцизовой кислоты в листьях проростков огурца и ячменя при высоких закаливающих и повреждающих температурах // Физиол. и биохим. культ. растений. Т. 27, № 4. С. 298–302. (Совместно с Т. В. Акимовой, Л. В. Топчиевой, А. Ф. Титовым.)

1996. Growth responses of barley and wheat seedlings to lead and cadmium // Biologia Plantarum. Vol. 38, N 3. P. 431–436. (Совместно с А. F. Titov, N. P. Boeva.)

Реакция растений на ионы свинца и неблагоприятную температуру // Доклады Россельхозакадемии. № 5. С. 5–7. (Совместно с А. Ф. Титовым, Н. П. Боевой.)

1997. Study of physiological and biochemical mechanisms of plant response to heavy metals // Molecular responses of plants to biotic and abiotic stresses. Symposium proceedings. Viikki, Sep. 9–10, 1997. Univ. of Helsinki, Publ. № 50, Helsinki, Finland. P. 11–12. (Совместно с А. F. Titov, N. P. Boeva.)

1998. Plant resistance to environmental stresses // Karelia and Norway: the main trends and prospects of scientific cooperation. Proceedings of the Scientific Conference held in Karelian Research Centre RAS within the framework of the Days of Norway in Republic of Karelia (Petrozavodsk, 28–31 May, 1997). Petrozavodsk. P. 13–16. (Совместно с А. Ф. Титов, Т. В. Акимовой, Н. И. Балагурова.)

1999. Влияние ионов кадмия и свинца на рост и содержание пролина и АБК в проростках огурца // Физиология растений. Т. 46, № 1. С. 164–167. (Совместно с А. Ф. Титовым, Н. П. Боевой.)

Скорость теплового закаливания как показатель для оценки и отбора сортов сои по устойчивости к высоким температурам // Materialy VIII Ogólnopolskiego Zjazdu Naukowego “Hodowla Roślin Ogrodniczych u progu XXI wieku” (VIII Scientific Horticultural Plant Breeding Symposium “Horticulture Plant Breeding to Start with XXI Century”, Materials of Symposium). 4–5 February 1999. Academia Rolniska, Lublin, P. 693–696. (Совместно с А. Ф. Титовым, Т. В. Акимовой.)

2000. Effect of increasing concentrations of lead and cadmium on cucumber seedlings // Biologia Plantarum. Vol. 43, N 3. P. 441–444. (Совместно с А. Ф. Титов, Н. П. Боева.)

Влияние возрастающих концентраций тяжелых металлов на рост проростков ячменя и пшеницы // Физиология растений. 2001. Т. 48, № 1. С. 119–123. (Совместно с А. Ф. Титовым, Н. П. Боевой.)

2001. Влияние свинца и кадмия на проростки ячменя // Физиология и биохимия культурных растений. Т. 33, № 1. С. 33–37. (Совместно с А. Ф. Титовым, Н. П. Боевой.)

2003. Динамика холодо- и теплоустойчивости растений при действии различных стресс-факторов на их корневую систему // Физиология растений. Т. 50, № 1. С. 94–99. (Совместно с А. Ф. Титовым, Т. В. Акимовой.)

Динамика содержания АБК в листьях и корнях проростков огурца и их теплоустойчивости под влиянием общего и локального прогрева // Физиология растений. Т. 50, № 1. С. 100–104. (Совместно с Т. В. Акимовой, А. Ф. Титовым.)

Влияние абсцизовой кислоты на устойчивость проростков огурца к высокой температуре и хлоридному засолению // Физиология и биохимия культурных растений. Т. 33, № 2. С. 124–130. (Совместно с Л. В. Топчиевой, А. Ф. Титовым.)

2004. Влияние свинца на рост и развитие *Setaria viridis* (L.) Beauv. // Растительные ресурсы. Т. 40, вып. 3. С. 53–59. (Совместно с Г. Ф. Лайдинен, А. Ф. Титовым, Н. М. Казниной.)

2006. Динамика фотосинтеза и транспирации проростков огурца в начальный период хлоридного засоления и при действии фитогормонов // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. № 2. С. 10–13. (Совместно с А. В. Талановым, А. Ф. Титовым.)

Влияние абсцизовой кислоты на устойчивость проростков огурца к комбинированному действию высокой температуры и хлоридного засоления // Известия РАН. Серия биологическая. № 6. С. 757–761. (Совместно с Л. В. Топчиевой, А. Ф. Титовым.)

Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. М.: Наука. 143 с. (Совместно с А. Ф. Титовым, Т. В. Акимовой, Л. В. Топчиевой.)

2007. Устойчивость растений к тяжелым металлам. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 172 с. (Совместно с А. Ф. Титовым, Н. М. Казниной, Г. Ф. Лайдинен.)

2008. Effect of cadmium on Poaceae plants // Physiologia Plantarum. Vol. 133, N 3. XVI Congress of the Federation of European societies of plant biology (Tampere, Finland, 17–22 august 2008). Abstract P09-083. (Совместно с Н. М. Казниной, А. Ф. Титовым, Г. Ф. Лайдинен, А. В. Талановым.)

Влияние стресс-факторов на экспрессию гена транскрипционного фактора CBF у растений огурца // Доклады Академии наук. Т. 423, № 2. С. 283–285. (Совместно с А. Ф. Титовым, Л. В. Топчиевой, И. Е. Малышевой.)

Экспрессия генов транскрипционного фактора WRKY и белков холодового шока у растений пшеницы при холодовой адаптации // Доклады Академии наук. Т. 423, № 4. С. 567–569. (Совместно с А. Ф. Титовым, Л. В. Топчиевой, И. Е. Малышевой, Ю. В. Венжик, С. А. Фроловой.)

2009. Фитогормоны как регуляторы устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Петрозаводск. 47 с.

Влияние охлаждения корней на устойчивость клеток листьев и активность фотосинтетического аппарата пшеницы // Доклады Академии наук. Т. 427, № 3. С. 414–416. (Совместно с Ю. В. Венжик, А. Ф. Титовым, Е. А. Назаркиной.)

Экспрессия генов транскрипционного фактора WRKY и стрессовых белков у растений пшеницы при холодном закаливании и действии АБК // Физиология растений. 2009. Т. 56, № 5. С. 776–782. (Совместно с А. Ф. Титовым, Л. В. Топчиевой, И. Е. Малышевой, Ю. В. Венжик, С. А. Фроловой.)

Устойчивость растений и фитогормоны. Петрозаводск: КарНЦ РАН. 206 с. (Совместно с А. Ф. Титовым.)

Характер и последовательность изменений в фотосинтетическом аппарате растений озимой пшеницы в условиях холодого закаливания // Труды Карельского научного центра РАН. № 3. С. 93–97. (Совместно с А. Ф. Титовым, Ю. В. Венжик, С. А. Фроловой, А. В. Талановым.)

2010. Дифференциальная экспрессия генов в клетках листьев проростков огурца в условиях действия различных стресс-факторов // Доклады Академии наук. Т. 431, № 4. С. 570–573. (Совместно с А. Ф. Титовым, Л. В. Топчиевой, И. Е. Малышевой.)

Влияние низких повреждающих и закаливающих температур на активность протеолитических ферментов и ингибиторов протеиназ в листьях растений огурца // Труды КарНЦ РАН. Серия «Экспериментальная биология». № 2. С. 47–51. (Совместно с А. Ф. Титовым, С. А. Фроловой.)

Экспрессия генов в клетках листьев пшеницы при локальном действии низкой температуры на корневую систему растений // Доклады Академии наук. Т. 435, № 4. С. 571–573. (Совместно с А. Ф. Титовым, Л. В. Топчиевой, И. Е. Малышевой, Ю. В. Венжик, С. А. Фроловой.)

Экспрессия АБК-зависимых и АБК-независимых генов при холодной адаптации растений пшеницы // Сборник научных статей «Клеточная сигнализация». Казань: издательство «Фэн» Академии наук РТ. С. 119–125. (Совместно с А. Ф. Титовым, Л. В. Топчиевой.)

2011. Влияние низкотемпературного закаливания на активность протеолитических ферментов и их ингибиторов в листьях проростков пшеницы и огурца // Физиология растений. Т. 58, № 2. С. 208–212. (Совместно с С. А. Фроловой, А. Ф. Титовым.)

Влияние пониженной температуры на устойчивость и функциональную активность фотосинтетического аппарата // Известия РАН. Серия биологическая. № 2. С. 171–177. (Совместно с Ю. В. Венжик, А. Ф. Титовым, С. А. Фроловой, А. В. Талановым, Е. А. Назаркиной.)

Особенности экспрессии АБК-зависимых генов при холодной адаптации растений яровой пшеницы // Доклады Академии наук. Т. 438, № 3. С. 427–429. (Совместно с А. Ф. Титовым, Л. В. Топчиевой.)

Особенности экспрессии температурорегулируемых генов у растений озимой и яровой пшеницы при холодной адаптации // Доклады Российской Академии сельскохозяйственных наук. № 3. С. 3–5. (Совместно с А. Ф. Титовым, Л. В. Топчиевой, Ю. В. Венжик.)

Влияние фитогормонов на активность протеолитических ферментов и ингибиторов трипсина при холодной адаптации пшеницы // Труды КарНЦ РАН. Серия «Экспери-

ментальная биология». № 3. С. 117–120. (Совместно с А. Ф. Титовым, С. А. Фроловой, Ю. В. Венжик.)

Влияние кадмия на экспрессию генов протеолитических ферментов и их ингибиторов у проростков пшеницы // Труды КарНЦ РАН. Серия «Экспериментальная биология». № 3. С. 112–116. (Совместно с А. Ф. Титовым, Л. В. Топчиевой, Н. С. Репкиной.)

Особенности экспрессии АБК-зависимых и АБК-независимых генов при холодной адаптации растений пшеницы // Физиология растений. Т. 58, № 6. С. 859–865. (Совместно с А. Ф. Титовым, Л. В. Топчиевой, Н. С. Репкиной.)

Локальное действие высоких и низких температур на растения. Петрозаводск: КарНЦ РАН. 167 с. (Совместно с А. Ф. Титовым.)

Физиологические основы устойчивости растений к тяжелым металлам: учебное пособие. Институт биологии КарНЦ РАН. Петрозаводск: КарНЦ РАН. 77 с. (Совместно с А. Ф. Титовым, Н. М. Казниной.)

2012. Влияние абсцизовой кислоты на экспрессию генов цистеиновой протеиназы и ее ингибитора при холодной адаптации растений пшеницы // Физиология растений. Т. 59, № 4. С. 627–631. (Совместно с А. Ф. Титовым, Л. В. Топчиевой, С. А. Фроловой.)

Влияние кадмия на экспрессию генов транскрипционных факторов *CBF1* и *DREB1* в листьях проростков пшеницы // Труды КарНЦ РАН. Серия «Экспериментальная биология». № 2. С. 113–118. (Совместно с Н. С. Репкиной, Л. В. Топчиевой, Ю. В. Батовой, А. Ф. Титовым.)

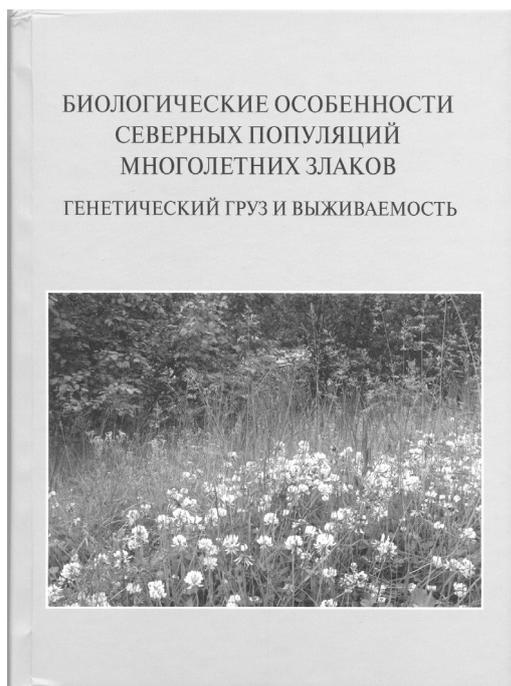
Воздействие низкой температуры на корни вызывает быстрые изменения в ультраструктурной организации хлоропластов листьев пшеницы // Доклады РАН. Т. 445, № 1. С. 109–113. (Совместно с Ю. В. Венжик, А. Ф. Титовым, Н. К. Котеевой, Е. А. Мирославовым.)

Устойчивость растений к кадмию (на примере семейства злаков): учебное пособие. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 55 с. (Совместно с А. Ф. Титовым, Н. М. Казниной.)

Структурно-функциональная реорганизация фотосинтетического аппарата растений пшеницы при холодной адаптации // Цитология. Т. 54, № 12. С. 916–924. (Совместно с Ю. В. Венжик, А. Ф. Титовым, Е. А. Мирославовым, Н. К. Котеевой.)

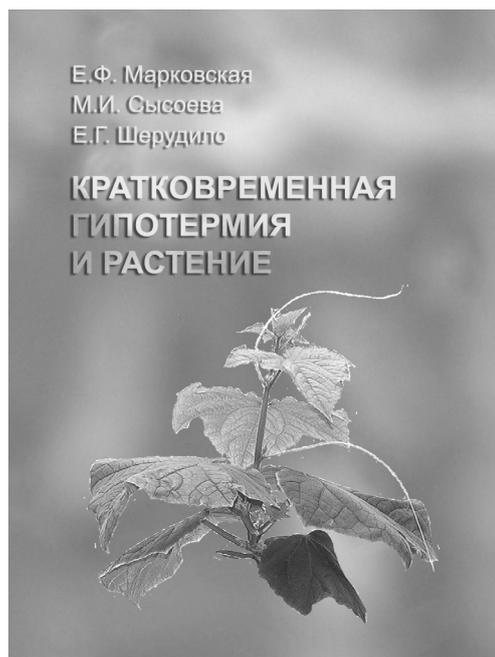
Гены холодого ответа *COR/LEA* участвуют в реакции растений пшеницы на действие тяжелых металлов // Доклады Академии наук. 2013. Т. 448, № 2. С. 242–245. (Совместно с А. Ф. Титовым, Н. С. Репкиной, Л. В. Топчиевой.)

РЕЦЕНЗИИ И БИБЛИОГРАФИЯ



Лебедева О. Н., Николаевская Т. С., Титов А. Ф., Федоренко О. М. Биологические особенности северных популяций многолетних злаков. Генетический груз и выживаемость / Под общей редакцией А. Ф. Титова. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2012. 261 с. Ил. 51. Табл. 95. Библиограф. 547 назв.

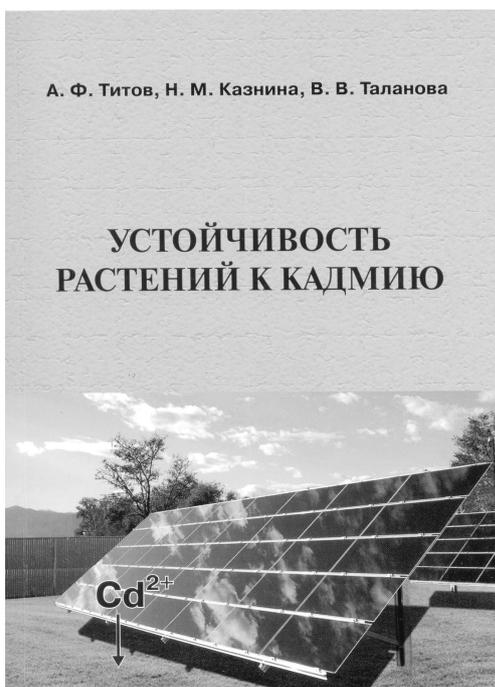
В монографии обобщены и представлены результаты изучения специфичности механизмов выживаемости и жизнедеятельности северных растительных панмиктических популяций многолетних злаков (на примере *Festuca pratensis* Huds.) и мутантных потомств с естественным и индуцированным (физическими и химическими мутагенами) генетическим грузом. Показаны действие систем восстановления хлорофиллдефектности, особенности развития морфофизиологических признаков и действие в отношении их естественного отбора. Монография может быть полезна широкому кругу читателей – биологам, преподавателям вузов, аспирантам и студентам.



Марковская Е. Ф., Сысоева М. И., Шерудило Е. Г. Кратковременная гипотермия и растение / Отв. редактор Н. П. Чернобровкина. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2013. 194. с. Ил. Библиограф. с. 164–192.

В монографии обобщены результаты многолетних собственных исследований авторов и современные литературные данные, касающиеся феноменологии и механизмов реакций растений на периодические кратковременные снижения температуры в суточном цикле. Представлены данные о влиянии условий кратковременной периодической гипотермии на рост, развитие, процессы органообразования и холодоустойчивость растений. Особое внимание уделено роли фитохромов, гиббереллинов, углеводов, липидов в реакциях растений на ежесуточные кратковременные низкотемпературные воздействия, обсуждаются возможные молекулярные механизмы.

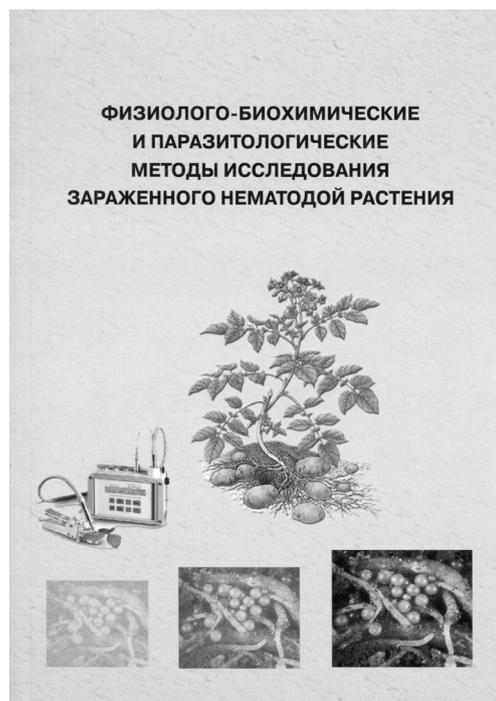
Для научных сотрудников учреждений биологического профиля, преподавателей, аспирантов и студентов вузов.



Титов А. Ф., Казнина Н. М., Таланова В. В. Устойчивость растений к кадмию (на примере семейства Злаков): учебное пособие; Институт биологии Карельского научного центра РАН. Петрозаводск: Карельский НЦ РАН, 2012. 55 с. Ил. 12.

В учебном пособии рассматриваются наиболее важные аспекты влияния кадмия на растения на примере одного из наиболее крупных семейств покрытосеменных – *Россеае*. Дана краткая характеристика кадмия как химического элемента, указаны основные источники его поступления в окружающую среду. Представлены современные данные, касающиеся поступления кадмия в растения, его транспорта и аккумуляции, а также влияния на основные физиологические процессы (рост и развитие, фотосинтез и дыхание, водный обмен и минеральное питание) и продуктивность растений. Описаны основные механизмы детоксикации кадмия в растении.

Для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности «биология» и «экология».



Сысоева М. И., Матвеева Е. М., Лаврова В. В., Шерудило Е. Г., Шibaева Т. Г., Икконен Е. Н. Физиолого-биохимические и паразитологические методы исследования зараженного нематодой растения: учебно-методическое пособие. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2012. 79 с.

В учебно-методическом пособии представлены основные физиолого-биохимические и паразитологические методы, используемые при изучении растений, зараженных картофельной цистообразующей нематодой. Подробно рассмотрены методы заражения растения паразитической нематодой и его анализа при проведении полевых и лабораторных экспериментов, а также спектр физиолого-биохимических и молекулярно-генетических методов.

Для студентов, аспирантов и сотрудников вузов и научных учреждений биологического профиля.

УТРАТЫ

Марина Ивановна Сысоева (1960–2013)

*«Таков закон безжалостной игры:
не люди умирают, а миры...»*

Е. Евтушенко



27 мая 2013 г. ушла из жизни доктор биологических наук Марина Ивановна Сысоева, прекрасный и светлый человек, известный ученый в области физиологии растений, талантливый организатор, оптимист и жизнелюб, и настоящий номер журнала, подготовленный при ее самом активном участии, выходит уже без нее.

М. И. Сысоева родилась 20 апреля 1960 г. в Петрозаводске в семье преподавателей Карельского государственного педагогического института И. Н. Хариной и И. О. Сысоева. В 1982 г. после окончания с отличием физико-

математического факультета Петрозаводского государственного университета по специальности «математика» она поступила на работу в Институт биологии КФ АН СССР в лабораторию моделирования биологических процессов. Марина Ивановна начала исследовательскую работу еще в студенческие годы в отделе математических методов, где под руководством профессора Ю. Л. Павлова был выполнен ее дипломный проект. Это было время, когда активно внедрялись интегральные подходы к исследованию биологических объектов – именно такой была лаборатория моделирования, в организации которой большую роль сыграл директор Института биологии профессор С. Н. Дроздов. Лидером этого направления был д. б. н. В. К. Курец, собравший вокруг себя тех, кто умел многомерно и разносторонне мыслить и любил физику и математику. Первыми коллегами и учителями Марины Ивановны были к. б. н. Э. Г. Попов, к. б. н. А. В. Таланов, В. А. Безденежных и В. Н. Харин, благодаря которым успешно освоены современные математические методы обработки биологического материала. В лаборатории велась активная исследовательская работа, регулярно проводились научные семинары, шел процесс взаимного образования и обмена информацией между физиками, математиками и физиологами растений. Все это создавало творческую атмосферу, в которой проходила подготовка будущих кандидатов и докторов биологических наук. Почти

сразу Марина Ивановна примкнула к биологическому направлению, связанному с исследованиями онтогенеза растений, возглавляемому д. б. н. профессором Е. Ф. Марковской. Консультации у знаменитого профессора Ю. М. Свирежева, участие в семинарах Вычислительного центра РАН – все это сыграло большую роль в становлении и подготовке молодого специалиста. В 1991 г. она успешно защищает кандидатскую диссертацию, а в 2003 г. во Всероссийском научно-исследовательском институте растениеводства им. Н. И. Вавилова (г. Санкт-Петербург) – докторскую диссертацию. Авторский взгляд на роль градиентных суточных температур в жизнедеятельности растительного организма, разработка новых подходов к его изучению, раскрытие механизмов ответных реакций, использование методов молекулярной биологии и разработка методов практического использования научных разработок в виде патентов – это современный высокопродуктивный творческий период жизни д. б. н. Марины Ивановны Сысоевой. Многочисленные доброжелательные консультации и совместная обработка данных с биохимиками, ихтиологами, паразитологами и учеными других институтов КарНЦ РАН стало нормой ее научной жизни.

С коллегами из Финляндии, Норвегии, Дании и Канады Марина Ивановна вела активную переписку, обмениваясь научной информацией, и проводила совместные исследования. М. И. Сысоева состояла членом Международного общества растениеводов (ISHS), Европейского общества биологов растений (FESPB), являлась научным руководителем фундаментальных разделов госбюджетных тем, исследований по грантам РФФИ, руко-

водителем международных проектов. Ею опубликовано 2 монографии, более 200 научных работ и получено 3 патента на изобретения. Под ее руководством подготовлены и успешно защищены две кандидатские диссертации. Она читала спецкурсы, руководила курсовыми и дипломными работами студентов эколого-биологического факультета ПетрГУ, участвовала в организации и проведении научных конференций и семинаров. М. И. Сысоева была ответственным секретарем редакции «Труды КарНЦ РАН» (серия «Экспериментальная биология»), членом Ученого совета ИБ КарНЦ РАН, секретарем Карельского отделения Общества физиологов растений России, членом диссертационного совета К 002.035.01 при Институте биологии КарНЦ РАН.

М. И. Сысоева награждена Почетной грамотой РАН и профсоюзов работников РАН (2006 г.) и Почетной грамотой Президиума КарНЦ РАН (2007, 2010 гг.).

В жизни Марина Ивановна пользовалась огромным уважением в коллективе, была веселым, остроумным человеком, умеющим подмечать смешное и весело рассказывать, любила театр, путешествия, яркие краски разных сторон жизни. Любила и обожала своего талантливое сына Диму и верила в его будущие достижения. Ушел из нашей жизни человек, который хорошо работал, всем помогал, заражал жизненным оптимизмом и умел любить...

*Институт биологии
Карельского научного центра РАН;
Редсовет журнала
«Труды Карельского научного центра РАН»;
Карельское отделение
Общества физиологов растений России*

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

(требования к работам, представляемым к публикации
в «Трудах Карельского научного центра Российской академии наук»)

«Труды Карельского научного центра Российской академии наук» (далее – Труды КарНЦ РАН) публикуют результаты завершенных оригинальных исследований в различных областях современной науки: теоретические и обзорные статьи, сообщения, материалы о научных мероприятиях (симпозиумах, конференциях и др.), персоналии (юбилеи и даты, потери науки), статьи по истории науки. Представляемые работы должны содержать новые, ранее не публиковавшиеся данные.

Статьи проходят обязательное рецензирование. Решение о публикации принимается редакционной коллегией серии или тематического выпуска Трудов КарНЦ РАН после рецензирования, с учетом научной значимости и актуальности представленных материалов. Редколлегия серий и отдельных выпусков Трудов КарНЦ РАН оставляет за собой право возвращать без регистрации рукописи, не отвечающие настоящим правилам.

При получении редакцией рукопись регистрируется (в случае выполнения авторами основных правил ее оформления) и направляется на отзыв рецензентам. Отзыв состоит из ответов на типовые вопросы «Анкеты» и может содержать дополнительные расширенные комментарии. Кроме того, рецензент может вносить замечания и правки в текст рукописи. Авторам высылается электронная версия «Анкеты» и комментарии рецензентов. Доработанный экземпляр автор должен вернуть в редакцию вместе с первоначальным экземпляром и ответом на все вопросы рецензента не позднее чем через месяц после получения рецензии. Перед сдачей в печать авторам высылается распечатанная версия статьи, которая вычитывается, подписывается авторами и возвращается в редакцию.

Почтовый адрес редакции: 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11, КарНЦ РАН, редакция Трудов КарНЦ РАН. Телефон (8142) 762018.

Содержание номеров Трудов КарНЦ РАН и другая полезная информация, включая настоящие Правила, доступна на сайте <http://transactions.krc.karelia.ru>.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РУКОПИСИ

Статьи публикуются на русском или английском языке. Рукописи должны быть тщательно выверены и отредактированы авторами.

Статьи должны быть подписаны всеми авторами.

Объем рукописи (включая таблицы, список литературы, подписи к рисункам, рисунки) для серии «Экспериментальная биология» не должен превышать: для обзорных статей – 25 страниц, для оригинальных – 15, для сообщений – 8, для хроники и рецензий – 5–6. Объем рисунков не должен превышать 1/4 объема статьи. Рукописи большого объема (в исключительных случаях) принимаются при достаточном обосновании по согласованию с ответственным редактором.

Рукописи присылаются в электронном виде, а также в двух экземплярах, напечатанных на одной стороне листа формата А4 в одну колонку через 1,5 интервала (12 пунктов шрифта типа Times New Roman). Размер полей: сверху, снизу – 2,5 см, справа, слева – 2,5 см. Все страницы, включая список литературы и подписи к рисункам, должны иметь сплошную нумерацию в нижнем правом углу. Страницы с рисунками не нумеруются.

ОБЩИЙ ПОРЯДОК РАСПОЛОЖЕНИЯ ЧАСТЕЙ СТАТЬИ

Элементы статьи должны располагаться в следующем порядке: *УДК* курсивом на первой странице, в левом верхнем углу; заглавие статьи на русском языке заглавными буквами полужирным шрифтом; инициалы, фамилии всех авторов на русском языке полужирным шрифтом; полное название организации – место работы каждого автора в именительном падеже на русском языке курсивом (если авторов несколько и работают они в разных учреждениях, то следует отметить арабскими цифрами соответствие фамилий авторов учреждениям, в которых они работают; если все авторы статьи работают в одном учреждении, можно не указывать место работы каждого автора отдельно); аннотация на русском языке; ключевые слова на русском языке; инициалы, фамилии всех авторов на английском языке полужирным шрифтом; название статьи на английском языке заглавными буквами полужирным шрифтом; аннотация на английском языке; ключевые слова на английском языке; текст статьи (статьи экспериментального характера, как правило, должны иметь разделы: ВВЕДЕНИЕ. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. ВЫВОДЫ. ЛИТЕРАТУРА); благодарности; литература (с новой страницей); таблицы (на отдельном листе); рисунки (на отдельном листе); подписи к рисункам (на отдельном листе).

На отдельном листе дополнительные сведения об авторах: фамилия, имя, отчество всех авторов полностью на русском и английском языках; полный почтовый адрес каждой организации

(страна, город) на русском и английском языках; должности авторов; адрес электронной почты для каждого автора; телефон для контактов с авторами статьи (можно один на всех авторов).

ЗАГЛАВИЕ СТАТЬИ должно точно отражать содержание статьи и содержать не более 8–10 значащих слов.

АННОТАЦИЯ должна быть лишена вводных фраз, содержать только главную информацию статьи, не превышать объем – 15 строк.

Отдельной строкой приводится перечень **КЛЮЧЕВЫХ СЛОВ**. Ключевые слова или словосочетания отделяются друг от друга запятой, в конце фразы ставится точка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ должны содержать сведения об объекте исследования с обязательным указанием латинских названий и сводок, по которым они приводятся, авторов классификаций и пр. Транскрипция географических названий должна соответствовать атласу последнего года издания. Единицы физических величин приводятся по Международной системе СИ. Желательна статистическая обработка всех количественных данных. Необходимо возможно точнее обозначать местонахождения (в идеале – с точным указанием географических координат).

ИЗЛОЖЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ должно заключаться не в пересказе содержания таблиц и графиков, а в выявлении следующих из них закономерностей. Автор должен сравнить полученную им информацию с имеющейся в литературе и показать, в чем заключается ее новизна. Для фаунистических и флористических работ следует указывать место хранения коллекционных образцов. Если в статье приводятся сведения о новых для исследованной территории таксонах, то желательно и процитировать этикетку. Следует ссылаться на табличный и иллюстративный материал так: на рисунки, фотографии и таблицы в тексте (рис. 1, рис. 2, табл. 1, табл. 2 и т. д.), фотографии, помещаемые на вкладышах (рис. I, рис. II). Обсуждение завершается формулировкой основного вывода, которая должна содержать конкретный ответ на вопрос, поставленный во Введении. Ссылки на литературу в тексте даются фамилиями, например: Карху, 1990 (один автор); Раменская, Андреева, 1982 (два автора); Крутов и др., 2008 (три автора или более), и заключаются в квадратные скобки. При перечислении нескольких источников работы располагаются в хронологическом порядке, например: [Иванов, Топоров, 1965; Успенский, 1982; Erwin et al., 1989; Рыбаков, 1994; Longman, 2001].

ТАБЛИЦЫ нумеруются в порядке упоминания их в тексте, каждая таблица имеет свой заголовок. На полях рукописи (слева) карандашом указываются места расположения таблиц при первом упоминании их в тексте. Диаграммы и графики не должны дублировать таблицы. Материал таблиц должен быть понятен без дополнительного обращения к тексту. Все сокращения, использованные в таблице, должны быть пояснены в Примечании, расположенном под ней. При повторении цифр в столбцах нужно их повторять, при повторении слов – в столбцах ставить кавычки. Таблицы могут быть книжной или альбомной ориентации (при соблюдении вышеуказанных параметров страницы).

РИСУНКИ представляются отдельными файлами с расширением TIF (*.TIF) или JPG (не встраивать в Word). Графические материалы должны быть снабжены распечатками с указанием желательного размера рисунка в книге, пожеланий и требований к конкретным иллюстрациям. На каждый рисунок должна быть как минимум одна ссылка в тексте. Иллюстрации объектов, исследованных с помощью фотосъемки, микроскопа (оптического, электронного трансмиссионного и сканирующего), должны сопровождаться масштабными линейками, причем в подрисуночных подписях надо указать длину линейки. Приводить данные о кратности увеличения необязательно, поскольку при публикации рисунков размеры изменятся. Крупномасштабные карты желательно приводить с координатной сеткой, обозначениями населенных пунктов и/или названиями физико-географических объектов и разной фактурой для воды и суши. В углу карты желательна врезка с мелкомасштабной картой, где был бы указан участок, увеличенный в крупном масштабе в виде основной карты.

ПОДПИСИ К РИСУНКАМ должны содержать достаточно полную информацию, для того чтобы приводимые данные могли быть понятны без обращения к тексту (если эта информация уже не дана в другой иллюстрации). Аббревиации расшифровываются в подрисуночных подписях.

ЛАТИНСКИЕ НАЗВАНИЯ. В расширенных латинских названиях таксонов не ставится запятая между фамилией авторов и годом, чтобы была понятна разница между полным названием таксона и ссылкой на публикацию в списке литературы. Названия таксонов рода и вида печатаются курсивом. Вписывать латинские названия в текст от руки недопустимо. Для флористических, фаунистических и таксономических работ при первом упоминании в тексте и таблицах приводится русское название вида (если такое название имеется) и полностью – латинское, с автором и, желательно, с годом, например: водяной ослик (*Asellus aquaticus* (L. 1758)). В дальнейшем можно употреблять только русское название или сокращенное латинское без фамилии автора и года опубликования, например, для брюхоногого моллюска *Margarites groenlandicus* (Gmelin 1790) – *M. groenlandicus* или для подвида *M. g. umbilicalis*.

СОКРАЩЕНИЯ. Разрешаются лишь общепринятые сокращения – названия мер, физических, химических и математических величин и терминов и т. п. Все сокращения должны быть расшифрованы, за исключением небольшого числа общеупотребительных.

БЛАГОДАРНОСТИ. В этой рубрике выражается признательность частным лицам, сотрудникам учреждений и фондам, оказавшим содействие в проведении исследований и подготовке статьи, а также указываются источники финансирования работы.

* Названия видов приводятся на латинском языке **КУРСИВОМ**, в скобках указываются высшие таксоны (семейства), к которым относятся объекты исследования.

ЛИТЕРАТУРА. Пристатейные ссылки и/или списки пристатейной литературы следует оформлять по ГОСТ Р 7.0.52008. Библиографическая ссылка. Общие требования и правила составления (http://www.bookchamber.ru/GOST_P_7.0.5.2008). Список работ представляется в алфавитном порядке. Все ссылки даются на языке оригинала (названия на японском, китайском и других языках, использующих нелатинский шрифт, пишутся в русской транскрипции). Сначала приводится список работ на русском языке и на языках с близким алфавитом (украинский, болгарский и др.), а затем – работы на языках с латинским алфавитом. В списке литературы между инициалами ставится пробел.

ОБРАЗЕЦ ОФОРМЛЕНИЯ 1-Й СТРАНИЦЫ

УДК 631.53.027.32: 635.63

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ ПРЕДПОСЕВНОГО ЗАКАЛИВАНИЯ СЕМЯН НА ХОЛОДОУСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА

Е. Г. Шерудило¹, М. И. Сысоева¹, Е. Ф. Марковская²

¹ Институт биологии Карельского научного центра РАН

² Петрозаводский государственный университет

Аннотация на русском языке

Ключевые слова: *Cucumis sativus* L., кратковременное снижение температуры, устойчивость.

E. G. SHERUDILO, M. I. SYSOEVA, E. F. MARKOVSKAYA. EFFECTS OF DIFFERENT REGIMES OF SEED HARDENING ON COLD RESISTANCE IN CUCUMBER PLANT

Аннотация на английском языке

Key words: *Cucumis sativus* L., temperature drop, resistance.

ОБРАЗЕЦ ОФОРМЛЕНИЯ ТАБЛИЦЫ

Таблица 2. Частота встречаемости видов нематод в исследованных биотопах

Биотоп (площадка)	Кол-во видов	Встречаемость видов нематод в 5 повторностях				
		100 %	80 %	60 %	40 %	20 %
1Н	26	8	4	1	5	8
2Н	13	2	1	1	0	9
3Н	34	13	6	3	6	6
4Н	28	10	5	2	2	9
5Н	37	4	10	4	7	12

Примечание. Здесь и в табл. 3–4: биотоп 1Н – территория, заливаемая в сильные приливы; 2Н – постоянно заливаемый луг; 3Н – редко заливаемый луг; 4Н – незаливаемая территория; 5Н – периодически заливаемый луг.

ОБРАЗЕЦ ОФОРМЛЕНИЯ ПОДПИСИ К РИСУНКУ

Рис. 1. Северный точильщик (*Hadrobregmus confuses* Kraaz.)

ОБРАЗЕЦ ОФОРМЛЕНИЯ СПИСКА ЛИТЕРАТУРЫ

Ссылки на книги

Вольф Г. Н. Дисперсия оптического вращения и круговой дихроизм в органической химии / Ред. Г. Снатцке. М.: Мир, 1970. С. 348–350.

Илиел Э. Стереохимия соединений углерода / Пер. с англ. М.: Мир, 1965. 210 с.

Несис К. Н. Океанические головоногие моллюски: распространение, жизненные формы, эволюция. М.: Наука, 1985. 285 с.

Knorre D. G., Laric O. L. Theory and practice in affinity techniques / Eds. P. V. Sundaram, F. L. Eckstein. N. Y., San Francisco: Acad. Press, 1978. P. 169–188.

Ссылки на статьи

Викторов Г. А. Межвидовая конкуренция и сосуществование экологических гомологов у паразитических перепончатокрылых // Журн. общ. биол. 1970. Т. 31, № 2. С. 247–255.

Grove D. J., Loisides L., Nott J. Satiation amount, frequency of feeding and emptying rate in *Salmo gairdneri* // J. Fish. Biol. 1978. Vol. 12, N 4. P. 507–516.

Ссылки на материалы конференций

Марьинских Д. М. Разработка ландшафтного плана как необходимое условие устойчивого развития города (на примере Тюмени) // Экология ландшафта и планирование землепользования: тез. докл. Всерос. конф. (Иркутск, 11–12 сент. 2000 г.). Новосибирск, 2000. С. 125–128.

Ссылки на авторефераты диссертаций

Шефтель Б. И. Экологические аспекты пространственно-временных межвидовых взаимоотношений землероек Средней Сибири: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1985. 23 с.

Ссылки на диссертации

Шефтель Б. И. Экологические аспекты пространственно-временных межвидовых взаимоотношений землероек Средней Сибири: дис. ... канд. биол. наук. М., 1985. С. 21–46.

Ссылки на патенты

Патент РФ № 2000130511/28, 04.12.2000.

Еськов Д. Н., Серегин А. Г. Оптико-электронный аппарат // Патент России № 2122745. 1998. Бюл. № 33.

Ссылки на архивные материалы

Гребенщиков Я. П. К небольшому курсу по библиографии : материалы и заметки, 26 февр. – 10 марта 1924 г. // ОР РНБ. Ф. 41. Ед. хр. 45. Л. 1–10.

Ссылки на интернет-ресурсы

Паринов С. И., Ляпунов В. М., Пузырев Р. Л. Система Соционет как платформа для разработки научных информационных ресурсов и онлайн-сервисов // Электрон. биб-ки. 2003. Т. 6, вып. 1. URL: <http://www.elbib.ru/index.php?page=elbib/rus/journal/2003/part1/PLP/> (дата обращения: 25.11.2006).

Ссылки на электронные ресурсы на CDROM

Государственная Дума, 1999–2003 [Электронный ресурс]: электронная энциклопедия / Аппарат Гос. Думы Федер. Собрания Рос. Федерации. М., 2004. 1 CDROM.

CONTENTS

REVIEWS

E. V. Borvinskaya, L. P. Smirnov, N. N. Nemova. GLUTATHIONE S-TRANSFERASES IN FISH	3
E. A. Goncharova, Yu. V. Chesnokov, M. N. Sitnikov. A RETROSPECTIVE REVIEW OF RESEARCH INTO THE WATER STATUS OF CULTIVATED PLANTS BASED ON THE GENETIC RESOURCES COLLECTION OF THE ALL-RUSSIAN RESEARCH INSTITUTE OF PLANT INDUSTRY	10
P. N. Kravchenko, E. K. Oleinik. THE SYSTEM OF REGULATORY T CELLS AND AUTOIMMUNITY	18
N. S. Repkina, V. V. Talanova, A. F. Titov. EFFECTS OF HEAVY METALS ON GENE EXPRESSION IN PLANTS	31

ORIGINAL PAPERS

A. M. Andreeva, R. A. Fyodorov, I. P. Ryabtseva, N. E. Lamash, A. E. Philippova IDENTIFICATION OF VITELLOGENIN IN THE BLOOD SERUM OF THE PACIFIC REDFIN (<i>TRIBOLODON BRANDTII</i>)	46
Yu. V. Batova, N. M. Kaznina, G. F. Laidinen, A. F. Titov. EFFECT OF CADMIUM ON SOME PHYSIOLOGICAL PROCESSES IN TIMOTHY (<i>PHLEUM PRATENSE</i> L.)	52
D. I. Bashmakov, L. P. Akamova, K. A. Sazanova. PB^{2+} AND EDTA EFFECT ON PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS IN <i>PELARGONIUM ZONALE</i> L.	59
L. V. Vetchinnikova, T. Yu. Kuznetsova, A. F. Titov. PATTERNS OF HEAVY METAL ACCUMULATION IN LEAVES OF TREES IN URBAN AREAS IN THE NORTH	68
L. V. Vetchinnikova, O. S. Serebryakova, M. K. Ilyinova. DYNAMICS OF THE LIPID CONTENT AND THE FATTY ACID COMPOSITION OF SOME LIPID FRACTIONS IN FEMALE CATKINS OF <i>BETULA PENDULA</i> ROTH	74
O. A. Gavrilova, O. A. Tikhonova. DIVERSITY OF POLLEN GRAIN SHAPES, AND THEIR DISTRIBUTION ACROSS SOME <i>GROSSULARIACEAE</i> SPECIES AND HYBRIDS	82
A. S. Goryunov, A. G. Borisova, S. P. Rozhkov, G. A. Sukhanova, N. N. Rozhkova. HEMOGLOBIN OXIDATION IN CARBON AQUEOUS NANODISPERSIONS	93
K. Yu. Zueva, M. Yu. Ozerov, A. E. Veselov, C. R. Primmer. NATURAL SELECTION AFFECTING IMMUNE-RELATED LOCI IN ATLANTIC SALMON (<i>SALMO SALAR</i> L.)	101
N. M. Kaznina, A. F. Titov, G. F. Laidinen, Yu. V. Batova. EFFECT OF LEAF AGE ON THE CADMIUM RESISTANCE OF THE PLANT PHOTOSYNTHETIC APPARATUS	112
S. A. Kurbatova, N. A. Lapteva, I. Yu. Yershov, E. V. Borisovskaya. ENVIRONMENTAL ROLE OF HYDROPHYTES IN DEVELOPMENT AND FUNCTIONING OF PLANKTONIC COMMUNITIES	119
A. S. Lukatkin, N. N. Kashtanova. EFFECT OF THIDIAZURON ON THE THERMAL RESISTANCE OF MAIZE SEEDLINGS	129
O. V. Meshcheryakova, M. V. Churova, N. N. Nemova. SPECIES-, AGING- AND SEX-RELATED DIFFERENCES IN CYTOCHROME C- OXIDASE ACTIVITY IN WHITE MUSCLES OF SOME FISH IN NORTHWEST RUSSIA	136
E. V. Fateeva, E. V. Mokshin, A. S. Lukatkin. EFFECTS OF THE CONCENTRATIONS OF THE MEDIUM INORGANIC BASE AND GROWTH REGULATORS ON <i>CYMBIDIUM</i> HYBRID ORGANOGENESIS <i>IN VITRO</i>	143
E. A. Khizhkin, V. D. Yunash, L. B. Uzenbaeva, I. A. Vinogradova, V. A. Ilyukha, T. N. Ilyina, Yu. P. Baranova, A. V. Morozov. FUNCTIONING OF THE PHYSIOLOGICAL SYSTEMS IN THE POSTNATAL ONTOGENY IN RATS IS DISRUPTED IN THE ABSENCE OF THE PHOTOPERIOD	149
N. P. Chernobrovkina, E. V. Robonen, A. K. Morozov, T. N. Makarova. ACCUMULATION OF L-ARGININE IN NEEDLES OF NORWAY SPRUCE WITH REGULATED NITROGEN AND BORON AVAILABILITY	159

E. G. Sherudilo, <u>M. I. Sysoeva</u> , V. A. Ilyukha. RESPONSE OF THE ANTIOXIDANT SYSTEM IN CUCUMBER PLANTS TO CONTINUOUS AND PERIODIC SHORT-TERM LOW TEMPERATURE EXPOSURE	166
SHORT COMMUNICATIONS	
V. K. Bolondinskii, E. S. Kholoptseva. RESEARCH INTO THE PHOTOSYNTHESIS AND TRANSPIRATION IN KARELIAN BIRCH AND SILVER BIRCH	173
A. E. Veselov, D. S. Pavlov, M. A. Skorobogatov, D. A. Yefremov, G. A. Nagirnyak, M. A. Ruch'ev. RESULTS OF TRIALS OF A NEW DESIGN OF THE SALMON EGGS INCUBATION REDD IN FLUVIAL SETTINGS	179
D. S. Kapshaj, V. K. Golovanov. UPPER LETHAL TEMPERATURE IN THE YOUNG OF THERMOPHILIC FISH DEPENDING ON THE ACCLIMATION TEMPERATURE	185
I. M. Kamshilov, R. A. Zaprudnova. THE BOHR EFFECT IN THE CHARACTERISTICS OF THE BUFFER PROPERTIES OF FISH HEMOGLOBIN	190
<u>M. I. Sysoeva</u> , V. V. Lavrova, E. M. Matveeva. EFFECT OF DAILY SHORT-TERM TEMPERATURE DROPS ON THE CONTENT OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS IN THE LEAVES OF NEMATODE-INFECTED POTATO PLANTS	194
V. V. Yakovlev, A. Yu. Luk'yanov, A. A. Kogut, D. A. Sysoev. AUTOMATED SYSTEM WITH WIRELESS TECHNOLOGIES FOR RECORDING DAILY TEMPERATURE AND HUMIDITY VARIATIONS	200
DATES AND ANNIVERSARIES	
N. N. Nemova, O. N. Lebedeva. Institute of biology, karelian research centre of ras celebrates 60 th anniversary	204
On the 60 th anniversary of the Institute of Biology, KarRC of ras. From recollections by professor Vladimir K. Kurets	210
A. F. Titov, N. M. Kaznina. Vera V. Talanova (on the 60 th anniversary)	216
REVIEWS AND BIBLIOGRAPHY	222
BEREAVEMENTS	
Marina I. Sysoeva (1960–2013)	224
INSTRUCTIONS FOR AUTHORS	226

Научное издание

**Труды Карельского научного центра
Российской академии наук**
№ 3, 2013

Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

*Печатается по решению
Президиума Карельского научного центра РАН*

Свидетельство о регистрации СМИ ПИ № ФС77-48848 от 02.03.2012 г.
выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи,
информационных технологий и массовых коммуникаций

Редактор А. И. Мокеева
Оригинал-макет Н. Н. Сабанцева

Подписано в печать 18.06.2013. Формат 60x84¹/₈.
Гарнитура Pragmatica. Печать офсетная. Уч.-изд. л. 22,8. Усл. печ. л. 26,97.
Тираж 500 экз. Изд. № 372. Заказ 137.

Карельский научный центр РАН
Редакционно-издательский отдел
185003, г. Петрозаводск, пр. А. Невского, 50