

**Симпозиум 1**

**ЭНЕРГЕТИКА И МЕТАБОЛИЗМ  
РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ**

**INFLUENCE OF LIPIDS ON ACTIVITY  
OF THE XANTHOPHYLLS CYCLE DE-EPOXIDASES**

D. Latowski<sup>1,2</sup>, R. Goss<sup>3</sup>, J. Grzyb<sup>1</sup>, H.-E. Akerlund<sup>4</sup>, K. Burda<sup>5</sup>,  
J. Kruk<sup>1</sup>, K. Strzalka<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Plant Biochemistry and Physiology,  
Jagiellonian University, Krakow

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Pedagogical University, Krakow

<sup>3</sup> Institute of Biology I, University of Leipzig, Leipzig

<sup>4</sup> Department of Plant Biochemistry, University of Lund, Lund

<sup>5</sup> Department of Medical Chemistry,  
Institute of Physics Jagiellonian University, Krakow  
E-mail: [strzalka@mal.uj.edu.pl](mailto:strzalka@mal.uj.edu.pl)

The xanthophyll cycle is a light-dependent interconversion between various xanthophylls and it functions as a photoprotective mechanism widespread in plant kingdom. Three types of the xanthophyll cycle have been described: the violaxanthin cycle, operating in vascular plants as well as in green and brown algae, the lutein epoxide cycle found in some vascular plant species and the diadinoxanthin cycle, functioning in several algal classes. The reactions of the violaxanthin cycle comprise an interconversion between violaxanthin, antheraxanthin and zeaxanthin. Conversion of violaxanthin to zeaxanthin is carried out in strong light by a luminal enzyme, violaxanthin de-epoxidase (VDE). The diadinoxanthin cycle comprises only one de-epoxidation/epoxidation step with an involvement of a monoepoxide, diadinoxanthin, and an epoxide free diatoxanthin. De-epoxidation reaction in the diadinoxanthin cycle is carried out by diadinoxanthin de-epoxidase (DDE). Both de-epoxidases are luminal enzymes requiring for their activity low pH, ascorbate and monogalactosyldiacylglycerol (MGDG).

Using *in vitro* system for measurement of VDE and DDE activity we found that replacement of MGDG with digalactosyldiacylglycerol (DGDG) or phosphatidylcholine (PC) resulted in strong inhibition of violaxanthin and diadinoxanthin de-epoxidation. On the other hand replacement of MGDG with phosphatidylethanolamine (PE) sustained a high VDE and DDE activity in spite of very different chemical character of these two lipids. The obtained results clearly indicate that only inverted hexagonal phase ( $H_{II}$ ) forming lipids (MGDG and PE) may effectively support the violaxanthin and diadinoxanthin de-epoxidation, whereas bilayer forming lipids (DGDG and PC) are not effective in this process. Hence, a conclusion is drawn that the activity of VDE and DDE depends not on the chemical character of lipids but

on the kind of structure they form in water environment. Using phosphorus NMR measurements we detected the existence of H<sub>II</sub> phase in a binary (MGDG/PC) lipid mixture as well as in thylakoid membranes. We propose a molecular model of violaxanthin and diadinoxanthin de-epoxidation in which a crucial role plays H<sub>II</sub> phase forming lipids.

### ECOPHYSIOLOGICAL PLASTICITY OF PHOTOSYNTHESIS IN CLONALLY INTEGRATED *IRIS PUMILA* L.

**Z. Popovic**

Department of Ecology, Institute for Biological Research «Sinisa Stankovic»,  
Belgrade

E-mail: [zorica@ibiss.bg.ac.yu](mailto:zorica@ibiss.bg.ac.yu)

The photosynthetic plasticity within the clonally integrated ramets of *I. pumila* was analyzed in the natural site conditions – steppe community in semi-arid region of Deliblato Sands, Serbia. Two analyzed groups of ramets grown at the opposite ends of 40 cm long rhizome. One group of ramets (HI) grown in full sun exposure, and second group of ramets (LI) grown in semi-shade under hawthorn. These two groups of ramets were exposed to the different microenvironment, i.e. at the flowering time – mid April to May, PPFD at leaf level was in average 988  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  in HI and 511  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  in LI, respectively, whereas mean leaf T was 27.3 °C in HI and 22.8 °C in LI, respectively.

Photoinhibition and temperature stress caused significant differences in net photosynthetic rate ANET (average 18.7  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  in sun exposed ramets and 20.1  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  in semi-shaded ramets, respectively), transpiration rate E (average 91.2 in HI and 102.6 in LI, respectively), stomatal conductance gS (average 0.511 in HI and 0.565 in LI, respectively) and efficiency of photosystem II  $F_v/F_m$  (average 0.615 in HI and 0.767 in LI, respectively). Moreover, the diurnal changes of gas exchange and chlorophyll fluorescence were also distinct between two analyzed groups of ramets. Under full-sun exposure, ANET peak appeared earlier (at about 10:00 of local time), whereas in semi-shaded ramets ANET reached peak near noon (at about 11:45). At midday, all ramets exerted a depression in  $F_v/F_m$ , but the function of photosystem II after 17:00 has been recovered only in the semi-shaded ramets.

**ИЗМЕНЕНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ТРАНСПОРТНОЙ СИСТЕМЫ ЛИСТА ПРИ ТОРМОЖЕНИИ ОТТОКА АССИМИЛЯТОВ НИТРАТ-ИОНОМ****Ultrastructurur change of leaf transport system under influence of nitrate-ion**

**Ф.А. Абдрахимов, С.Н. Баташева, Г.Г. Бакирова, В.И. Чиков**  
Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань  
E-mail: *chikov@kzn.ru*

Исследовали изменения ультраструктуры клеток проводящих пучков и мезофилла листовых пластинок донорной части растений льна-долгунца в условиях торможения оттока из них ассимилятов в результате принудительного введения (под давлением 0.1 атм.) в апопласт побега раствора нитрата калия (0.5 %).

Показано, что клетки-спутники мелких жилок контрольных растений характеризовались хорошо развитой системой апопластного лабиринта и слабой вакуолизацией их протопласта. Через 30 мин. после введения в апопласт раствора  $KNO_3$  отмечены существенные изменения в ультраструктуре клеток листа-донора ассимилятов. Матрикс митохондрий просветлялся, а их кристы редуцировались. Отмеченные эффекты были более выражены в клетках флоэмной паренхимы и обкладки пучков, менее – в мезофилле и отсутствовали в клетках-спутниках. Одновременно в клетках мезофилла и обкладки пучков наблюдали набухание и просветление матрикса пероксисом, а в клетках спутниках флоэмы – формирование крупной центральной вакуоли. Через 1 час после начала воздействия вакуоль заполнялась везикулами. Создавалось впечатление, что увеличение вакуоли было сопряжено с процессами эндоцитоза. На границе вакуолярного домена и лабиринта – на вершинах гребней клеточной стенки – формировались крупные везикулы, ограниченные двумя мембранами. В полости вакуоли внешняя мембрана удалялась с образованием мультимембранных тел. Просветы ситовидных элементов также заполнялись электронно-прозрачными везикулами. Параллельно клетки мезофилла, обкладки и флоэмной паренхимы репарировали организацию своих органелл до контрольного уровня. Такая организация ультраструктуры сохранялась и ко второму часу после начала воздействия.

Полученные данные обсуждаются в связи с ингибирующим действием нитратов на экспортную функцию листа. Авторы предполагают, что обнаруженные изменения структуры клеток листовых пластинок, по-видимому, являются выражением как прямого действия нитрат-аниона и/или продукта его неполного восстанов-

ления – NO на сенсорные и метаболические системы ассимилирующей ткани, так и с задержкой эвакуации сахарозы. Как следствие накопления в мезофилле продуктов фотосинтеза и выравнивания концентрационного градиента сахарозы в направлении мезофилл – обкладка – клетки-спутники – флоэма происходит репарация организации клеток листа.

### **ЭФФЕКТЫ ОРИЗАЛИНА НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ КЛЕТОК КОРНЕЙ ПШЕНИЦЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ**

#### **Effects of oryzalin on structural and functional organizations of the wheat root cells depending on the influence durations**

Й.Р. Абдрахимова, Ф.А. Абдрахимов<sup>1</sup>, Л.Р. Валиуллина, Л.П. Хохлова  
Казанский государственный университет, г. Казань  
E-mail: [Yoldez.Abdrahimova@ksu.ru](mailto:Yoldez.Abdrahimova@ksu.ru)

<sup>1</sup> Институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, г. Казань

Более ста лет назад Н.К. Кольцовым впервые были предложены термины «цитоскелет» и «принцип цитоскелета», согласно которым степень разветвленности и мощность развития внутриклеточных белковых тяжей определяют форму клеток. В настоящее время ключевая роль эволюционно консервативных тубулиновых микротрубочек и актиновых филаментов цитоскелета в цитоархитектуре, детерминирующих формообразовательные процессы живых организмов в целом, не вызывает сомнений. Одним из наглядных экспериментальных подтверждений является радиальное расширение кончиков корней – так называемый свэллинг, который наблюдается при действии цитоскелетных ядов, в том числе высокоспецифичного для растений антимиотрубочкового агента оризалина, используемого на практике в качестве гербицида против сорняков-злаков. Ранее в наших работах была обнаружена корреляция между степенью свэллинговых деформаций и содержанием цитоскелетных белков в корнях разных по морозоустойчивости сортов озимой пшеницы, которые были максимальными в случае экологически наиболее пластичного сорта Мироновская 808. Цель данной работы – проведение сравнительного анализа структурно-функциональных альтераций клеток, приводящих к свэллинговым деформациям корней, при разной длительности действия оризалина (два часа и двое суток). Объектом исследования служили корни шестисуточных проростков озимой пшеницы

(*Triticum aestivum* L.) сорта Мироновская 808. Ультра- и мезоструктурную организацию клеток изучали с помощью электронного и светового микроскопов, дыхание – полярографическим методом с использованием дыхательных ядов (KCN и СГК по 1 мМ). Морфометрический анализ проводили, измеряя продольные клеточные оси в клеточных линиях двух-трех слоев мезодермы на фотоотпечатках продольных срезов корневого апекса.

Установлено, что средняя длина продольной оси клеток меристемы в контрольном варианте (без оризалина) составляет около 17 мкм, а длина зоны меристемы – 700-800 мкм, считая от инициальной клетки, что соответствует литературным данным, полученным для корней пшеницы. Интенсивность дыхания этих зон составляла около 700 мкл поглощенного  $O_2$  / (г сырого веса·ч), что свидетельствует об их высокой метаболической активности по сравнению со средней частью корня, у которой скорость общего дыхания не превышала 500 мкл. Ингибиторный анализ выявил, что почти 50 % общего дыхания приходится на долю цитохромного, 30 – цианидрезистентного или альтернативного, 20 – остаточного дыхания. Короткая экспозиция (два часа) корней в растворе оризалина (10 мкМ) оказала слабое влияние на их общую морфологию, хотя и было отмечено ингибирование митозов. При продолжавшемся росте клеток последнее приводило к увеличению средней продольной длины клеток меристемы до 20 мкм и, как следствие, к смещению начала зоны растяжения на 150-200 мкм в базальном направлении. Одновременно наблюдали подавление скоростей общего и цитохромного дыхания с повышением доли цианидрезистентного. Воздействие оризалином в течение двух суток вызывало существенные альтерации как в общей морфологии корней, так и в ультраструктурной организации их клеток, но при этом дыхание достоверно не изменялось. Наиболее сильным трансформациям подвергались структуры генетического аппарата, выражавшиеся в образовании ядрышковых вакуолей, усилении конденсации хроматина, многоядерности. Размеры ядер и самих клеток возрастали, что скорее всего было связано с увеличением плоидности генетического материала, поскольку при разрушении микротрубочек, как известно, параметры ядерно-цитоплазматических отношений поддерживаются близкими к контрольным. Эти изменения наряду с индукцией оризалином вакуолизации клеток обуславливали появление выраженных свэллинговых деформаций корней. По данным морфометрического анализа, продольная длина клеток меристемы возрастала почти вдвое по сравнению с контролем (33 мкм против 17), причем экспоненциальная часть кривой, указывающая на переход клеток к росту растяжением, отсутствовала, что свидетельствует о нарушении полярности роста, а также

границы между зонами деления и элонгации. Этот участок корня получил в литературе название «переходной зоны», поскольку ее клетки уже не делятся, но в отличие от анизотропного роста в зоне элонгации характеризуются «постмитотическим» изодиаметрическим ростом. Следовательно, особенности организации клеток «переходной зоны» совместно с высокой чувствительностью элементов цитоскелета могут обуславливать ранние и быстрые адаптивные реакции корня на действие стресс-факторов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 04-04-49318).

**РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИЯ АКВАПОРИН-ОПОСРЕДОВАННОЙ  
ОСМОТИЧЕСКОЙ ВОДНОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ ПЛАЗМАЛЕММЫ,  
ИЗОЛИРОВАННОЙ ИЗ КОРНЕЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА**

**Redox-regulation of aquaporin-mediated osmotic water permeability  
in plasma membrane, isolated from roots of pea seedlings**

**Я.Н. Ампилогова, И.М. Жесткова, М.С. Трофимова**  
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: [pmembrane@ippras.ru](mailto:pmembrane@ippras.ru)

Тиолы играют важнейшую роль в определении редокс-состояния белков, клеток и организмов. Окисление этих групп ведет к образованию дисульфидов или других высокоокисленных продуктов, иногда с потерей биологической активности. Редокс-контроль в клетке за счет взаимопревращений дитиол $\leftrightarrow$ дисульфид рассматривается как один из эффективных способов адаптации растений к стрессам. Смещение внутриклеточного или мембранного равновесия в сторону преобладания SH-групп, обладающих высокой лабильностью и реакционной способностью, может изменить активность широкого круга ферментов и белков с иной функцией и, как следствие, интенсивность и направленность множества метаболических путей. Вместе с тем природа эндогенных факторов, способных регулировать баланс окисленных и восстановленных дитиолов в растениях, а также физиологические последствия изменений этого баланса не установлены окончательно. При исследовании этой проблемы используются два приема: искусственное изменение соотношений дитиол $\leftrightarrow$ дисульфид путем блокирования SH-групп SH-реагентами на модельных системах различной сложности и анализ активности реакций или процессов, осуществляемых ими. С другой стороны, количественное определение SH-групп в клетках, тканях или органах растений, подвергавшихся дей-

ствию стрессов, что позволяет судить о динамике изменений статуса тиоловых групп при физиологических условиях. Оба приема были использованы нами при изучении трансмембранного транспорта воды через плазмалемму, поскольку в работе этого механизма предполагается ведущая роль SH-групп аквапоринов, функционирующих как водные каналы. Основанием для этого является высокая эффективность SH-реагентов в ингибировании транспорта воды. Согласно результатам анализа аминокислотного состава и данным кристаллографии аквапоринов PIP-типа, их молекула содержит четыре высококонсервативных цистеина, функция которых пока не установлена. Высокая консервативность этих цистеинов указывает на возможность их участия в регулировании аквапоринов путем влияния на олигомеризацию и/или переход между «открытым» и «закрытым» состоянием водного канала через образование меж- или внутримолекулярных дисульфидных связей, соответственно. Необходимым этапом в исследовании редокс-регуляции является выяснение того, обладают ли аквапорины и опосредованная ими осмотическая водная проводимость мембран чувствительностью к изменению окислительно-восстановительного потенциала среды, в частности, баланса между концентрацией окисленных и восстановленных тиоловых групп. Плазматическая мембрана, которая находится на границе раздела сред с высоким и низким восстановительным потенциалом, может быть сенсором изменений этого параметра как в апопласте, так и в цитозоле. Таким образом, многие цистеин-содержащие белки плазмалеммы, в том числе аквапорины, могут быть мишенями для эндогенных систем редокс-регуляции.

В представленной работе для смещения баланса дитиол $\leftrightarrow$ дисульфид в среду для выделения плазмалеммы вводили SH-окисляющий (диамид) или SH-восстанавливающие (дитиотреитол и трибутилфосфин) реагенты. В мембранных препаратах определяли содержание SH-групп, коэффициент осмотической водной проницаемости, содержание PIP-аквапоринов и соотношение между их мономерной и олигомерной формами. Эти же параметры анализировали на мембранах, изолированных из корней проростков, подвергнутых суточному охлаждению.

Обнаружено, что осмотическая водная проницаемость плазмалеммы корней гороха чувствительна к редокс-потенциалу среды. Результаты анализа состояния аквапоринов позволили предположить, что у проростков, выращенных в оптимальных условиях, она обусловлена обратимым окислительно-восстановительным переходом SH-групп пары цистеинов, локализованных в обращенной в апопласт петле. Согласно результатам действия ингибиторов фосфатаз у проростков, подвергнутых охлаждению, такая чув-



ствительность может быть опосредована через влияние на активность аквапоринов тирозиновой протеинфосфатазы как компонента эндогенной НАДФН-оксидазной системы регулирования.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 05-04-48919).

**МЕТАБОЛИТЫ РАЗВИВАЮЩИХСЯ КЛЕТОК КСИЛЕМЫ И ФЛОЭМЫ  
В ПЕРИОДЫ ОБРАЗОВАНИЯ РАННЕЙ И ПОЗДНЕЙ ДРЕВЕСИНЫ  
В СТВОЛАХ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ**

**The metabolites of developing xylem and phloem cells during earlywood  
and latewood formation in *Pinus sylvestris* stems**

**Г.Ф. Антонова, В.В. Стасова**

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, г. Красноярск

E-mail: [institute@forest.akadem.ru](mailto:institute@forest.akadem.ru)

Ранняя и поздняя древесина хвойных, в том числе сосны обыкновенной, отличаются морфологическими параметрами клеток, что приводит как к различию в физико-механических свойствах, так и в поведении при химической переработке. Чтобы выявить различия в метаболизме клеток ксилемы во время их дифференциации в периоды образования ранней и поздней древесины сосны обыкновенной, исследовали содержание общих метаболитов, углеводов, уроновых кислот, аскорбиновой (АК) и дегидроаскорбиновой (ДАК) кислот в зависимости от степени и стадии роста и развития трахеид. Клетки ксилемы с разной степенью развития первичных и вторичных стенок собирали микрорассечением со ствольных отрезков 25-летних деревьев сосны в периоды формирования либо ранней, либо поздней древесины. Одновременно были собраны клетки флоэмы, прилежащие к камбиальной зоне (функционирующая флоэма) и непроводящего слоя. Все вместе позволяет проследить уровень исследуемых метаболитов в зависимости от доступности субстрата в транспортной системе и степени дифференцированности клеток ксилемы, а также оценить изменение метаболизма к моменту остановки роста клеток и началу такого важного процесса как лигнификация. Установлено, что на последовательных стадиях роста и развития клеток флоэмы и ксилемы количество низкомолекулярных метаболитов меняется в направлении от зрелых клеток флоэмы к зрелым клеткам ксилемы, достигая максимума (в расчете на сухой вес) в клетках камбиальной зоны. Однако согласно расчету на клетку камбиальная зона содержала минимальное количество метаболитов, тогда как максимум их содержания наблюдался в клетках функционирующей флоэмы и ксилемных клетках слоя вторичного утолщения до начала лиг-

нификации при развитии ранней древесины, а при формировании поздней ксилемы – в начале процесса лигнификации. Количество метаболитов в развивающихся клетках флоэмы и ксилемы больше при образовании ранней, чем поздней древесины. Состав метаболитов во время дифференциации клеток также меняется, и динамика каждой из групп исследованных метаболитов имеет свои особенности. При этом расчет на сухой вес образцов и расчет на клетку показывает разные локальные максимумы веществ. В расчете на сухой вес наибольшим содержанием низкомолекулярных углеводов при развитии ранней древесины отличаются камбиальная зона и слой клеток перед лигнификацией. В то же время по количеству на клетку в камбиальной зоне углеводов меньше в два раза, чем в функционирующей флоэме, и в 1.5 раза ниже, чем в период роста клеток растяжением. Максимальное содержание углеводов отмечено в клетках с вторичным утолщением до лигнификации. Это показывает, что увеличение потребности в углеводах в этой зоне вызывают приток субстратов. При формировании поздней ксилемы, напротив, в камбиальной зоне количество углеводов в расчете на клетку минимально, тогда как максимум содержат клетки не в начале вторичного утолщения, а в начале лигнификации. Следовательно, различие в морфогенезе клеток двух типов древесины связаны с изменением углеводного метаболизма и транспорта субстратов к развивающимся клеткам ксилемы в зависимости от стадии их дифференцированности. При развитии ранней древесины количество уроновых кислот, предшественников АК, на клетку было наибольшим в слое вторичного утолщения до лигнификации, тогда как при формировании поздней – в начале лигнификации. Аскорбиновая кислота и ее окисленная форма дегидроаскорбиновая кислота тоже изменяются специфично по отношению к ткани и к стадии развития клеток. Отношение аскорбиновой к дегидроаскорбиновой кислоте (АК/ДАК) показывает изменение окислительно-восстановительного потенциала в зависимости от стадии дифференциации клеток ксилемы во время морфогенеза клеток двух типов древесины. Это отношение максимально в зоне роста растяжением при формировании ранних трахеид и снижается по мере накопления веществ вторичных стенок трахеид и лигнификации. В период формирования поздней древесины отношение имеет наибольшее значение в камбиальной зоне, снижается к началу отложения лигнина в ксилеме и затем постепенно повышается к зрелой ксилеме. Различие в уровне окислительно-восстановительного потенциала в периоды формирования ранней и поздней ксилемы может свидетельствовать о разной степени окисления предшественников лигнина на стадиях морфогенеза клеток этих типов древесины и различной динамике лигнификации тканей.

**ВЛИЯНИЕ ЗАКАЛИВАНИЯ НА ЭНЕРГЕТИКУ ДЫХАНИЯ РАСТЕНИЙ МЯГКОЙ  
ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ (*Tr. aestivum*),  
РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ПРОДУКТИВНОСТИ**

**Hardening influence on the plant respiration energetic  
of soft winter wheat (*Tr. aestivum*) cultivars, differing by productivity**

**Н.С. Балаур, Р.Р. Кицан, В.А. Воронцов, М.В. Кауш, Л.Т. Меренюк,  
Н.Г. Бухов<sup>1</sup>, А.Г. Шугаев<sup>1</sup>**

Институт генетики и физиологии растений АН Республики Молдова,  
г. Кишинев

E-mail: [igcanc@mail.md](mailto:igcanc@mail.md)

<sup>1</sup> Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, г. Москва

E-mail: [ifr@ippras.ru](mailto:ifr@ippras.ru)

Проблема дальнейшего повышения урожайности сельскохозяйственных растений связана, с одной стороны, с созданием новых сортов и гибридов с высоким потенциалом продукционного процесса, с другой – с обеспечением условий и выявлением путей максимальной реализации этого потенциала в конкретных условиях среды. В этом контексте дыхание обоснованно рассматривается как источник снабжения биосинтезов не только предшественниками органических соединений в реализации продукционного процесса, но и необходимыми для этого энергетическими эквивалентами. С этой точки зрения энергетическая эффективность дыхания приобретает особое значение в связи с прохождением растениями процесса закаливания, от которого зависит их морозоустойчивость и продуктивность.

В настоящей работе исследовали энергетику дыхания растений озимой пшеницы до и после закаливания.

Объектом исследований служили сорта мягкой озимой пшеницы (*Tr. aestivum*), различающихся по уровню продуктивности (Баллада – 41.7, Бельчанка 7 – 29.4, Дана – 27.3, Бельцкая 32 – 20.0 ц/га), представленные для изучения Научно-исследовательским институтом полевых культур (г. Бельцы, РМ). Растения выращивали в сосудах Митчерлиха на вегетационной площадке Института генетики и физиологии растений АН РМ. Пробы для изучения энергетики дыхания (энергия, выделяемая в процессе дыхания –  $E_r$ ; выделение тепла (диссипация энергии) –  $Q$ ; энергетическая эффективность дыхания –  $Q/E_r$ ) брались в фазе трех листьев до закаливания растений и через 14 дней после начала наступления пониженных температур – условия, при которых проходят процессы закаливания растений.

В результате проведенных исследований выявлено, что экспрессия энергетики дыхания указывает на существование двух направлений в ее изменении: первое – в зависимости от уровня продуктивности растений как до закаливания, так и после процесса закаливания; второе – изменения, индуцированные процессом закаливания растений.

Сравнительный анализ величин  $E_r$ ,  $Q$ ,  $Q/E_r$  в целом показывает, что независимо от влияния, которое оказывало закаливание на растения, продуктивные сорта характеризуются более высокими уровнями  $E_r$  и диссипации энергии ( $Q$ ). Самыми низкими уровнями указанных параметров характеризуются сорта с наименьшей продуктивностью.

Закаливание растений индуцирует специфические изменения в росте, развитии и адаптации растений, но при этом сохраняется закономерность, установленная до закаливания, связанная с уровнем продуктивности. Оно привело к увеличению  $E_r$  и  $Q$  у всех изученных сортов, но наибольшие значения характерны для более продуктивных сортов, наименьшие – для менее продуктивных.

Анализ энергетической эффективности дыхания ( $Q/E_r$ , %) показывает, что несмотря на то, что энергетический баланс остается положительным всегда, т.е. уровень энергии, выделяемой в процессе дыхания больше, чем уровень диссипации энергии, закаливание растений (действие пониженных температур) ухудшает энергетический баланс дыхания, т.е. уменьшает процесс сопряжения между окислением и фосфорилированием и, как следствие, меняется соотношение между уровнем энергии, выделяемой в процессе дыхания, и уровнем диссипации энергии в этом процессе.

Исследования проведены при финансовой поддержке совместного проекта (06.28СКА) в рамках договора между АН РМ и РФФИ.

#### ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ УСТОЙЧИВОСТИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ К ДЕЙСТВИЮ ЗАСОЛЕНИЯ И ОСМОТИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

##### Cytological view on resistance of modified plant to salt and osmotic influence

Е.Н. Баранова, А.А. Гулевич, В.Ю. Поляков, П.Н. Харченко  
ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, г. Москва  
E-mail: [Greenpro2006@rambler.ru](mailto:Greenpro2006@rambler.ru)

Одной из широко применявшихся до недавнего времени биотехнологий являлась клеточная селекция – возможность отбирать в контролируемых условиях *in vitro* формы (клоны), приобрета-

шие благодаря так называемой соматоклональной вариации свойство адаптироваться к неблагоприятным селективным факторам: повышенному содержанию осмотиков, увеличенным концентрациям различных солей, культуральным филтратам фитопатогенных грибов и т.д. Существует множество примеров получения как положительных, так и отрицательных результатов в попытке отобрать с помощью клеточной селекции формы растений, толерантные к повышенному содержанию NaCl в среде. Однако основным препятствием в использовании данной технологии послужило то, что имеются сведения лишь о единичных случаях регенерации солетолерантных фенотипов, а также об их длительном поддержании *in vivo* и передаче данного признака последующему потомству.

В Институте кормов им. Вильямса методом клеточной селекции на устойчивость к NaCl была получена устойчивая линия люцерны (*Medicago sativa*) – Клон 124, стабильно передававшая свойство солетолерантности семенному потомству. Мы решили исследовать реакцию данного клона на действие соли и осмотика на цитологическом уровне на стадии прорастания семени. Выяснилось, что у проростков, развивавшихся в присутствии NaCl и маннитола, в той или иной степени нарушаются процессы, связанные с метаболизмом запасных питательных веществ. Также мы собирались выявить надежный цитологический параметр, позволяющий разграничить реакцию на осмотический и токсический факторы солевого стресса. Проведено сравнительное изучение клеток столбчатого и губчатого мезофилла семядолей контрольных растений и растений, развивавшихся в условиях воздействия NaCl в течение восьми суток на примере люцерны посевной сорта Надежда и Клона 124. В качестве критериев использовали два параметра: форма клеток и их удельное количество к единице площади поперечного сечения семядоли. Показана принципиальная возможность применения количественного метода для выявления характера устойчивости (к осмотическому, токсическому фактору) к засолению у растений, полученных биотехнологическими методами. В нашем исследовании по выявлению цитологических маркеров мы пришли к выводу, что наиболее ярким показателем устойчивого развития в присутствии солей и осмотика могут быть размер клеток мезофилла семядоли, а также нарушения структуры интерфазного цитоскелета, непосредственно связанные с процессами роста клеток и распада запасных веществ. Для анализа предполагаемой устойчивости у модифицированного растения по причине преобладающего роста растяжением у семядолей двудольных растений следует рассматривать поперечный срез семядоли. В данном случае модель разрабатывалась для люцерны и рекомендуемый срок анализа – восьмью сутками (на этот срок семядольный

лист контрольных растений полностью сформирован и освобожден от запасных веществ). При анализе срезов контрольных растений Клона 124 и сорта Надежда установлены корреляция данных об изменениях размера клеток при прорастании на различных осмоотических концентрациях маннитола и расхождения в зависимости размеров клеток как губчатой, так и столбчатой паренхимы при прорастании на возрастающих осмоотических концентрациях NaCl. Установлено, что полученный клеточной селекцией Клон 124 в условиях эксперимента не обладает устойчивостью к осмоотическому воздействию, но обладает устойчивостью к повышенным концентрациям NaCl. Однако в естественных условиях он не будет обладать преимуществами перед традиционными сортами, так как его устойчивость связана с увеличением объема клеток (что возможно только в условиях достаточной водообеспеченности). Вероятной причиной такого результата клеточной селекции, возможно, является вызванная культивированием эпигенетическая модификация или же мутация, позволяющая растениям специфическим образом реагировать на присутствие NaCl. Мы предполагаем, что при использовании теста на размер клеток мезофилла при действии осмоотика и NaCl могут быть выявлены модифицированные формы, обладающие реальной устойчивостью в полевых условиях, а при проведении последующего анализа утилизации запасных веществ и состояния цитоскелета подобные формы, клоны и т.п. могут быть прогностически охарактеризованы на предмет повреждения процессов утилизации запасных веществ и дифференцировки клеток, в качестве одних из важных показателей предполагаемой будущей урожайности сельскохозяйственных растений.

#### ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ХЛОРОФИЛЛА КАК СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА

##### Changes in chlorophyll spectral properties as a means for assessing the functioning of photosynthetic apparatus

Н.Г. Бухов

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: [nbukhov@ippras.ru](mailto:nbukhov@ippras.ru)

Работа фотосинтетического аппарата на свету инициируется переносом электрона в хлоропласте, опосредуемым функционированием его электрон-транспортной цепи. Этот перенос электрона сопровождается изменениями спектральных свойств компонентов

электрон-транспортной цепи хлоропласта и листа в целом. Основными спектральными параметрами, подвергающимися изменениям в хлоропласте, являются изменения поглощения и флуоресценции хлорофилла, входящего в состав как фотосинтетических реакционных центров, так и антенных комплексов хлоропласта. В фотосистеме I происходят изменения поглощения в видимой и ближней инфракрасной области спектра первичного донора реакционного центра – P700, обусловленные его фотоокислением или восстановлением в темноте. В фотосистеме II – это изменения переменной флуоресценции хлорофилла, возникающей при рекомбинации окисленного первичного донора этой фотосистемы, P680, и восстановленного первичного акцептора – феофитина. Поскольку редокс-состояния хлорофилловых пигментов электрон-транспортной цепи прямо зависят от внешних условий и функционального состояния фотосинтетического аппарата, вышеуказанные методы широко используются при исследовании деталей работы электрон-транспортной цепи и диагностики функционального состояния растений в целом.

Работа поддержана грантом РФФИ № 06-04-48326.

**СТРЕСС-УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ:  
СВЕТОЗАВИСИМОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ УГЛЕРОДНОГО МЕТАБОЛИЗМА  
ВНУТРИ БИФОКАЛЬНОГО ЛИСТА**

**Stress tolerance in plants: light dependent pattern  
of carbon metabolism within bifacial leaf**

R.Y. Biel<sup>1, 2</sup>, I.R. Fomina<sup>1</sup>, G.N. Nazarova<sup>1</sup>, V.G. Soukhovolsky<sup>3</sup>,  
R.G. Khlebopros<sup>4</sup>, J.N. Nishio<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Institute of Basic Biological Problems RAS, Pushchino  
E-mail: [karlbiel@isp.com](mailto:karlbiel@isp.com); [irafomi@rambler.ru](mailto:irafomi@rambler.ru)

<sup>2</sup> Biosphere Systems International, Tucson, Sonora

<sup>3</sup> Institute of Forest SB RAS, Krasnoyarsk

<sup>4</sup> Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk

<sup>5</sup> College of Natural Science, California State University, Chico

The role of light in determining the profile of Rubisco, glutamate oxaloacetate transaminase, catalase (GOT), fumarase and cytochrome-c-oxidase across spinach leaves was examined in leaves exposed to full illumination by adaxial or abaxial surface. Oxygen evolution in fresh paradermal leaf sections and CO<sub>2</sub> gas exchange in whole leaves under adaxial or abaxial illumination was also examined.

**Cross-sections** of spinach leaves exhibited typical mesophytic leaf

architecture. The palisade mesophyll consisted of two layers of cylindrical cells with the long axis perpendicular to the leaf surface. Underlying the palisade mesophyll was a typical spongy mesophyll with the vascular tissue intercalated between the palisade mesophyll and spongy mesophyll. Non-chlorophyll containing upper and lower epidermis (except for guard cells) encases the mesophyll. Compared to control leaves, we could detect no anatomical differences in leaves inverted for 15 days, either in cross- or in paradermal leaf sections. **Rubisco activity** in control leaves on an areal basis doubled from the top of the leaf to the maximum activity approximately 200  $\mu\text{m}$  deep. Twelve to twenty one days after leaf inversion, the maximum Rubisco activity shifted to approximately 200  $\mu\text{m}$  from the bottom of the leaf. The soluble protein strongly correlated with Rubisco activity in both leaf types. In contrast, the specific activity of Rubisco was constant across both control and inverted leaves. **The GOT activity** profile across control leaves on an areal or volume basis essentially mimicked that of Rubisco activity. Ten to fifteen days after leaf inversion, the maximum GOT activity was about 280  $\mu\text{m}$  from the leaf bottom compared to 200  $\mu\text{m}$  for Rubisco activity. The soluble protein profiles reversed after inversion and were similar to the Rubisco experiment. **Catalase activity** in control leaves was highest at the top of the leaf, and decreased exponentially toward the bottom of the leaf. Three to eight days after leaf inversion, the maximum catalase activity shifted to the bottom of the leaf. **NADP-MDH activity** was relatively flat across control leaves, with an apparent maximum in the region of the vascular bundles, between 300 and 400  $\mu\text{m}$  deep within the leaf. **NAD-MDH activity** clearly exhibited a peak in the region of the vascular tissue. MDH activity was not measured in inverted leaves. **Fumarase and cytochrome-c-oxidase activities** were higher in spongy mesophyll as compared to palisade mesophyll. Inverting of the leaf did not alter the profile of these enzymes. **Photosynthetic CO<sub>2</sub> gas exchange** in the control spinach leaves was higher when the adaxial surface was illuminated, as compared to illumination of the abaxial surface. During 2-week experiments, inverting leaves caused the CO<sub>2</sub> gas exchange rate during illumination of the original adaxial leaf surface of inverted leaves to decrease. In contrast, the CO<sub>2</sub> gas exchange rate increased from the control, when the original abaxial leaf surface of inverted leaves was illuminated. CO<sub>2</sub> gas exchange, when the inverted leaf was illuminated on the original adaxial leaf surface, dramatically decreased in the first 30 min. At the same time CO<sub>2</sub> gas exchange, in inverted leaves illuminated on the original abaxial surface, started to increase only after a few days and never reached the level of gas exchange in leaves irradiated on the adaxial leaf surface of control leaves. During the course of our



experiments, we observed a very important phenomenon – in spinach the palisade mesophyll is responsible for the midday depression in photosynthesis.  $\text{CO}_2$  gas exchange in control leaves illuminated on the adaxial leaf surface exhibited a midday depression. However, the same leaves did not exhibit a midday depression when  $\text{CO}_2$  gas exchange was measured when leaves were illuminated on the abaxial leaf surface. Maximum  $\text{HCO}_3^-$ -dependent  $\text{O}_2$  evolution in leaf slices from the palisade mesophyll of control spinach leaves was more than double that in leaf slices from the spongy mesophyll. After 15-19 d of leaf inversion, leaf slice photosynthesis of both tissue types exhibited the same  $P_{\text{max}}$ . Maximum rate of  $\text{O}_2$  evolution in leaf slices from the palisade mesophyll decreased, whereas  $\text{O}_2$  evolution of spongy mesophyll leaf slices increased. Respiration rates were 35 % higher in the spongy mesophyll compared to the palisade mesophyll of inverted leaves and about 41 % higher in the control leaves. **The optimization model** of photosynthetic leaf was developed on the basis of the principle of maximal ecological utility. The modeling showed that the optimization of  $\text{CO}_2$  fixation within a bifacial mesophytic leaf of a  $\text{C}_3$  plant conforms to the rule of maximal ecological utility when only the simple factors of maximization light energy utilization and minimization of photodestruction are applied. Curves generated by the model showed a good correlation with experimental profiles of carbon fixation in spinach leaf under different light conditions as well with the profiles of Rubisco activity in control and inverted spinach leaves.

A hypothesis about light regulation of carbon metabolism across leaves is discussed.

#### СПЕКТРАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА В ПЕРИОД ИНДУКЦИИ ФОТОСИНТЕЗА

#### Changes in the spectrum of chlorophyll fluorescence during the induction period of photosynthesis

О.Д. Быков, Б.А. Борисов

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург

E-mail: [obykov@OB2955.spb.edu](mailto:obykov@OB2955.spb.edu)

В начале 1930-х гг. Х. Каутский и А. Хирш показали, что интенсивность флуоресценции хлорофилла (ФХ) у предварительно адаптированного к темноте листа после включения света сначала резко возрастает, затем постепенно снижается. Это явление, названное «индукцией ФХ», или «эффектом Каутского», было и

остаётся предметом многочисленных исследований в связи с большими информационными возможностями, которые открылись при его изучении. В данной работе рассмотрен вопрос о кинетике медленной фазы эффекта Каутского – той фазы, когда ФХ, завершив быстрый подъём и достигнув максимума, снижается до некоторых постоянных значений.

Опыты проводили на отделенных листьях акации (*Acacia sp.*), предварительно адаптированных к темноте. Материал собирали за 1-2 ч до начала опытов и сохраняли в темноте во влажной камере при температуре 20-25 °С. Спектры ФХ возбуждали светодиодом марки ETG-5UV400-15 с максимумом излучения при 407 нм (СД-407) и регистрировали с помощью электронного спектрометра S2000 фирмы Ocean Optics, соединенного с персональным компьютером.

Для изучения кинетики индукции ФХ спектры регистрировали через определенные интервалы времени (0-1, 10, 20, 30, ... 180 с) после включения СД-407. Спектральные кривые ФХ анализировали, строя зависимость интенсивности флуоресценции при определенных длинах волн от времени с момента возбуждения ФХ, определяя функциональный характер этой зависимости и величину соответствующих параметров.

На основании анализа экспериментальных данных были получены следующие результаты:

1) эффект Каутского в медленной фазе индукции выражался в виде «сжатия» спектра ФХ по интенсивности излучения с экспоненциальным приближением его к стационарному состоянию с постоянной времени ( $\tau$ ) 10-20 с. Функции, описывающие медленную фазу эффекта Каутского, имели следующий вид:

$$A_t = A_s + (A_0 - A_s) \exp(-t/\tau), \quad (1)$$

$$B_t = B_s + (B_0 - B_s) \exp(-t/\tau), \quad (2)$$

где –  $A_t$  и  $B_t$  – интенсивность ФХ при 685 нм и 735 нм соответственно в момент времени  $t$ ;  $A_0$  и  $B_0$  – интенсивность ФХ в момент завершения быстрой фазы и начальный момент времени медленной фазы индукции ( $t = 0-1$  с);  $A_s$  и  $B_s$  – стационарные значения (steady state) ФХ;

2) к моменту установления стационарного спектра ФХ поступление энергии на верхний синглетный уровень хлорофилла при 685 нм было в полтора раза больше, чем при 735 нм. Этот вывод являлся отражением экспериментальных данных, согласно которым отношение  $A_s/B_s = 1.47 \pm 0.03$ .

3) энергия, расходуемая на фотохимические процессы фотосинтеза  $P_{At}$  и  $P_{Bt}$  и определяемая разностью между максимальным значением ФХ при данной длине волны и текущей величиной ФХ, зависит от длины волны и момента времени индукционного периода ( $t$ ) и может быть выражена следующими уравнениями:

$$P_{At} = (A_0 - A_s) (1 - \exp(-t/\tau)), \quad (3)$$

$$P_{Bt} = (B_0 - B_s) (1 - \exp(-t/\tau)). \quad (4)$$

Как следствие этого, 4) соотношение энергии, расходуемой на фотохимические процессы фотосинтеза и на ФХ, зависит от длины волны и момента времени индукционного периода. В стационарном состоянии ФХ при 685 нм в наших опытах оно было равно 5.9, при 735 нм – 3.4.

### ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ДЫХАНИЯ РАННЕВЕСЕННИХ ЭФЕМЕРОИДОВ В ПЕРИОД ИХ АКТИВНОГО РОСТА И СТАРЕНИЯ

#### Temperature dependance of respiration of early spring ephemerals during their active growth and growing old

О.Д. Быков

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург  
E-mail: [obykov@OB2955.spb.edu](mailto:obykov@OB2955.spb.edu)

Информация о температурной зависимости дыхания (ТЗД) ранневесенних эфемероидов скудна и отрывочна. Систематические исследования в этой области отсутствуют. Между тем, данные о ТЗД ранневесенних эфемероидов представляют несомненный интерес в силу того, что период вегетации этих растений короток и происходит на фоне существенных температурных и световых перепадов. Он сопровождается значительными изменениями физиологических, анатомических и цитологических характеристик растений. Очевидно, это требует напряжения энергетического обмена и, следовательно, высокого уровня фотосинтеза, дыхания, транспорта веществ.

В данной работе стояла задача выяснить общие черты и видовые особенности ТЗД листьев ранневесенних эфемероидов в период их активного роста и старения. Опыты проводили на растениях, произрастающих на территории Ботанического сада г. Санкт-Петербург. Для определения ТЗД применяли методику и аппаратуру, основанную на регистрации дыхания по выделению  $CO_2$  при непрерывно повышающейся температуре в заданном диапазоне температур. Особенности изменения ТЗД в период вегетации растений изучали путем сравнительного анализа количественных параметров ТЗД. Таким же путем решали вопрос об общности и возможных генотипических различиях ТЗД объектов исследования.

Опыты проводили на трех ранневесенних эфемероидах: пролески сибирской (*Scilla sibirica* Haw.), хионодоксы люцилии (*Chionodoxa luciliae* Boiss.) и чистяка весеннего (*Ficaria verna* Huds.).

В Санкт-Петербурге и в Ленинградской области растения появляются из-под снега в первой-второй декаде апреля, быстро растут и завершают свой вегетационный период во второй-третьей декаде мая.

В лабораторных условиях была прослежена динамика ТЗД в период вегетации растений. Максимальные величины дыхания у всех объектов исследования наблюдались у первых интенсивно растущих листьев, средние величины – в фазу цветения растений, когда листья приближались к завершению роста, минимальные – в фазу плодоношения, когда листья постепенно отмирали. Так, например, у *Scilla sibirica* дыхание при 20 °С 12, 18, 26 апреля и 6 мая характеризовалось величинами – 3.4, 3.0, 2.5 и 1.8 мг СО<sub>2</sub> г<sup>-1</sup> сух. массы ч<sup>-1</sup> соответственно. Сходная картина ослабления дыхания на 30-40 % по сравнению с первоначальными величинами наблюдалась и у белой и бело-желтой частей листьев, находившихся в период сбора материала под снегом и/или в земле. В меньшей мере во время вегетации растений происходило изменение формы ТЗД, что выражалось в относительном постоянстве величин дыхания в процентном выражении от максимальной величины для данной температурной зависимости. Сравнение формы ТЗД зеленой и белой части листа позволило установить существенные различия между ними. Для зеленой части листа был характерен максимум дыхания в районе 55 °С; для белой части он был выражен слабее и по величине мало отличался от дыхания при 40 °С.

Видовая принадлежность растений определенным образом сказалась на количественных показателях и форме кривой ТЗД. Это выразилось в различиях как абсолютных, так и относительных величин дыхания, а также показателей их изменения с температурой – температурного коэффициента  $Q_{10}$  и энергии активации.

Расчет энергии активации дыхания  $E$  в диапазоне температур 20-65 °С выявил его непостоянство и зависимость от выбранного интервала температур. Видовые различия в величине  $E$  сильнее всего проявлялись на участке начального температурного роста дыхания (интервал 20-30 °С); в широком интервале температур (20-50 °С) они были менее заметны. Так, например, в начале вегетационного периода растений энергия активации дыхания по СО<sub>2</sub> в интервале 20-30 °С составляла для пролески сибирской, хионодоксы люцилии и чистяка весеннего округленно до целого 13, 8 и 11 ккал моль<sup>-1</sup>град<sup>-1</sup> соответственно, в конце вегетации – 5, 7 и 9 ккал моль<sup>-1</sup>град<sup>-1</sup>. В сравнении с этими цифрами энергия активации дыхания в интервале 20-50 °С в начале вегетации была соответственно 8, 8 и 6 ккал моль<sup>-1</sup>град<sup>-1</sup>, в конце вегетации растений – 8, 8 и 8 ккал моль<sup>-1</sup>град<sup>-1</sup>.

Настоящая работа частично была поддержана грантом Научной программы Санкт-Петербургского научного центра РАН 2006 г.

**СИМБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА Tn5-МУТАНТОВ  
BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM 646****Symbiotic properties of Tn5-mutants of *Bradyrhizobium japonicum* 646**

V.M. Vasyliuk, S.M. Malichenko, V.K. Datsenko, S.Ya. Kots  
Institute of Plant Physiology and Genetics,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev  
E-mail: vasyliukv@mail.ru

The method of transposon mutagenesis was used for selection of the nodule bacteria with different effectiveness. This method is based on the possibility of transposons to build into the gene, inactivate it and cause single genetic changes. The symbiotic properties of the system created by soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) and fifty Tn5-mutants of *Bradyrhizobium japonicum* 646 were studied in pot and field experiments. The nitrogen fixing activity was increased by inoculation with two Tn5-mutants (21-2 and 9-1) in comparison with control strain *B. japonicum* 646. Inoculation of plants by 21-2 and 17-2 Tn5-mutants enhanced grain yield on 16.6 % and 14.36 % respectively. Some transposants (107 and 113) had high virulence, but they had lowest nitrogen fixing activity. Inoculation of soybean Tn5-mutants 107 and 113 decreased yield on 17.2 % and 61.9 % in comparison with standard strain *B. japonicum* 634b.

All investigated Tn5-mutants differenced on symbiotic properties. They will be used in the study of their role in the soybean physiological processes and symbiosis with Tn5-mutants.

**ДВИЖУЩИЕ СИЛЫ ТРАНСПОРТА ВЕЩЕСТВ ПО ПЛАЗМОДЕСМАМ  
В ПРОЦЕССЕ ЗАГРУЗКИ ФЛОЭМЫ  
У ДВУХ ВИДОВ СЕМ. SCROPHULARIACEAE****Phloem loading and driving forces for symplastic flow via plasmodesmata  
as studied in two Scrophulariaceae species**

О.В. Войцеховская<sup>1, 2</sup>, О. Koroleva<sup>3</sup>, Д.Р. Баташев<sup>2</sup>, С. Кноп<sup>1</sup>, D. Tomos<sup>3</sup>,  
Ю.В. Гамалей<sup>2</sup>, Н.-W. Heldt<sup>1</sup>, G. Lohaus<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University of Goettingen, Goettingen

<sup>2</sup> Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург

<sup>3</sup> Bangor University, Bangor

Загрузка флоэмы предполагает перенос сахаров из мест с их низкой концентрацией – клеток мезофилла – в транспортное русло флоэмы, где концентрации сахаров максимально высоки. У симпластной группы растений клетки мезофилла и флоэмы соединены

плазмодесмами (Гамалей, 1990), и можно было бы ожидать выравнивания концентраций метаболитов во флоэме и мезофилле. Однако этого не происходит. До настоящего времени общепринятой моделью, описывающей симпластную загрузку флоэмы, была модель «полимеризационной ловушки» (Turgeon, 1996). Согласно этой модели, процесс загрузки флоэмы сахарами у симпластных растений основан на диффузии сахарозы по плазмодесмам из цитоплазмы клеток мезофилла в клетки флоэмы по градиенту концентрации. В клетках флоэмы сахароза подвергается галактозилированию, в результате чего синтезируются другие транспортные формы углеводов – три- и тетрасахариды рафинозного ряда. Их размер превышает размер молекулы сахарозы, и поэтому, согласно модели, рафинозные олигосахариды не могут диффундировать по плазмодесмам в мезофилл. В результате расходования сахарозы во время синтеза рафинозных олигосахаридов должен создаваться концентрационный градиент, обеспечивающий перемещение сахарозы из мезофилла, где она образуется в ходе фотосинтеза, во флоэму путем диффузии.

Для проверки модели требовалось оценить концентрации сахаров во флоэме и в субклеточных компартментах клеток мезофилла листа симпластных растений. Для этого был использован метод неводного фракционирования растительных клеток. Кроме того, применение комплекса экспериментальных методик (анализ флоэмного эксудата с помощью лазерной стилектомии тлей; измерение концентраций метаболитов в отдельных клетках листа методом single cell sampling; измерение осмотического потенциала отдельных клеток листа методом пиколитровой осмометрии; трансмиссионная электронная микроскопия) позволило получить данные о концентрационных и осмотических градиентах для тканей и субклеточных компартментов листьев исследованных нами двух видов сем. Scrophulariaceae с различной структурой клетко-спутников – *Alonsoa meridionalis* и *Asarina barclaiana*. У *A. meridionalis* клетки-спутники флоэмных окончаний представлены типом «промежуточные клетки» (intermediary cells). Эти клетки обладают многочисленными плазмодесмами, объединенными в плазмодесменные поля, которые соединяют их с прилежащими клетками мезофилла. Во флоэмных окончаниях *A. barclaiana* имеется два структурных типа клеток-спутников: «модифицированные промежуточные клетки» (modified intermediary cells) и «передаточные клетки» (transfer cells). Первый тип характеризуется наличием небольших плазмодесменных полей, а также немногочисленных протуберанцев клеточной оболочки, что увеличивает поверхность контакта клеток с апопластом. В клетках второго типа плазмодесмы практически отсутствуют, но протуберанцы клеточной оболочки сильно развиты.

Полученные данные показали, что в двух изученных растении-

ях концентрация сахарозы во флоэме выше, чем в мезофилле, и, таким образом, предсказанная в модели полимеризационной ловушки диффузия сахарозы из мезофилла во флоэму не может иметь место (Voitsekhovskaja et al., 2006). Нами предложена иная модель загрузки флоэмы по симпласту, согласно которой движущей силой для симпластного переноса веществ между флоэмой и мезофиллом может быть градиент водного потенциала между этими тканями, а механизм переноса – не диффузия, а массовый ток. Регулятором открытия и закрытия плазмодесм выступает тургорная компонента водного потенциала. Это согласуется с имеющимися в литературе данными о регуляции открывания и закрывания плазмодесм градиентами тургорного давления в соединенных плазмодесмами компартментах (Orarka and Prior, 1992). Предложенная модель нуждается в дальнейшем уточнении, однако она является существенным шагом в понимании того, как осуществляется процесс загрузки флоэмы ассимилятами у симпластных растений, а также механизмов межклеточного обмена молекулами через природные наноструктуры, которыми являются плазмодесмы растительных клеток.

**ИОНООБМЕННЫЕ СВОЙСТВА  
КЛЕТОЧНЫХ СТенок ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ *BETULA PENDULA* ROTH**

**Ion exchange properties of *Betula pendula* roth  
different tissues cell walls**

Н.А. Галибина<sup>1</sup>, Е.Н. Теребова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт леса Карельского НЦ РАН, г. Петрозаводск  
E-mail: [ngalibina@sampo.ru](mailto:ngalibina@sampo.ru)

<sup>2</sup> Петрозаводский государственный университет, г. Петрозаводск

В работе методом потенциометрического анализа изучены набухание и ионообменные свойства клеточных стенок тканей ствола *Betula pendula* Roth. Проанализированы феллодерма, каменистые клетки, луб, древесина карельской березы (*Betula pendula* var. *carelica*) и обычной березы повислой (*Betula pendula* var. *pendula*). Физико-химические свойства клеточных стенок обсуждаются в совокупности с данными об анатомическом строении тканей.

В зависимости от функциональной специализации клеток структура клеточной оболочки, а следовательно, и ее способность к набуханию изменяются. В лубе коэффициент набухания ( $K_{\text{наб}}$ ) клеточных стенок был наибольшим и менялся в диапазоне рН 2-12 от 1.2 до 7.6 гН<sub>2</sub>О/гDW<sub>св</sub> (г воды на г сухой массы клеточных стенок) у карельской и от 1.7 до 10.5 гН<sub>2</sub>О/гDW<sub>св</sub> у повислой березы.

Значение  $K$  наб. для клеточных стенок феллодермы составило 1.3-4.6 гН<sub>2</sub>О/гDW<sub>sw</sub> и 1.7-3.5 гН<sub>2</sub>О/гDW<sub>sw</sub> для карельской и повислой берез соответственно. В древесине *Betula pendula* var. *carelica* и *Betula pendula* var. *pendula*  $K$  наб. практически не изменялся в диапазоне рН 2-12. Максимальное его значение для карельской березы составило 1.2 гН<sub>2</sub>О/гDW<sub>sw</sub>, что почти в два раза меньше чем у повислой. Набухание клеточных стенок определяет их гидравлическую проводимость. В зависимости от степени одревеснения клеточных стенок они могут или полностью исключаться из транспорта веществ или частично участвовать в данном процессе. Особенно актуальна эта проблема для древесины карельской березы, в которой, в отличие от обычной березы повислой, сильно уменьшено число высокоспециализированных проводящих элементов – сосудов ксилемы. Более того, эти сосуды намного меньшего диаметра и длины, по сравнению с нормой, и, как и прочие структурные элементы узорчатой древесины, имеют свилеватое строение.

Набухание клеточных стенок тесно связано с их ионообменными свойствами. Получено, что ионообменные свойства клеточных стенок всех изученных тканей определяются наличием в их составе четырех типов функциональных групп, для каждой из которых рассчитаны значения констант ионизации ( $pK_a$ ). Это анионообменные амидные группы ( $pK_a = 3,1 \pm 0,4$ ) и три катионообменные группы:  $\alpha$ -D-полигалактуронозой кислоты ( $pK_a = 4.6 \pm 0.3$ ), карбоксильные группы, не относящиеся к  $\alpha$ -D-полигалактуронозой кислоте ( $pK_a = 7.7 \pm 0.2$ ), и фенольные группы ( $pK_a = 9.6 \pm 0.2$ ). Показано, что наибольшее суммарное содержание функциональных групп в структуре клеточных стенок характерно для луба и феллодермы обеих форм берез. В лубе это увеличение обусловлено карбоксильными и фенольными группами. В клеточной стенке луба повислой березы отмечено большее количество фенольных групп, по сравнению с карельской. Древесина *Betula pendula* Roth. отличается от остальных тканей меньшим количеством ионообменных групп в клеточных стенках, при этом у повислой березы, по сравнению с карельской, их значение в полтора раза меньше. При физиологических условиях (рН 5.0-8.0) фенольные группы не принимают участия в ионообменных реакциях, они всегда закрыты. Именно увеличение карбоксильных групп способствует возрастанию ионообменной способности клеточной стенки. Данные об общем содержании фенольных групп вместе с данными об элементном составе клеточных стенок позволяют количественно оценить степень лигнификации клеточных оболочек и сделать вывод об ее изменении, как у разных тканей, так и у разных форм растений.

Высказана гипотеза, что изменения структуры и химического состава клеточных стенок, обусловленные движением метаболитов, воды, ионов, влияют на характеристики клеточных стенок



древесины и коры, в частности, на их участие в процессах транспорта.

## ФОРМИРОВАНИЕ ВТОРИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК

### Secondary cell wall formation

Т.А. Горшкова

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань  
E-mail: [gorshkova@mail.knc.ru](mailto:gorshkova@mail.knc.ru)

Каждый из примерно 40 типов клеток, известных у растений, может быть идентифицирован по специфическим характеристикам клеточной стенки, что подчеркивает важность этого компартмента для функционирования клетки. Тем не менее, отношение к клеточной стенке как к «деревянному ящику» просуществовало достаточно долго. Подобные представления, которые, конечно, затормозили исследование растительной клеточной стенки, усугубляются методическими сложностями ее изучения. Даже выделение и анализ компонентов клеточной стенки требуют методов, более изощренных, чем при анализе других биополимеров, поскольку и полисахариды, и лигнин отличаются особым разнообразием типов связей и замысловатостью строения. Еще сложнее ситуация с изучением синтеза полисахаридов и формированием надмолекулярной структуры клеточной стенки. Среди подходов, которые могут быть использованы при изучении этих процессов, – сопоставление биогенеза клеточных стенок с кардинально отличными характеристиками; к их числу относятся два типа вторичных клеточных стенок.

Наиболее известный тип вторичной клеточной стенки построен из трех основных полимеров: целлюлозы, ксилана и лигнина, присутствующих примерно в равной пропорции. Толщина этих стенок 2-4 мкм, в то время как у первичных стенок – 0.1-0.4. Микрофибриллы целлюлозы расположены по спирали, так что каждый последующий слой находится под углом к предыдущему. Однокоренные слова – ксилема и ксилан – дают представление о том, в каких тканях распространена такая клеточная стенка. Именно клеточные стенки подобного типа составляют основную массу древесины.

Между тем существует совершенно иной тип вторичной клеточной стенки, который резко отличается от первого по составу и расположению микрофибрилл. Ксилан и лигнин практически полностью отсутствуют (последний может появляться на поздних стадиях развития клетки и в незначительных количествах). Доля

целлюлозы составляет до 85 % от сухой массы клеточной стенки. Полисахариды матрикса представлены пектиновыми веществами, глюкоманнаном и, возможно, ксилоглюканом. Особую роль в формировании надмолекулярной структуры играют галактозосодержащие полимеры, в первую очередь галактан и арабиногалактановые белки. Клеточная стенка такого типа достигает исключительной толщины – до 10 мкм, при этом все микрофибриллы целлюлозы основного слоя (S2) расположены почти параллельно продольной оси клетки. Присутствует данная клеточная стенка в так называемых «желатинозных волокнах», которые характерны для лубо-волоконистых культур и древесины напряжения.

Исследование формирования клеточных стенок желатинозного типа проведено нами с использованием комплекса подходов, включая анализ ультраструктуры (в том числе с использованием методов иммуноцитохимии), динамики формирования и постсинтетической модификации клеточной стенки в pulse-chase экспериментах с интактными растениями, изучение структуры тканеспецифичных полимеров клеточной стенки с использованием ЯМР, MALDI TOF MS и специфичных гликаназ, а также экспрессии генов в экспериментах на основе микрочипов ДНК.

Сопоставление биогенеза вторичных клеточных стенок различных типов будет проведено в докладе с обсуждением процессов, обеспечивающих смену типа формируемой клеточной стенки (с первичной на вторичную или с ксилановой на галактановую), роли полисахаридов матрикса в образовании и ориентации микрофибрилл целлюлозы, постсинтетических модификаций полимеров и характере взаимодействия индивидуальных компонентов при формировании надмолекулярной структуры клеточной стенки.

**РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ НЕФОСФОРИЛИРУЮЩИХ  
ПУТЕЙ ТРАНСПОРТА ЭЛЕКТРОНОВ В АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ  
К СТРЕССОВЫМ ФАКТОРАМ**

**The role of mitochondrial non-phosphorylative pathways  
of electron transport in plant adaptation to stress factors**

**О.И. Грабельных, Т.П. Побежимова, А.В. Колесниченко, В.К. Войников**  
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск  
E-mail: [grolga@sifibr.irk.ru](mailto:grolga@sifibr.irk.ru)

Энергообеспеченность и устойчивость растительных клеток к действию различных стрессовых факторов в значительной степени зависят от адаптивных особенностей процесса дыхания. Повыше-

ние интенсивности дыхания рассматривается как адаптивное действие при условии, что оно не слишком значительно, в противном случае активизация дыхания в клетке сопровождается увеличением образования активных форм кислорода (АФК), которые вызывают различные повреждения и апоптоз. Одним из механизмов снижения образования АФК в условиях стресса является активация нефосфорилирующих путей транспорта электронов по дыхательной цепи митохондрий, таких как альтернативная цианид-резистентная оксидаза (АО), растительные разобщающие белки PUMP и БХШ 310 и ротенон-нечувствительные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы. В настоящей работе нами проведен сравнительный анализ участия нефосфорилирующих путей транспорта электронов при функционировании митохондрий злаков (озимой пшеницы, кукурузы, пырейника сибирского) и двудольных растений (гороха, люцерны, редьки масличной), изолированных из проростков, подвергнутых действию низкотемпературного и окислительного стрессов.

Показано, что вклад различных путей переноса электронов в дыхание митохондрий, изолированных из проростков изученных растений, в значительной степени зависит от окисляемого субстрата. Выявлено, что в дыхание митохондрий злаков, изолированных из проростков, не подвергнутых стрессовым воздействиям, в большей степени вносит вклад цитохромный путь (ЦП) транспорта электронов (независимо от субстрата окисления), в то время как в дыхание митохондрий двудольных растений – АО. Однако следует отметить, что если значительную активность АО в митохондриях гороха наблюдали при окислении всех субстратов, то в митохондриях люцерны и редьки масличной – только при окислении сукцината. Как оказалось, отличие в активности АО между митохондриями злаков и двудольных в дальнейшем влияет на их реакцию на стрессовое воздействие. Так, кратковременное (холодовой шок) и длительное (закаливание) холодное воздействие вызывало в митохондриях озимой пшеницы, кукурузы и пырейника сибирского увеличение вклада в дыхание АО. Это изменение в митохондриях озимой пшеницы проявлялось при окислении малата и сукцината, тогда как в митохондриях пырейника сибирского – при окислении малата и НАДН. В митохондриях кукурузы увеличение вклада АО под действием холодного шока и закаливания было отмечено при окислении всех изученных субстратов. В отличие от митохондрий злаков, в митохондриях гороха не обнаружено увеличения вклада АО после действия на проростки холодного шока и закаливания. Аналогичную ситуацию наблюдали и в митохондриях редьки масличной и люцерны, окисляю-

щих сукцинат, хотя при окислении малата митохондриями этих культур, наоборот, происходила активация транспорта электронов через АО. Повышение содержания в митохондриях люцерны при холодовом шоке и закаливании разобщающего белка РUMP, возможно, объясняет увеличение транспорта электронов через ЦП при окислении сукцината. В митохондриях злаков при окислении ими малата действует путь транспорта электронов, связанный с функционированием разобщающего белка БХШ 310, активность которого отсутствует в митохондриях двудольных растений. Холодовой шок приводил к усилению вклада БХШ 310 в дыхание митохондрий озимой пшеницы и пырейника сибирского, тогда как закаливание снижало его вклад у пшеницы и оставляло неизменным у пырейника сибирского. В митохондриях кукурузы вклад БХШ 310 как при стрессе, так и при закаливании снижался. Обнаружено ротенон-нечувствительное дыхание в митохондриях всех изученных растений, однако, как оказалось, увеличения его вклада в общее дыхание под действием стрессовых факторов не происходило. Окислительный стресс приводил к значительному повышению в митохондриях озимой пшеницы и кукурузы активности АО как при окислении малата, так и сукцината, а в митохондриях пырейника сибирского возрастание активности АО было обнаружено только при окислении сукцината.

Таким образом, нами обнаружены различия в активности альтернативной оксидазы и разобщающих белков в митохондриях злаков и двудольных растений. Поскольку известно, что функциями данных систем являются термогенез, регуляция образования АФК и регуляция энергетического и метаболического баланса, то можно заключить, что увеличение в стрессовых условиях транспорта электронов через альтернативную оксидазу и разобщающие белки может выступать одним из компонентов механизма адаптации растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-4812.2006.4), гранта РФФИ (№ 05-04-97231\_r\_байкал\_a) и Фонда содействия отечественной науке.

**ВНЕКОРНЕВАЯ ПОДКОРМКА ЛЮПИНА И РАПСА  
КОМПЛЕКСНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ ЦИНКА И МАРГАНЦА  
СНИЖАЕТ НАКОПЛЕНИЕ РАДИОНУКЛИДОВ В РАСТЕНИЯХ  
И ПОВЫШАЕТ ИХ ПРОДУКТИВНОСТЬ**

**Foliar top dressing of lupine and rape by complex compounds  
of zinc and manganese decreases the accumulation of radionuclides  
in plants and raises its productivity**

**В.В. Груша, И.Н. Гудков**

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, г. Киев

E-mail: [viktor\\_grush@mail.ru](mailto:viktor_grush@mail.ru)

Национальный аграрный университет, г. Киев

E-mail: [ingudkov@i.com.ua](mailto:ingudkov@i.com.ua)

Одним из наиболее эффективных приемов в практике земледелия, применяемых для снижения уровня радионуклидного загрязнения продукции растениеводства, является использование удобрений, в частности, повышенных доз фосфорных и калийных, основные элементы которых блокируют поступление в растения соответственно  $^{90}\text{Sr}$  и  $^{137}\text{Cs}$ .

Нами было показано, что в условиях Украинского Полесья на бедных практически на все макро- и микроэлементы почвах, в наибольшей степени подвергшихся радионуклидному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС в 1986 г., дополнительным приемом, который может снизить поступление в растения этих радионуклидов, является внесение микроэлементов, из которых наиболее эффективными оказались цинк и марганец. Микроэлементы, с одной стороны, могут непосредственно выступать в качестве антагонистов-блокаторов поступления радионуклидов, а с другой – синергистов упомянутых макроэлементов фосфора и калия, которые препятствуют их переходу из почвы в растения.

Было также установлено, что внекорневая подкормка этими микроэлементами не только уменьшает поступление в растения радионуклидов не в меньшей степени, чем при внесении в почву, но и позволяет применять соли в значительно меньших количествах, упрощая при этом технологию их применения. С целью повысить эффективность солей была предпринята попытка исследовать их действие в составе комплексных соединений.

Микроэлементы использовали в виде водных растворов их сернокислых солей, а также монокомплексонатов (хелатов) этих микроэлементов и их совместного гетерокомплексоната на основе комплексона (хелатора) этилендиаминдиантарной кислоты (ЭДДЯ). Состав монокомплексонатов –  $\text{K}_2\text{Zn}(\text{Mn})\text{edds}\cdot\text{H}_2\text{O}$  и гетерокомплексон-

ната –  $K_4[ZnMn(edds)_2 \cdot H_2O] \cdot H_2O$  при содержании каждого из вышеупомянутых металлов приблизительно по 8 %.

В полевых опытах, проведенных на загрязненных радионуклидами дерново-подзолистых почвах Житомирской области, было показано, что внекорневая подкормка растений люпина и рапса водными растворами сернокислых солей цинка (200 г/га) и марганца (300 г/га) снижает накопление  $^{137}Cs$  и  $^{90}Sr$  в соломе и семенах в 1.5-2 раза, а также положительно влияет на урожай и качество кормовой массы растений, повышая при этом содержание отдельных макроэлементов, микроэлементов, протеина, жира, клетчатки, сахаров. Монокомплексонаты цинка и марганца, а также их гетерокомплексонат в значительно большей степени уменьшают накопление в растениях радионуклидов и повышают их продуктивность. Наиболее высокую эффективность проявил гетерокомплексонат, при применении которого накопление радионуклидов снижалось в 2-2.5 раза. Показано, что внесение микроэлементов в форме комплексных соединений значительно эффективней, чем их применение в виде простых водных растворов. По всей вероятности, это обусловлено более полным проникновением микроэлементов в растения в составе комплексонатов, их более высокой подвижностью и лучшей доступностью к молекулярным структурам клетки.

#### АНАЛИЗ МЕТАБОЛИЗМА ИНДИВИДУАЛЬНОГО ПОЛИМЕРА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ: ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫЙ ГАЛАКТАН ВОЛОКОН ЛЬНА

##### The analysis of individual polymer cell wall metabolism: tissue specific galactan of linen fibers

О.П. Гурьянов, С.Б. Чемикосова, П.В. Микшина, Т.Е. Чернова, Т.А. Горшкова  
Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань  
E-mail: [gurjanov@mail.knc.ru](mailto:gurjanov@mail.knc.ru)

Растительная клеточная стенка – сложнейшая многокомпонентная система, выполняющая в растении многообразные функции. При исследовании метаболизма клеточных стенок достаточно трудно выделить какой-либо индивидуальный полисахарид этой многокомпонентной системы. Из-за сходства химических свойств различных полисахаридов и наличия разнообразных связей между полимерами непросто подобрать условия для количественного выделения индивидуальных соединений. Фракционирование клеточной стенки, как правило, приводит к получению сложной смеси полисахаридов. Выделение любого индивидуального полимера требует либо специфических ферментов (в которых могут присут-

ствовать примеси и/или побочные активности), либо многоступенчатого химического фракционирования в сочетании с методами характеристики полученных соединений.

Нами разработана совокупность подходов, позволяющих исследовать в интактном растении метаболизм индивидуального полимера клеточной стенки на всех ключевых стадиях: синтез в аппарате Гольджи, встраивание в клеточную стенку, постсинтетическая модификация. Эти подходы разработаны для галактана, синтезируемого в волокнах льна на стадии формирования клеточной стенки желатинозного типа. Среди особенностей этого полимера, которые сделали возможными изучение его метаболизма, можно выделить следующие. Галактан – тканеспецифичный (присущий только волокнам) полимер, что позволяет исследовать его метаболизм в стебле, не выделяя волокна. Он в значительных количествах накапливается в пузырьках аппарата Гольджи, имеющих необычную динамику «поведения», и может быть выделен до встраивания в клеточную стенку из буферрастворимой фракции при гомогенизации ткани. Галактан – высокомолекулярный полисахарид (MW 700-2000кДа) и хорошо отделяется от других полимеров при гель-фильтрации. Высокое соотношение галактозы к рамнозе и другие особенности состава и структуры, характерные для галактана, позволяют идентифицировать его после встраивания в клеточную стенку в различных ее фракциях.

Для изучения метаболизма тканеспецифичного галактана и определения его роли в формировании клеточной стенки желатинозного типа мы использовали совокупность подходов: определение его содержания в ходе онтогенеза растений, оценку вариабельности содержания и моносахаридного состава в различных условиях выращивания растений и у различных сортов льна, определение радиоактивности галактана в pulse-chase экспериментах с  $^{14}\text{CO}_2$ , изучение «поведения» специализированных пузырьков Гольджи с помощью методов электронной микроскопии, исследование содержания 1,4-связанной галактозы в клеточной стенке в процессе формирования волокон с использованием методов иммунохимии. Структуру полимера исследовали с использованием хорошо охарактеризованных ферментов, а также с помощью  $^{13}\text{C}$ - и  $^1\text{H}$ -ЯМР и масс-спектрометрии (MALDI – TOF).

Установлено, что остов полисахарида состоит из последовательно чередующихся мономеров галактуроновой кислоты и рамнозы ( $\rightarrow 4\text{GalA} \rightarrow 2\text{Rha1} \rightarrow$ )<sub>n</sub> и по своей структуре аналогичен остову I (RG-I). В рамнозе в положении 4 присоединяются различной длины боковые  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-галактозные цепи со степенью полимеризации до 28 и выше; часть из них имеет разветвления. Преобладание в полимере 1,4-связанной галактозы дает возможность узнавать галактан иммунохимическими методами, используя монокло-

нальные тела LM 5.

Полученные данные позволили определенно утверждать, что буферорастворимый тканеспецифичный галактан постепенно исчезает из буферорастворимой фракции и встраивается в клеточную стенку волокон, участвуя в формировании клеточной стенки желатинозного типа. В ходе встраивания в клеточную стенку галактан прочно связывается с целлюлозой и не извлекается даже сильными щелочными растворами. Нами был разработан метод полного разрушения клеточной стенки волокон и выделения прочносвязанных с целлюлозой матриксных полисахаридов. Метод основан на растворении и переосаждении целлюлозы в растворе диметилацетамида с последующим полным разрушением целлюлозы ферментом (целлюлазой) и выделении связанных с ней полисахаридов. Характеристика выделенного таким образом галактана свидетельствует, что буферорастворимый высокомолекулярный галактан после встраивания в клеточную стенку распадается на фрагменты с меньшей молекулярной массой и подвергается тримингованию за счет отщепления остатков галактозы из боковых цепочек. Роль этого полимера в формировании клеточной стенки желатинозного типа, возможно, заключается во взаимодействии с молекулами целлюлозы в ходе кристаллизации микрофибрилл и обеспечении особых условий микроокружения для их ориентации и плотной упаковки, что сопряжено с постсинтетической модификацией галактана.

**ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ  
ПРОНИКНОВЕНИЯ МИКРОСИМБИОНТОВ В КЛЕТКИ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ  
ПРИ КЛУБЕНЬКОВОМ И МИКОРИЗНОМ ЭНДОСИМБИОЗЕ**

**Cytological and molecular mechanisms  
of the microsymbionts internalization in cells of higher plants  
by nodule and mycorrhizal endosymbioses**

**К.Н. Демченко<sup>1</sup>, К. Pawlowski<sup>2</sup>, В. Hause<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург  
E-mail: *sardonio@yandex.ru*

<sup>2</sup> Department of Botany, Stockholm University, Stockholm

<sup>3</sup> Department of Secondary Metabolism, Institute of Plant Biochemistry,  
Halle/Saale

Изучены события, приводящие к проникновению бактериального микросимбионта из рода *Frankia* в растительную клетку при актиноризовом клубеньковом типе симбиоза на двух модельных растениях: *Datisca glomerata* и *Casuarina glauca*. Проведено сравне-



ние механизмов этих процессов с процессами колонизации ризобиальных клубеньков у *Medicago truncatula* и *Pisum sativum*, а также везикулярно-арбускулярной микоризой у *Lotus japonicus* и *Medicago truncatula*.

Исследовано участие белков цитоскелета в ходе проникновения микросимбионтов в клетки корней растений при колонизации ризобиальных и актиноризных клубеньков с различным типом инфицирования. Методами иммунофлуоресценции и иммунного мечения золотом на световом и электронно-микроскопическом уровнях показана ведущая роль элементов цитоскелета: тубулина, актина в поддержании структуры и направления роста инфекционной нити при актиноридном типе симбиоза.

Определена тканевая и субклеточная локализация ферментов пути синтеза активного стрессорного фактора — жасмоновой кислоты: алленоксидциклазы (АОС1) и липоксигеназы (LOX 13B) в корнях и ризобиальных клубеньках *Medicago truncatula*, а также в корнях и клубеньках при актиноридном симбиозе у *Datisca glomerata* и *Casuarina glauca*. Методами иммунофлуоресценции показано накопление АОС1 в строме пластид только в неинфицированных клетках клубеньков, а LOX в цитоплазме неинфицированных клеток клубеньков при аэропном типе выращивания растений.

Выявлено, что ферменты синтеза жасмоната расположены в различных частях клетки и разных тканях, что свидетельствует об активном транспорте субстратов между компартментами в пределах различных типов клеток, в частности инфицированных и неинфицированных. Доказана ключевая (барьерная) роль жасмоната в определении положения микросимбионта в тканях клубенька. Обсуждается роль питания растения в распределении синтеза жасмоната.

Методами конфокальной микроскопии проведено сравнительное изучение локализации белков цитоскелета (тубулин и актин) в микоризованных и немикоризованных культурах трансгенных по гену алленоксидциклазы (АОС1-sence, АОС1-RNAi и АОС1-пустой вектор) корней *Medicago truncatula* на различных этапах развития арбускул. Показано отсутствие связи специфического накопления жасмоновой кислоты в клетках, содержащих арбускулы с перераспределением компонентов цитоскелета в ходе развития арбускулы.

Обсуждается роль жасмоновой кислоты в определении способности клеток к колонизации микросимбионтом, ее возможная роль как стрессорного агента, а также роль элементов цитоскелета растительной клетки в начальных этапах внедрения симбиотических

филламентозных бактерий и грибов.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦНТП 2002-2006 гг., Немецкого исследовательского общества (DFG, Германия), программы СПб Научного центра РАН на 2006-2007 гг. и Фонда содействия отечественной науке.

### РОЛЬ ФОСФОЛИПАЗЫ Д В РЕАКЦИИ МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТОК РАСТЕНИЙ НА ИЗМЕНЕНИЕ НАПРАВЛЕНИЯ ВЕКТОРА ГРАВИТАЦИИ

#### The role of phospholipase D in the reaction of plant cell metabolism to changing of gravity vector

М.В. Деревянчук<sup>1</sup>, С.В. Кретинин<sup>1</sup>, Е.Л. Кордюм<sup>2</sup>, В.С. Кравец<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, г. Киев  
E-mail: *ksv@bpci.kiev.ua*

<sup>2</sup> Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, г. Киев

Фосфолипаза Д (ФЛД) играет существенную роль в передаче в клетках растений сигналов, индуцированных действием разнообразных стимулов среды. Для исследования возможного участия ФЛД в ответной реакции клеток coleoptилей проростков кукурузы на изменения направления вектора земной гравитации в растении вводился ингибитор синтеза фосфатидной кислоты раствор 1-бутанола (0.8 %), исследовали также действие его неактивного изомера 2-бутанола. После инкубации с бутанолом проростки кукурузы были сориентированы под углом 90° к направлению вектора гравитации. Через различные промежутки времени проводили измерения угла гравитропического изгиба побегов. Наблюдали его резкое уменьшение в присутствии 1-бутанола в сравнении с контролем. Влияние 2-бутанола на данный процесс не было статистически значимым.

Для исследования возможного участия ФЛД в механизме гравитропического ответа применили радиоактивное мечение фосфолипидов по фосфору, насыщая ткани растений <sup>33</sup>P-ортофосфатом (Amersham) с последующей экстракцией липидов, тонкослойной хроматографией и сцинтилляционным счетом включения <sup>33</sup>P в отдельные фосфолипиды. Установлено, что при изменении направления вектора гравитации в растениях происходили изменения уровня фосфолипидных компонентов – повышение уровня фосфатидилбутанола и фосфатидной кислоты. Данный факт свидетельствует об участии ФЛД в молекулярных механизмах передачи гравитационного сигнала.

Работа выполнена при поддержке грантов UNTC-NASA № 07(R)-2003 и НКАУ-N04/ІБ-2005.

**ВЛИЯНИЕ pH И СОЛЕЙ  
НА ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР ЦИАНОБАКТЕРИИ  
*RHABDODERMA LINEARE***

**Effect of pH and salts on the thermal stability  
of the *Rhabdoderma lineare* intracellular structures**

**В.С. Дзюбенко, И.П. Маслова, С.О. Астахов**

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: [Dzyubenko@ippas.ru](mailto:Dzyubenko@ippas.ru)

Методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии исследовали влияние pH и концентрации солей в среде на термоиндуцированные фазовые переходы в клетках суспензионной культуры реликтовой гало- и алкалофильной цианобактерии *Rhabdoderma lineare*. Показано, что при анализе в среде, по составу близкой к среде естественного обитания (многокомпонентная минеральная, высокая ионная сила, pH 9.5), на термограмме выявляется один резкий пик увеличения теплоемкости при  $t$  67 °C и два относительно небольших плеча – при  $t$  64 и 56 °C, отражающие фазовые переходы структур предположительно фотосинтетического аппарата цианобактерии. Уменьшение ионной силы среды ее последовательным разбавлением водой в два-три и пять раз без изменения pH приводит к смещению максимума основного пика теплоемкости экспоненциально с 67 до 58 °C. В средах, содержащих только KCl (100-200-500-1000 мМ, при pH 7.0) и 50 мМ фосфатного буфера (pH: 6.0-7.0-8.0-9.8 в присутствии 500 мМ KCl), происходит смещение максимума основного пика теплоемкости в высокотемпературную область (от 62.5 до 66.5 °C) при увеличении концентрации соли и в низкотемпературную (от 68 до 60.5 °C) – при увеличении pH среды. Заметных закономерностей изменения суммарной энтальпии структурных переходов не обнаружено. Полученные результаты свидетельствуют о роли электростатических взаимодействий в стабилизации структуры клеток цианобактерии. Увеличение плотности отрицательных зарядов снижает термостойкость структуры, что проявляется в уменьшении температуры фазового перехода по мере увеличения pH среды. Экранизация этих зарядов свободными катионами увеличивает термостабильность структуры, что проявляется в повышении температуры фазового перехода по мере возрастания концентрации соли в среде.

**К МЕТОДИКЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭНТАЛЬПИИ  
ТЕРМОИНДУЦИРОВАННЫХ СТРУКТУРНЫХ ПЕРЕХОДОВ  
В РАЗЛИЧНЫХ ПО ОРГАНИЗАЦИИ СИСТЕМАХ МЕТОДОМ ДСК**

**Measuring of thermoinduced structural transition enthalpy  
in differently organized systems using DSC method**

**В.С. Дзюбенко**

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: [Dzyubenko@ippas.ru](mailto:Dzyubenko@ippas.ru)

Количественное определение энтальпии термоиндуцированных структурных переходов отдельных компонентов системы методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) основано на вычислении на термограмме площади под пиками избыточной теплоемкости системы. Важнейшим моментом при расчетах является положение «базовой линии» термограммы, определяющей нижнюю границу пика. Поскольку термоиндуцированные структурные переходы большинства биологических систем в процессе анализа, как правило, необратимы, то для оценки характера базовой линии обычно используется термограмма, полученная после повторного сканирования анализируемого образца.

В работе сопоставлены особенности анализа термограмм растворов белков с анализом термограмм суспензии изолированных хлоропластов и клеток микроводорослей. На суспензии изолированных хлоропластов методом «дробного выжигания» показано, что при прогреве от 10 до 40-45 °С (ниже температуры начала денатурации белковых комплексов) по мере необратимого разрушения липидных структур теплоемкость суспензии постепенно снижается без изменения базовой линии. При температуре выше 40 °С начинают выявляться пики избыточной теплоемкости, отражающие затраты энергии на процессы разрушения белковых структур. Эти процессы сопровождаются постепенным подъемом базовой линии, связанным с эффектом более высокой теплоемкости денатурированных белков относительно теплоемкости нативных.

Кроме того, при анализе суспензии интактных клеток на этапе прогрева до 45 °С происходит увеличение пассивной проницаемости клеточных мембран с разрядкой трансмембранных градиентов ионов, которая сопровождается выделением энергии. На термограммах это имеет эффект резкого уменьшения теплоемкости. Учет перечисленных процессов может дать дополнительную информацию о системе и позволит корректно рассчитывать ее термодинамические параметры.

**ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ СТРУКТУРЫ  
СВЕТСОБИРАЮЩИХ КОМПЛЕКСОВ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*****The thermal stability of the structure  
of the *Chlamydomonas reinhardtii* light harvesting complexes****В.С. Дзюбенко, В.Г. Ладыгин<sup>1</sup>, И.Д. Шегай<sup>1</sup>**Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: [Dzyubenko@ippas.ru](mailto:Dzyubenko@ippas.ru)<sup>1</sup> Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино

Метод дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (ДСК) был экспериментально и теоретически разработан Приваловым для оценки термодинамических характеристик структуры высокомолекулярных соединений в растворе (белки, нуклеиновые кислоты и т.п.). В последнее время он все чаще стал использоваться для анализа более сложных, многокомпонентных систем. При сканировании суспензии изолированных хлоропластов в интервале 40-100 °С различными исследователями было обнаружено от пяти до семи термоиндуцированных фазовых переходов с характерными значениями температуры и относительного уровня энthalпии перехода. Предполагается, что эти фазовые переходы отражают термостабильность структуры основных функциональных комплексов фотосинтетического аппарата. Для проверки данного предположения мы методом ДСК исследовали суспензии клеток штаммов мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* с нарушением синтеза одного, двух или трех пигмент-белковых комплексов фотосистем, из коллекции В. Ладыгина в Институте фундаментальных проблем биологии РАН. В настоящей работе были использованы штаммы: А-55-110 (не содержат ФС-I и ФС-II); А-55-110-5с (без ФС-I, ФС-II и ЛНС-II), Ф-3-16 (без ФС-I, ФС-II и ЛНС-I), С-60 (без ЛНС-II), С-10 (без ЛНС-I) и ряд других, позволяющих оценить характеристики ЛНС-I и ЛНС-II. Наличие мутаций определяли методами гель-электрофореза хлорофилл-белковых комплексов мембран хлоропластов клеток, а также абсорбционной и флуоресцентной спектроскопией в жидком азоте. Материал для анализа выращивали в пробирках на агаровых косяках. Показано, что термограммы исходного штамма, содержащего все хлорофилл-белковые комплексы, имеют широкую область избыточной теплоемкости в интервале от 46 до 80 °С с размытыми пиками при 53.3-60.5-64.8 и 70.5 °С. На термограммах мутантов, содержащих только светособирающие комплексы (ЛНС-I + ЛНС-II), проявляется только узкая зона высокой теплоемкости от 54 до 74 °С с двумя максимумами – 60 и 68 °С. Термограммы мутантов, содержащих только

ЛНС-I или только ЛНС-II, характеризуются одним пиком – 63.3 и 61 °С, соответственно, с высоким уровнем энтальпии структурного перехода, и одним или двумя относительно более низкими плечами. Полученные результаты свидетельствуют о том, что пики изменения теплоемкости на термограммах суспензии *Chlamydomonas reinhardtii* отражают главным образом термоиндуцированные структурные переходы фотосинтетического аппарата микроводоросли. Термоиндуцированные структурные переходы светособирающих комплексов происходят при более высоких температурах по сравнению со структурными переходами реакционных центров фотосистем, что свидетельствует о более высокой термостабильности их структуры. Температура и величина энтальпии структурных переходов отдельных функциональных комплексов могут несколько варьировать в зависимости от возраста и условий роста микроводоросли, но последовательность их проявления на термограмме, как правило, сохраняется. Эти результаты позволяют надеяться, что метод ДСК может быть полезен при исследовании структуры и функционального состояния фотосинтетического аппарата высших растений.

**ВЛИЯНИЕ УФ-Б РАДИАЦИИ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ ХЛОРОПЛАСТОВ  
И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ  
В КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУРАХ ЧАЙНОГО РАСТЕНИЯ**

**Influence of UV-B radiation on the ultrastructure  
of chloroplasts and distribution of phenolics in tea-plant cultures**

**Г.А. Дубравина, О.А. Лукашук, А.К. Алявина**  
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: [phenolic@ippras.ru](mailto:phenolic@ippras.ru)

Известно, что коротковолновая часть УФ радиации (УФ-Б; 280-320 нм) подавляет рост растений, изменяет их гормональный статус, нарушает формирование листового аппарата и влияет на формирование в них хлоропластов. Кроме того, в этих условиях обычно повышается синтез фенольных соединений (ФС), которые защищают фотосинтетический и генетический аппарат растительных клеток от действия коротковолновых УФ-Б лучей. Нами была предпринята попытка выяснения действия повышенных доз УФ-Б радиации на ультраструктурную организацию хлоропластов в фотомиксотрофных каллусных культурах и локализацию в них фенольных соединений.

Фотомиксотрофные каллусные культуры чайного растения вы-

рацивали на модифицированной питательной среде Хеллера, содержащей 2.5 или 1 % глюкозы. В качестве источника УФ-Б радиации использовали аналог ртутной лампы ПРК-2, в сочетании со стеклянными чашками фирмы «Anumbra». Время воздействия УФ-Б лучей с 16 до 18 час ежедневно. Ранее нами было показано, что при действии УФ-Б лучей в культурах повышается синтез хлорофилла на поверхности каллусов (особенно на среде с 1 %-ной глюкозой). Поэтому для исследований использовали верхнюю и среднюю части каллусов. Анализ проводили методами электронной и световой микроскопии.

Изучение структурной организации хлоропластов, формируемых в фотомиксотрофных каллусных культурах, показало, что на основной питательной среде (2.5 %-ная глюкоза) они были средних размеров, с расширенными кристами и небольшими стопками тилакоидов. На среде с более низким уровнем глюкозы (1 %) в каллусах встречались хлоропласты как крупных, так и средних размеров, с двумя-тремя гранями и большим числом тилакоидов в грани. Однако межгранных ламелл в них было мало, и часто грани располагались беспорядочно.

Действие УФ-Б радиации стимулирует образование хлоропластов, увеличивая их число и улучшая структуру. Так, на среде с 2.5 %-ной глюкозой число хлоропластов возрастает почти в 1.5 раза по сравнению с контролем (без воздействия УФ-Б лучей). Увеличиваются также размеры хлоропластов (в два раза) и улучшается их структура: стопки тилакоидов в гранах большие, но часто расположены неупорядоченно, межгранные тилакоиды развиты слабо. На среде с 1 %-ной глюкозой в клетках, подвергшихся действию УФ-Б радиации, хлоропластов в два раза больше, чем в контроле (1 % глюкозы в среде, без УФ-Б), их размеры не меняются, однако структурная организация лучше и приближается к таковой листьев интактных растений. В этом случае стопки тилакоидов в гранах могут быть небольшими, но гран много и хорошо развита сеть межгранных тилакоидов.

Изучение распределения ФС показало, что в контрольных вариантах фотомиксотрофных каллусных культур, растущих на средах с 2.5 или 1 % глюкозы в среде, они встречаются в одинаковом количестве, в верхней и средней частях каллусов, локализуясь в вакуолях и клеточных стенках. В каллусных тканях, подвергшихся действию УФ-Б радиации, ФС чаще обнаруживаются в клетках верхней зоны каллуса в виде крупных глобул внутри вакуолей, иногда заполняя всю полость клетки. В средней зоне этих тканей клеток с ФС меньше.

Таким образом, можно сделать вывод, что при действии УФ-Б

радиации в каллусных тканях чайного растения усиливается образование хлоропластов (особенно в верхней зоне каллусов), улучшается их структура (в большей степени на среде с 1 % глюкозы), что сопровождается значительным увеличением числа клеток с ФС. Все это еще раз подтверждает взаимосвязь между структурной организацией клеток, а именно формированием в них хлоропластов и способностью к синтезу ФС.

Работа была выполнена при поддержке РФФИ (грант 04-04-49408).

### ИЗМЕНЕНИЯ В ХОДЕ ЭКССУДАЦИИ ОТДЕЛЕННЫХ КОРНЕЙ *ZEА МАYS L.* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ $HgCl_2$

#### Alterations in the course of exudation of detached *Zea mays L.* roots under the action of $HgCl_2$

А.Г. Дустмаматов, В.Н. Жолкевич

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: Zhvn@ippras.ru

Как известно,  $HgCl_2$  считается блокатором аквапоринов. Имея ввиду возможность участия последних в регуляции транспорта воды, мы проследили влияние растворов  $HgCl_2$  на корневую экссудацию в широком диапазоне концентраций – от  $1 \cdot 10^{-8}$  до  $1 \cdot 10^{-2}$  М. Опытным объектом были отделенные корни пяти-семидневных этиолированных проростков кукурузы (*Zea mays L.*).

$1 \cdot 10^{-6}$ – $2 \cdot 10^{-5}$  М растворы оказывали отчетливо выраженный пролонгированный ингибирующий эффект (экссудация подавлялась иногда на 70 %), проявлявшийся быстро и сохранявшийся на протяжении всего периода наблюдений (до 12 ч). Таким образом, блокирование аквапоринов (если оно действительно имело место) замедляло водонагнетающую деятельность корня. Предположение о специфичности действия  $HgCl_2$  при этом подкрепляется фактами уменьшения гидравлической проводимости. Стало быть, аквапорины так или иначе участвуют в регуляции транспорта воды в корне.

При воздействии более концентрированных растворов  $4 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-3}$  М имела место совершенно иная картина. Первоначальное замедление экссудации сменялось ее возрастанием, скорость, величина и продолжительность которого зависели от концентрации  $HgCl_2$ , причем в интервале концентраций от  $2.5 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-3}$  М интенсивность экссудации увеличивалась в 10 и более раз в сравнении с контролем. При еще более высоких концентрациях (свыше



$1 \cdot 10^{-3}$  М) начальное подавление экссудации вообще не наступало; стимуляция была более резкой и сравнительно скоро сменялась необратимым спадом (по-видимому, это была уже обусловленная отравлением предсмертная реакция).

Для выяснения причин необычайно сильной стимуляции экссудации, следовавшей за первоначальным ее ослаблением, мы поставили опыты с  $2.5 \cdot 10^{-4}$  М  $\text{HgCl}_2$ , проследив кинетику ряда параметров экссудации, а также зависимость ее стимуляции от воздействия некоторых физиологических регуляторов.

Прежде всего оказалось, что осмотическое давление экссудата увеличивалось не более, чем вдвое и, следовательно, сугубо осмотические явления сами по себе никаким образом не могли стать причиной беспрецедентно мощного усиления экссудации. В то же время величина температурного коэффициента ( $Q_{10}$ ) интенсивности экссудации возрастала до 14, а в отдельных опытах до 20 и более. Это могло сигнализировать о чрезвычайно сложной природе механизма выделения экссудата в тот период. Вероятно, следует отметить, что достижение максимальной величины  $Q_{10}$  предшествовало достижению максимума интенсивности экссудации. Корневое давление увеличивалось примерно в 10 раз, соответственно, возрастала и его метаболическая составляющая. Стимулирующий эффект  $\text{HgCl}_2$  нацело снимался антагонистом кальция пипольфеном, ингибитором АТФазной активности миозина 2,3-бутандион-монооксимом, разобщителями окисления с фосфорилированием 2,4-динитрофенолом и карбонилцианид-3-хлорфенилгидразоном (СССР). Таким образом, индуцированная  $2.5 \cdot 10^{-4}$  М  $\text{HgCl}_2$  стимуляция экссудации оказалась энергезависимой и зависимой от функционирования микрофиламентов и целостности мембран. Это полностью согласуется с соответствующим увеличением метаболической составляющей корневого давления. Вместе с тем, гидравлическая проводимость корней (рассчитанная по степени усиления водного тока при наложении внешнего давления) была меньше, чем в контроле даже в момент, когда стимуляция экссудации достигала своего максимума. Являлось ли это следствием продолжавшегося блокирования аквапоринов или представляло собой уже неспецифическую ответную реакцию, покажут дальнейшие исследования.

**ВЛИЯНИЕ РЯДА АНТИГИСТАМИННЫХ ПРЕПАРАТОВ  
НА ВОДОНАГНЕТАЮЩУЮ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ КОРНЯ****Effect of some antihistamines on root water pumping activity****А.Г. Дустмаматов**Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: Zhvn@ippras.ru

В опытах с отделенными корнями пяти-семидневных этиолированных проростков кукурузы (*Zea mays* L.) впервые на растениях испытано действие ряда антигистаминных препаратов человека. У человека гистамин является агонистом нескольких типов рецепторов –  $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$  и, возможно,  $H_4$ . Для каждого типа рецепторов существуют соответствующие антагонисты (блокаторы), которые в свою очередь, в зависимости от механизма действия на рецептор, делятся на конкурентные (первого поколения) и неконкурентные (второго поколения). Нами испытано действие блокаторов  $H_1$ - и  $H_2$ -гистаминовых рецепторов разных поколений на интенсивность экссудации. Обнаружено, что почти все блокаторы  $H_1$ -гистаминовых рецепторов первого поколения, за исключением слаборастворимых, стимулируют экссудацию. Так, пипольфен (прометазин), в концентрации  $1 \cdot 10^{-4}$  М оказывал столь мощное стимулирующее действие на экссудацию, что она в течение 2 ч значительно превышала контроль (максимально в 18 раз). Димедрол (дифенгидрамин), в концентрации  $1.7 \cdot 10^{-6}$  М также стимулировал экссудацию, но его эффект несколько отличался от пипольфена, интенсивность стимуляции экссудации была немного ниже, примерно в 10 раз, но эффект продолжался гораздо дольше, чем у пипольфена – до 5 ч. Супрастин (хлоропирамин) в концентрации  $6 \cdot 10^{-5}$  М стимулировал экссудацию почти так же, как пипольфен – в 17 раз, эффект продолжался 2 ч. Перитол (ципрогептадин) стимулировал экссудацию в 15 раз, эффект продолжался до 2 ч. До настоящего времени основными стимуляторами экссудации являлись фитогормоны, нейромедиаторы и кальций. Стимулирующее действие этих веществ составляет примерно 20-60 %. Правда, в последнее время был обнаружен мощный стимулятор водонагнетающей деятельности корня –  $HgCl_2$ , применение которого вызывает стимуляцию в 10 и более раз. Теперь, в связи с открытием стимулирующего действия антигистаминных препаратов, можно считать, что обнаружен целый класс новых стимуляторов экссудации. В физиологическом значении единственное, что объединяет такие вещества, это то, что все они являются конкурентными блокаторами  $H_1$ -рецепторов. Было испытано два препарата второ-

го поколения: лоратадин и парлазин (цитеризин), у которых не удалось обнаружить стимулирующего эффекта на экссудацию. Основываясь на этих данных и отводя главную роль  $H_1$ -рецепторам, все же нельзя исключить возможность комплексного участия нескольких типов рецепторов. Для того, чтобы определить, действительно ли  $H_1$ -рецепторы являются главным регуляторным центром, необходимо исключить участие других типов рецепторов, как гистаминовых, так и не гистаминовых. С этой целью были испытаны блокаторы  $H_2$ -рецепторов и намечены еще другие. Так, препараты из группы блокаторов  $H_2$ -гистаминовых рецепторов второго поколения – ранитидин и третьего поколения – фамотидин, не оказывали никакого эффекта на экссудацию. Из этого можно сделать вывод, что, по-видимому,  $H_2$ -рецепторы не принимают участия в наблюдаемой стимуляции экссудации. Исключить участие  $H_3$ - и  $H_4$ -рецепторов пока не удается в связи со слабой изученностью этих типов рецепторов и отсутствием их надежных блокаторов. Таким образом, видимо, один из рецепторов, отвечающих за регуляцию водонагнетающей деятельности корня, является подобным  $H_1$ -гистаминовому рецептору животных. Механизм его участия в восприятии экзогенных и эндогенных стимулов и роль в регуляции водонагнетающей деятельности корня в настоящий момент неизвестны; они составят предмет наших дальнейших исследований.

**ПИГМЕНТНЫЙ АППАРАТ  
И СВЕТОЗАВИСИМЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ КСАНТОФИЛЛОВ  
В ЛИСТЯХ РАСТЕНИЙ ПРИРОДНОЙ ФЛОРЫ ЮЖНОГО ТИМАНА**

**Pigment apparatus and light-dependent conversions  
of the xanthophylls in the leaves of the South Timane plants**

О.В. Дымова, Я.Н. Яцко, Г.Н. Табаленкова, Т.К. Головки  
Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар  
E-mail: [dymovao@ib.komisc.ru](mailto:dymovao@ib.komisc.ru)

Свет оказывает сильное влияние на функциональную активность растений, что отражается на их пигментном аппарате. Особую роль в защите фотосинтетического аппарата играют каротиноиды хлоропластов. Они способны эффективно тушить триплетное состояние хлорофилла и свободные радикалы, возникающие при избыточном освещении (Gilmore, 1997). Регуляцию светового потока в пигмент-белковых комплексах осуществляют каротиноиды, участвующие в виолаксантиновом цикле (ВКЦ) (Маслова и

др., 1996; Ладыгин, 2002; Прядкина, 2004). Ксантофиллы – лютеин (Лют) > виолаксантин (Вио) > неоксантин (Нео) – найдены в светособирающих комплексах (ССК) всех фотосинтезирующих организмов. Главная функция в защите фотосинтетического аппарата от повреждений высокой интенсивностью света принадлежит зеаксантину (Зеа), который образуется при деэпоксидации Вио через интермедиат антераксантин (Ант). Полагают, что Зеа осуществляет превращение избытка поглощенной энергии в тепло, предотвращая перенос энергии возбуждения в реакционный центр (Gilmore, 1997). Данных о функционировании ВКЦ в растениях природной флоры Севера очень мало.

Цель работы – изучение пигментного аппарата и деэпоксидации пигментов ксантофиллового цикла в листьях световых и теневых растений *Gymnadenia conopsea* (L.) R.Br. и *Plantago lanceolata* L., обитающих на Южном Тимане, где экологические условия местообитания значительно отличаются по факторам увлажнения и теплового режима. Содержание фотосинтетических пигментов определяли спектрофотометрически в ацетоновой вытяжке при длинах волн 662, 644 нм (хлорофиллы) и 470 нм (каротиноиды). Разделение пигментов проводили методом тонкослойной хроматографии (Корнюшенко, 1970).

Выявлено, что листья теневых (густой травостой) растений *Plantago lanceolata* отличались от световых (скальное обнажение) существенно более высоким (в 1.5-2.3 раза) содержанием хлорофиллов и каротиноидов. У световых растений достоверно ниже соотношение зеленых и желтых пигментов (3.8-4.3), что свидетельствует об относительно более высоком содержании каротиноидов в фонде фотосинтетических пигментов. При этом световой и теневой экотипы не различались по соотношению хл  $a/b$ . Хроматографический анализ выявил в спектре каротиноидов листьев световых растений *Plantago lanceolata* наличие зеаксантина. Оценка состояния де-эпоксидации виолаксантина по соотношению [(Зеа+0.5Ант)/(Вио+Ант+Зеа)] показывает, что де-эпоксирированное состояние пигментов ксантофиллового цикла в листьях световых растений было выше и достигало 30 %.

У растений *Gymnadenia conopsea*, произрастающих под пологом леса, в спектре каротиноидов присутствовали неоксантин, лютеин, виолаксантин и  $\beta$ -каротин; зеаксантин не выявлен. У луговых растений, получающих больше световой радиации, зеаксантин присутствовал; на его долю приходилось около 10 % фонда ксантофиллов. Следует также отметить, что лесной и луговой экотипы отличались по содержанию  $\beta$ -каротина: его доля в спектре каротиноидов лесных растений была почти на порядок выше по сравнению с луговыми и достигала 20 %.

Таким образом, показано, что в условиях высокой радиации, наряду со снижением концентрации зеленых пигментов и повышением относительного содержания каротиноидов, возрастает уровень де-эпоксидации пигментов ксантофиллового цикла, происходит накопление зеаксантина, способствующего диссипации излишка световой энергии. Исходя из данных литературы и экспериментально установленного нами факта повышения содержания зеаксантина в листьях световых растений, можно заключить, что при избыточной радиации активация деэпоксидации пигментов ксантофиллового цикла обеспечивает уменьшение поглощения световой энергии антенными хлорофиллами и защиту системы от фотоингибирования. Механизмы адаптации *Plantago lanceolata* (подорожника ланцетолистного) и *Gymnadenia conopsea* (кокушника комарникового) к режиму освещенности местообитания на уровне пигментного комплекса обсуждаются.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 04-04-48255) и Гранта Президента РФ № МК-8482.2006.4 для государственной поддержки российских молодых ученых.

#### **ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ИЗОФОРМ ИЗОЦИТРАТЛИАЗЫ В ЩИТКАХ И ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЬЯХ ZEA MAYZ L.**

##### **Differential expression of isocitrate lyase isoform in scutellum green leaves of *Zea mayz* L.**

**А.Т. Епринцев, Д.М. Федорин, Е.В. Маслова, Чан Тхи Хоанг Куэн,  
В.Ю. Башмаков**

Воронежский государственный университет, г. Воронеж  
E-mail: e.maslowa@rambler.ru

Глиоксилатный цикл выполняет ключевую функцию, являясь важнейшим этапом глюконеогенеза. Ключевые ферменты ГЦ – изоцитратлиаза (ИЦЛ) и малатсинтаза, обнаружены в подрастающих семенах масличных растений. Однако есть сообщения о наличии ИЦЛ в различных органах растений, в которых фермент выполняет другие функции.

Для выяснения роли ИЦЛ (КФ 4.1.3.1) в метаболизме растительной клетки проводили исследования уровня экспрессии изоформ этого фермента в различных органах кукурузы. Объектами исследования служили щитки и зеленые листья кукурузы, сорта Воронежская 76, выращенные гидропонным способом. Активность ИЦЛ определяли спектрофотометрически при длине волны 324 нм.

Установлено, что активность ИЦЛ обнаружена во всех исследованных объектах, причем в щитках скорость работы фермента

была значительно выше этого показателя в листьях кукурузы. Это можно объяснить тем, что при прорастании семян происходят активная утилизация запасных жиров и превращение их в углеводы через глюконеогенез. В зеленых листьях на свету функционирует фотодыхание, в результате работы которого образуется токсичный для клетки глиоксилат. Вероятно, наличие активности ИЦЛ в зеленых листьях связано с утилизацией глиоксилата и защитой клетки от его негативного воздействия.

Методом электрофореза в 7.5 % ПААГ и последующим специфическим окрашиванием на активность изоцитратлиазы было установлено, что в щитке присутствуют две формы фермента с Rf 0.25 (ИЦЛ1) и Rf 0.29 (ИЦЛ2), тогда как в зеленых листьях — одна с Rf 0.25 (ИЦЛ1). Анализ субклеточной локализации фермента показал, что изоформа 1 локализована в глиоксисоме, а изоформа 2 ИЦЛ имеет цитоплазматическую локализацию.

В ходе четырехстадийной очистки были получены гомогенные препараты двух изоформ ИЦЛ из щитка кукурузы. Степень очистки для изоформы 1 составила 123 раза; удельная активность 4.9 ед./мг белка; выход 5.7 %. Для второй изоформы степень очистки составила 250 раз; удельная активность 10 ед./мг белка; выход 5.7 %. Выявлено также активирующее действие на обе изоформы ИЦЛ ионов  $Mg^{2+}$  и  $Mn^{2+}$ , причем степень активации ионами  $Mn^{2+}$  ИЦЛ2 была значительно выше, чем для ИЦЛ1.

По данным, полученным в результате ионообменной хроматографии на ДЭАЕ-целлюлозе с линейным градиентом KCl, были получены две изоформы ИЦЛ; максимальный выход одной из форм наблюдался при концентрации 63 мМ KCl, а второй при 96 мМ хлорида калия. Электрофорез в 7.5 % ПААГ с последующей окраской геля нитратом серебра показал гомогенность полученных ферментативных препаратов, о чем свидетельствует наличие только одной белковой полосы в каждой пробе. Полосы после специфического проявления на активность ИЦЛ и окрашивания на белок совпадают и имеют Rf 0.25 и Rf 0.29.

Методом ОТ-ПЦР с генспецифическими праймерами для изоцитратлиазы было показано наличие в щитках кукурузы двух ПЦР продуктов, размер которых составляет около 630 и 380 п.н., а в зеленых листьях обнаружен только один ПЦР продукт длиной около 380 п.н. Это может свидетельствовать об экспрессии двух генов, кодирующих изоцитратлиазу в щитке, тогда как в листьях активным остается один из этих генов. Следовательно, свет может выступать основным фактором, регулирующим дифференциальную экспрессию генов изоцитратлиазы через различные механизмы.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о различии в экспрессии генов ИЦЛ в онтогенезе кукурузы. В щитке, где высокий уровень метаболических процессов, обеспечивающих клет-

ки энергией и субстратами для биосинтеза, присутствуют две формы изоцитратлиазы – цитоплазматическая и глиоксисомальная. Глиоксисомальная форма участвует в метаболизации ацетил КоА, образующегося при расщеплении жиров, вторая форма (цитоплазматическая) может обеспечивать различные аноплетротические реакции. Известно, что в геноме *Arabidopsis* ИЦЛ кодируется двумя генами, расположенными в хромосомах 1 и 3. Наличие двух форм фермента в щитке кукурузы и двух ПЦР продуктов с генспецифическими праймерами может быть результатом работы двух разных генов, кодирующих ИЦЛ в геноме кукурузы. На свету в зеленых листьях экспрессии подвергается только один ген, о чем свидетельствуют результат ПЦР и наличие одной изоформы ИЦЛ после специфического проявления геля на активность. Предполагается, что дифференциальная экспрессия изоформ ИЦЛ в щитках и зеленых листьях кукурузы обеспечивает трансформацию метаболизма, в частности, обуславливает регуляцию глюконеогенеза в щитках и фотодыхательного метаболизма в зеленых листьях.

**СИСТЕМЫ ТРАНСПОРТА И ИХ РОЛЬ В ХЕМОТАКСИСЕ ОДНОКЛЕТОЧНОЙ  
ЗЕЛЕННОЙ ВОДОРОСЛИ  
*CHLAMYDOMONAS REINHARDTII***

**Transport systems and their role in chemotaxis  
of unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii***

Е.В. Ермилова<sup>1</sup>, М.М. Никитин<sup>1</sup>, Т.В. Лапина<sup>1</sup>, Д.А. Кремнев<sup>1</sup>, Э. Фернандес<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Биологический научно-исследовательский институт  
Санкт-Петербургского государственного университета, г. Старый Петергоф

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,  
University of Cordoba, Cordoba

E-mail: [ermilova@ee6439.spb.edu](mailto:ermilova@ee6439.spb.edu)

Аммоний представляет основную форму азота, используемую в метаболизме, и определяет направленное движение (хемотаксис) модельного фототрофного организма *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. У *C. reinhardtii* присутствует два типа транспортных систем для переноса аммония в клетки, транспортеры с низким сродством к аммонiu (LATS) и транспортеры с высоким сродством к аммонiu (HATS). Впервые проанализирована активность двух типов транспортных систем аммония с низким сродством (LATS) и высоким сродством (HATS), на разных этапах гаметогенеза, в частности, установлено, что в вегетативных клетках функционально активно только система LATS, тогда как в гаметах – обе системы.

На основе сравнительного анализа особенностей регуляции эк-

спрессии восьми генов транспортеров аммония семейства AMT1 в вегетативных клетках, прегаметах и гаметах методом ПЦР в режиме реального времени установлено, что утрата реакции хемотаксиса у гамет не вызвана блоком экспрессии AMT1;(1-8) на уровне транскрипции. Методом инсерционного мутагенеза был изолирован новый трансформант *hat1* с нарушенным транспортом аммония. Сравнительный анализ кинетики поглощения [<sup>14</sup>C]-метиламмония у дикого типа и мутанта показал, что если у дикого типа присутствуют оба типа транспортных систем для переноса аммония/метиламмония в клетки (LATS и HATS), то у *hat1* активна только система LATS. В настоящее время ни у одного организма система LATS не охарактеризована на молекулярном уровне. При инкубации штамма *hat1* в с ингибитором K<sup>+</sup>-каналов тетраэтиламмонием (ТЭА), клетки полностью сохраняли подвижность, но утрачивали хемотактическую активность и у них блокировалось поступление [<sup>14</sup>C]-метиламмония. У клеток дикого типа после внесения ТЭА не нарушалась хемотактическая активность и сохранялась некоторая активность системы LATS. Полученные данные показывают, что LATS-система у *hat1* включает K<sup>+</sup>-каналы, чувствительные к ТЭА. С целью выявления уровня экспрессии компонентов HATS, на котором произошло нарушение(я), приведшее к блоку активности этой системы, нами была проанализирована экспрессия AMT1 генов в *hat1* методом ПЦР с предшествующей обратной транскрипцией. Результаты свидетельствуют о том, что все гены AMT1 в мутанте не нарушены и экспрессируются. Анализ потомков из скрещиваний *hat1* со штаммом дикого типа показал, что нарушение в активности системы HATS не вызвано единичной мутацией, таким образом, в мутанте *hat1*, по-видимому, нарушены несколько компонентов, вовлеченных в контроль экспрессии AMT1-генов на пост-транскрипционном уровне. Для характеристики компонентов, нарушение которых блокировало активность системы HATS у мутанта *hat1*, нами была предпринята попытка клонирования соответствующих генов. С помощью сайт-специфической амплификации методом ПЦР было получено несколько специфических продуктов. Было осуществлено секвенирование одного из них. При помощи программы BLAST JGI Chlamy v. 2.0 установлено, что данный фрагмент имеет некоторую гомологию с геном EBNA-1 вируса герпеса человека (32.6 %), который кодирует ядерный глицин-богатый белок, предположительно являющийся транскрипционным фактором.

Полученные в работе данные свидетельствуют, что у *hat1* (1) активность HATS блокирована на пост-транскрипционном уровне в результате нарушения нескольких регуляторных компонентов; (2) LATS-система у *hat1* включает неспецифические K<sup>+</sup>-каналы, чувствительные к ТЭА; (3) активность этой системы ответственна



за контроль реакции хемотаксиса у *hat1*. Тот факт, что ТЭА хотя и приводил к изменению кинетики поглощения метиламмония у СС124, однако полностью не блокировал ни поглощение соединения, ни реакцию хемотаксиса, позволяет предположить участие другого компонента(ов) в системе LATS и контроле хемотаксиса у вегетативных клеток дикого типа, возможно, из семейства Amt1. Мы предполагаем, что в клетках *Chlamydomonas* активность нескольких мембранных транспортеров принимает участие в контроле реакций хемотаксиса к аммоний/метиламмоний. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что мутанты с поврежденным транспортером Amt1;4, ответственным за перенос 65-70 % аммония/метиламмония в клетки, сохранили реакции хемотаксиса к аммоний/метиламмоний. На основании экспериментальных данных нами предложена рабочая гипотеза, согласно которой транспортеры аммония *Chlamydomonas* играют ключевую роль в способности этого одноклеточного организма к реакции хемотаксиса к аммоний.

Поддержано грантами РФФИ (04-00277 и МК-859.2007.4).

#### ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА β-ГЛЮКОЗИДАЗЫ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА

##### Physicochemical and kinetic properties of β-glucosidase in pea plants

А.Н. Ершова, О.Н. Баркалова

Воронежский государственный педагогический университет, г. Воронеж

E-mail: [aershova@vspu.ac.ru](mailto:aershova@vspu.ac.ru)

β-глюкозидаза (КФ 3.2.1.21), катализируя гидролиз β-гликозидной связи в β-D-арил- и олигоглюкопиранозидсах, играет важную роль в обменных процессах клетки, поставляя эндогенную глюкозу (Dorico, 1991). Растительные β-глюкозидазы, кроме того, принимают участие в процессах растяжения клеточных стенок, лигнификации, активации фитогормонов, защите растений от стрессов и патогенов (Туран, 2005; Пасешниченко, 1989). В растениях гороха была обнаружена β-глюкозидаза, расщепляющая специфический для этого растения изосукцинимид-β-гликозид, агликоном которого является циклическое производное гамма-аминомасляной кислоты (Zemlianuckin, Ershova, 1984). Показано (Ершова, Винокурова, 2000), что существует цитоплазматическая и связанная с клеточными стенками молекулярные формы фермента, которые отличались по рН- и температурным оптимумам, а также термостабильностью (Ершова, Еремина, 2006). Цель данной рабо-

ты – исследование физико-химических и кинетических свойств  $\beta$ -глюкозидазы, включая субстратную специфичность к арил- и олигосахаридам, влияние ингибиторов, определение рК и теплоты ионизации групп, участвующих в механизме катализа.

$\beta$ -глюкозидазу выделяли из листьев 10-12-дневных проростков гороха, выращенных при 12-часовом фотопериоде. Используя методы дифференциального центрифугирования, высаливание сульфатом аммония, очистку на G-25 и G-100 получали высокоочищенные формы фермента с удельной активностью 422.9 ФЕ/мг белка. Активность фермента определяли, используя ИС-гликозид, выделяемый из растений гороха и рассчитывали по количеству отщепившейся глюкозы, содержание которой определяли глюкооксидазным тестом по ранее отработанными нами методиками. Для исследования субстратной специфичности цитоплазматической  $\beta$ -глюкозидазы использовали природные трисахариды – раффинозу ( $\alpha 1 \rightarrow 6$  и  $\alpha 1 \rightarrow 2$  связи), дисахариды – целлобиозу ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ), мальтозу ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ), лактозу ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ), арилгликозид – ИС-гликозид и синтетический  $\alpha$ -метил- $\beta$ -D-глюкозид в концентрациях 1-10 мМ. Было показано, что фермент проявлял наибольшую активность, расщепляя ИС-гликозида (16/6 ФЕ).  $\beta$ -глюкозидаза не расщепляла раффинозу, лактозу и мальтозу, но проявляла высокую активность в присутствии  $\alpha$ -метил- $\beta$ -D-глюкозида (12.21 ФЕ).

На активность фермента влияли ионы двух- и трехвалентных металлов. Ионы  $Zn^{(2+)}$ ,  $Mg^{(2+)}$  в концентрациях 1 мМ снижали активность цитоплазматической формы фермента на 20-30 %, а  $Cu^{(2+)}$  – на 50. С повышением концентрации металлов эффект ингибирования усиливался. Ионы  $Fe^{(3+)}$ ,  $Mg^{(2+)}$ ,  $Ca^{(2+)}$  оказывали незначительное активирующее действие в тех же концентрациях, что характерно и для других  $\beta$ -глюкозидаз (Dopico, 1991; Srisomsap, 1996). С использованием ингибиторов (p-CMB, фторид натрия, мочевины, арсенит натрия) провели изучение активных групп фермента, участвующих в механизме катализа. p-CMB ( $10^{-6}$  М) подавлял активность фермента на 70-80 %, что свидетельствовало о наличии SH-групп в активном центре  $\beta$ -глюкозидазы. Известно (Захарова, 2001), что соединения, содержащие близкорасположенные SH-группы, имеют высокое сродство к арсениту натрия. В наших опытах арсенит ( $10^{(-3)}$  М) снижал активность  $\beta$ -глюкозидазы на 30 %. Мочевина ( $10^{(-3)}$ М) выступала в роли сильного конкурентного ингибитора фермента. Фторид натрия ( $10^{(-3)}$  М) практически не влиял на активность  $\beta$ -глюкозидазы.

Изучали активность  $\beta$ -глюкозидазы при разных значениях рН (2-8) и температуры (+4, +35, +55 °С). На основании результатов были построены кривые зависимости этих параметров в координатах  $V = f(pH)$ . Восходящая и нисходящая ветви кривых указывали на наличие двух каталитически активных групп. рК1 ока-

залось равными 3.1, что соответствует рК карбоксильной группе глутаминовой либо аспарагиновой аминокислотам. рК2 было равно 7.1, что соответствует либо имидазольной группе гистидина, либо аминокислотной группе цистеина. Рассчитанные теплоты ионизации этих групп ( $\Delta H$ ) подтверждают предположение.

Полученные результаты по изучению свойств  $\beta$ -глюкозидазы растений гороха показали, что фермент обладает высокой специфичностью к типу расщепляемой связи субстратов и гидролизует только  $\beta 1 \rightarrow 4$  связи, отщепляя  $\beta$ -глюкопиранозильные остатки. В то же время он обладал низкой специфичностью к агликону, так как кроме арилгликозидов эффективно гидролизовал олигосахариды. Наряду с природными, фермент расщеплял и синтетические арилгликозиды. Впервые установлено, что в активном центре  $\beta$ -глюкозидазы гороха присутствуют SH-группы, на что указывал сильный ингибирующий эффект р-СМВ, арсенита натрия и ионов  $Cu^{(2+)}$ . Расчет теплоты ионизации активных групп показал, что в акте катализа  $\beta$ -глюкозидазы принимают участие карбоксильные группы дикарбоновых кислот глутамата или аспартата и аминокислотной группы цистеина. Таким образом, полученные нами результаты расширяют представление о физико-химических свойствах  $\beta$ -глюкозидаз и их роли в растениях.

#### ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «МЕЛАФЕН» НА МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ КОРНЕПЛОДА САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

##### Effect of melaphen on metabolic activity of sugar beet root mitochondria

И.В. Жигачева<sup>1</sup>, Л.Д. Фаткуллина<sup>1</sup>, Е.Б. Бурлакова<sup>1</sup>, А.Г. Шугаев<sup>2</sup>,  
С.Г. Фаттахов<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва  
E-mail: zhigacheva@mail.ru

<sup>2</sup> Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: ag\_shugaev@ippras.ru

<sup>3</sup> Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова  
КазНЦ РАН, г. Казань  
E-mail: mahulaeva@iopc.knc.ru

Препарат «Мелафен», представляющий собой меламинамную соль бис(оксиметил)-фосфиновой кислоты, на 33 % увеличивает максимальные скорости окисления NAD-зависимых субстратов в концентрациях  $4 \times 10^{-9}$ – $4 \times 10^{-12}$  М. Добавление в среду инкубации митохондрий  $4 \times 10^{-12}$  М мелафена приводит к росту эффективности окислительного фосфорилирования (величина дыхательного контроля по Чансу [ДК] возрастает с  $2.3 \pm 0.1$  до  $2.9 \pm 0.2$ ). Увели-

чение концентрации препарата до  $2 \times 10^{-5}$  М приводит к снижению максимальных скоростей окисления субстратов и ДК. В присутствии мелафена на 27 % возрастает скорость переноса электронов на конечном цитохромоксидазном участке дыхательной цепи. Это ускорение не связано с активацией CN-резистентной оксидазы митохондрий (АО), так как перенос электронов полностью подавляется цианидом. Рост активности цитохромоксидазы и скорости окисления NAD-зависимых субстратов, по-видимому, обеспечивая активацию энергетического обмена в клетке, обуславливает ускорение ростовых процессов. Кроме того, препарат, активируя транспорт электронов на конечном участке дыхательной цепи, возможно, будет снижать генерацию активных форм кислорода в комплексах I и III, предотвращая индукцию ПОЛ и повреждение митохондриальных мембран в условиях стресса. Действительно, препарат не оказывает влияния на уровень флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах свежeweделенных митохондрий из корнеплодов сахарной свеклы и в 1.5-2 раза снижает флуоресценцию продуктов ПОЛ в мембранах «состаренных» митохондрий. При этом наиболее эффективными являются концентрации  $2 \times 10^{-7}$  и  $4 \times 10^{-12}$  М. На основании приведенных данных можно предположить, что мелафен не только стимулирует рост растений, но и обладает адаптогенными свойствами.

#### ВЛИЯНИЕ МЕЛАФЕНА НА СТРУКТУРНОЕ СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ КОРНЕПЛОДА САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

##### Effect of melaphen on structural state of sugar beet root mitochondria membranes

И.В. Жигачева<sup>1</sup>, Л.Д. Фаткуллина<sup>1</sup>, Е.Б. Бурлакова<sup>1</sup>, А.Г. Шугаев<sup>2</sup>,  
С.Г. Фаттахов<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва  
E-mail: [zhigacheva@mail.ru](mailto:zhigacheva@mail.ru)

<sup>2</sup> Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: [ag\\_shugaev@ippras.ru](mailto:ag_shugaev@ippras.ru)

<sup>3</sup> Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова  
КазНЦ РАН, г. Казань  
E-mail: [mahulaeva@iopc.knc.ru](mailto:mahulaeva@iopc.knc.ru)

Инкубация митохондрий, выделенных из корнеплодов сахарной свеклы, с регулятором роста растений мелафеном (меламиновая соль бис(оксиметил)фосфиновой кислоты) приводит к изменению структурного состояния мембран митохондрий, регистрируемого методом ЭПР-спектроскопии. При этом микровязкость повер-

хностного липидного бислоя снижается на 10 % при концентрации препарата  $4 \times 10^{-12}$  М. Микровязкость глубоколежащих прибрежковых липидов повышается, и наиболее сильные изменения (37 %) наблюдаются при использовании препарата в концентрации  $2 \times 10^{-7}$  М. Увеличение микровязкости глубоколежащих прибрежковых липидом может быть обусловлено активацией переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий. Мелафен во всех исследуемых концентрациях не влияет на уровень флуоресценции продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах свежесыведенных митохондрий и в 1.5-2 раза снижает флуоресценцию продуктов ПОЛ в мембранах «состаренных» митохондрий. Наиболее сильные изменения наблюдаются при использовании препарата в концентрации  $2 \times 10^{-7}$  и  $4 \times 10^{-12}$  М. Снижение уровня продуктов ПОЛ может быть связано с антирадикальными свойствами препарата, поскольку эффективная константа скорости ( $k_7$ ) взаимодействия мелафена с пероксильными радикалами оказалась довольно высокой. Она составляет  $1.64 \times 10^6$  (Мс)<sup>-1</sup>. На основании приведенных данных можно предположить, что высокая физиологическая активность мелафена связана с его влиянием на физико-химическое состояние биологических мембран, что приводит к изменению липид-белкового взаимодействия, влияющего на активность ассоциированных с мембраной ферментов.

#### УЧАСТИЕ G-БЕЛКОВ ПРИ СТИМУЛИРУЮЩЕМ ВОЗДЕЙСТВИИ АДРЕНАЛИНА НА ВОДОНАГНЕТАЮЩУЮ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ КОРНЯ

##### Participation of G-proteins under stimulating effect of adrenaline on the root water pumping activity

Н.В. Жуковская

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

E-mail: Zhvn@ippras.ru

Сигнальные G-белки являются универсальными посредниками при передаче сигналов от рецепторов клеточной мембраны к последующим звеньям многих сигнальных систем. Для выяснения возможности участия G-белков в трансдукции сигнала, посылаемого нейротрансмиттером адреналином при стимулировании им водонагнетающей деятельности корня, испытано совместное действие на экссудацию адреналина с ингибитором ГТФ-связывающей активности G-белков гуанозинтиодифосфатом и со стимулятором этой активности гуанозинтрифосфатом. Опытным объектом были отделенные корни пяти-семидневных этиолированных

проростков кукурузы (*Zea mays*.L.) и полученные из этих корней «рукавички», представляющие собой удобную модельную систему для изучения природы корневого давления. «Рукавичка» лишена центрального цилиндра, при удалении которого разрыв происходит по клеткам эндодермы; на месте удаленного центрального цилиндра образуется продолговатая пустая полость. Несмотря на отсутствие в этой полости какого-либо раствора и, следовательно, невозможности функционирования наподобие осмометра, вертикально закрепленная «рукавичка», погруженная нижним концом в воду, начинает выделять экссудат. Интенсивность экссудации «рукавичек» более чем вдвое превышает таковую целых корней; величина температурного коэффициента  $Q_{10}$  интенсивности экссудации у «рукавичек» составляет 4, тогда как у целых корней – 2.5, что свидетельствует о существенно большем участии метаболических процессов в формировании движущей силы экссудации у «рукавичек», чем у целых корней. Адреналин в концентрации  $1 \cdot 10^{-6}$  М стимулировал экссудацию целых корней в среднем на 27, тогда как «рукавичек» – на 42 %.

У целых корней контрольного варианта  $2 \cdot 10^{-5}$  М гуанозинтиодифосфат подавлял экссудацию на 33, у «рукавичек» же – на 55 %,  $2 \cdot 10^{-5}$  М гуанозинтиотрифосфат стимулировал экссудацию целых корней на 36, «рукавичек» – на 60 %. Эти факты свидетельствуют, во-первых, о большей чувствительности «рукавичек» к гуанозинтиодифосфату и гуанозинтиотрифосфату и, во-вторых, об участии G-белков в регуляции экссудации в норме.

В присутствии гуанозинтиодифосфата стимулирующий эффект адреналина на экссудацию полностью снимался, причем интенсивность экссудации становилась даже меньшей, чем у контрольных образцов: у целых корней – на 8, у «рукавичек» – на 17 %.

Под влиянием гуанозинтиотрифосфата стимулирующий эффект адреналина возрастал у целых корней и особенно у «рукавичек». У целых корней в присутствии одного гуанозинтиотрифосфата интенсивность экссудации составила 136 %, в присутствии одного адреналина – 127, при совместном присутствии гуанозинтиотрифосфата и адреналина – 141, у «рукавичек» – соответственно 160, 143 и 171 % от контроля.

Таким образом, полученные данные делают вероятным участие G-белков при передаче индуцируемого адреналином сигнала, стимулирующего экссудацию. Это участие может быть в значительной степени связано с метаболической составляющей корневого давления и, соответственно, с функционированием паренхимных клеток коры корня.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 06-04-48522).

**УЧАСТИЕ ПРОТЕИНКИНАЗ И ПРОТЕИНФОСФАТАЗ  
В ТРАНСДУКЦИИ СИГНАЛА, СВЯЗАННОГО С ВОДОНАГНЕТАЮЩИМ  
ДЕЙСТВИЕМ АДРЕНАЛИНА НА КОРНИ**

**Participation of protein kinases and protein phosphatases  
under transduction the signal connected with stimulation  
of the root water pumping activity by adrenaline**

**Н.В. Жуковская**

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: Zhvn@ippras.ru

Для выяснения путей трансдукции сигнала от адреналина при стимулировании им водонагнетающей деятельности корня проведены опыты с ингибитором активности протеинкиназ стауроспорином и ингибитором активности протеинфосфатаз оокадаевой кислотой. Протеинкиназы, как известно, катализируют реакции фосфорилирования белков, а протеинфосфатазы – обратные им реакции дефосфорилирования; они являются звеньями сигнальных систем.

Опыты с отделенными корнями пяти-семидневных этиолированных проростков кукурузы показали, что стауроспорин ингибировал интенсивность экссудации по сравнению с контролем в среднем на 30 %, в смеси же с адреналином стимулирующий эффект адреналина не только полностью снимался, но интенсивность экссудации снижалась ниже контрольного уровня (на воде), однако в меньшей степени, чем в одном растворе стауроспорина. Поэтому можно предположить, что протеинкиназы участвуют в процессе трансдукции сигнала, связанного с действием адреналина, но при этом задействованы и другие интермедиаты, на которые стауроспорин не влияет.

Оокадаевая кислота у корней контрольного варианта стимулировала интенсивность экссудации в среднем на 33 %. При совместном же применении с адреналином оокадаевая кислота заметно усиливала стимулирующее действие этого нейротрансмиттера. По-видимому, ингибирование протеинфосфатаз, способствующее лучшей работе протеинкиназ, повышает трансдукцию сигнала, посылаемого адреналином, и тем самым стимулирует экссудацию.

Таким образом, полученные данные могут свидетельствовать об участии протеинкиназ и протеинфосфатаз в трансдукции сигнала, связанного со стимулирующим действием адреналина на корневую экссудацию, а также с участием названных ферментов в регулировании корневого давления в норме.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 06-04-48522).

**ОБРАЗОВАНИЕ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ  
В РАСТЕНИЯХ *TAXUS CANADENSIS*****Formation and localisation of phenolic compounds in *Taxus canadensis*****С.М. Зайцева, М.С. Александрова<sup>1</sup>, Н.В. Загоскина**

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

E-mail: [phenolic@ippras.ru](mailto:phenolic@ippras.ru)<sup>1</sup> Главный ботанический сад РАН, г. Москва

В настоящее время большое внимание исследователей обращено на растения рода *Taxus*, обладающие уникальной способностью к синтезу высокоэффективного противоопухолевого соединения таксола. Что же касается изучения образования в этих растениях других представителей вторичного метаболизма, в том числе фенольной природы, то здесь имеются лишь единичные данные.

Цель нашего исследования – изучение образования фенольных соединений (ФС) в побегах тисса канадского (*Taxus canadensis*), произрастающего в средней полосе России.

В работе использовали хвою и стебли одно- и двулетних побегов тисса канадского, взятые в различные периоды вегетации (с мая по октябрь). ФС экстрагировали из растительного материала 70 %-ным этанолом. В этанольных экстрактах проводили спектрофотометрическое определение содержания суммы растворимых фенольных соединений с реактивом Фолина-Дениса (при 725 нм) и содержания флаванов с ванилиновым реактивом (при 500 нм). Для выяснения локализации ФС срезы свежесамороженных стеблей и хвои окрашивали 0.08 %-ным раствором Fast Blue.

Как показали наши данные, способность к накоплению ФС в хвое выше по сравнению со стеблем (в 1.5-2 раза). Количество же флаванов, являющихся частью суммы растворимых ФС, в этих органах было невысоким (10-40 % от суммарного содержания ФС) и почти одинаковым в хвое и стебле. В начальные периоды вегетации (с мая по июль) содержание ФС значительно увеличивалось как в хвое первого, так и второго года вегетации. В конце вегетации (сентябрь-октябрь) оно снижалось (в большей степени в хвое первого года). Динамика накопления ФС и флаванов в стеблях тисса была иной. В этом случае наибольшее количество этих веществ в стебле первого года вегетации было в июне, тогда как в стебле второго года – в октябре.

Изучение локализации ФС гистохимическим методом показало их присутствие в клеточных стенках и специализированных клетках-вместилищах (в виде гранулированных включений или аморфного вещества) эпидермальных и паренхимных тканей стеб-



ля и хвои. ФС были и в проводящем пучке, а также в тканях, прилегающих к нему.

Таким образом, растения тисса канадского обладают способностью к образованию фенольных соединений, в том числе и флавановой природы. Наибольшее накопление этих веществ характерно для молодых растущих тканей.

**СВЯЗЬ НАКОПЛЕНИЯ ГЛИКОЗИДОВ КОРИЧНОГО СПИРТА  
И ТИРОЗОЛА С УГЛЕВОДНЫМ СТАТУСОМ РАСТЕНИЙ  
*RHODIOLA ROSEA* L.**

**The connection of cinnamic alcohol glycosides and tyrosole  
accumulation with carbohydrate status of *Rhodiola rosea* L. plants**

И.Г. Захожий

Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар  
E-mail: [zakhozhiy@ib.komisc.ru](mailto:zakhozhiy@ib.komisc.ru)

Родиола розовая (*Rhodiola rosea* L.) – многолетнее травянистое растение из семейства толстянковых (Crassulaceae). Препараты из подземных органов вида нашли широкое применение в медицине и функциональном питании в качестве стимулирующих и иммуномодулирующих средств. Основными носителями биологической активности экстрактивных веществ корней и корневищ р. розовой являются гликозиды коричневого спирта и тирозола (салидрозид и розавин). Данные соединения являются продуктами специализированного обмена веществ по шикиматному пути.

Большинство проведенных исследований вторичного метаболизма р. розовой носит прикладной характер, что обусловлено практической ценностью данного вида. Вместе с тем до сих пор мало исследованы физиолого-биохимические основы накопления биологически активных веществ, связь первичных и вторичных биосинтезов, роль продуктов специализированного обмена в жизнедеятельности растений.

Цель данной работы – изучение закономерностей формирования пула неструктурных углеводов и вторичных метаболитов в подземных органах растений, выявление взаимосвязи обеспеченности растений продуктами первичных биосинтезов с накоплением веществ специализированного обмена.

Исследования проведены на культивируемых в коллекционном питомнике генеративно зрелых растениях семенного происхождения.

Углеводы находятся в основании метаболических цепей, веду-

щих к образованию всего богатства синтезируемых растениями соединений. Метаболизм сахаров – важнейший комплекс обменных реакций, обеспечивающий биосинтетические центры клеток исходным субстратом и энергией. Поэтому логично предположить, что между углеводным статусом и интенсивностью образования веществ специализированного метаболизма существует определенная взаимосвязь.

Проведенные нами исследования выявили сходство динамики изменения содержания неструктурных углеводов и салидрозида в подземных органах растений р. розовой. Ранней весной, в начале периода отрастания побегов, в подземных органах выявлено относительно высокое содержание углеводов (106 и 92 мг/г сухого вещества в каудексе и корнях соответственно); их уровень заметно уменьшается в период активной вегетации и достигает минимума к созреванию семян (33 и 26 мг/г сухой массы). В конце вегетационного периода, когда растения переходят в состояние покоя, содержание сахаров резко возрастало, достигая наибольших величин (147 и 128 мг/г сухой массы). Динамика содержания салидрозида носила такой же характер: с минимумом в период созревания семян (13.2 и 2.4 мг/г сухой массы) и максимумом при переходе растений в состояние покоя (24.0 и 5.3 мг/г сухой массы). Регрессионный анализ свидетельствует о высокой корреляции между содержанием сахаров и салидрозида в каудексе ( $R^2 = 0.73$ ) и корнях ( $R^2 = 0.85$ ) растений. Тот факт, что минимум накопления салидрозида совпадал по времени с уменьшением фонда растворимых углеводов, и оба события отмечались в период цветения-плодоношения, по нашему мнению, свидетельствует о роли донорно-акцепторных отношений в регуляции вторичных биосинтезов на уровне целостного растения. В период репродуктивного развития формирующиеся семена занимают ведущее положение в иерархии акцепторов углерода, что подтверждает сравнительный анализ распределения неструктурных углеводов по органам. Так, в фазу цветения существует градиент концентрации сахаров, направленный от основания генеративного побега к его верхушке. Репродуктивные органы (соцветия) аттрагируют продукты фотосинтеза, формируя восходящий поток органического углерода. В вегетативных побегах отмечено обратное распределение сахаров. Отток ассимилированного вегетативными побегами углерода пополняет фонд углеводов в подземных органах, необходимых для биосинтетических процессов, формирования почек возобновления, перезимовки и ранневесеннего отрастания побегов. О тесной взаимосвязи между обеспеченностью подземных органов углеводами и накоплением салидрозида указывают и результаты опытов по влиянию светового режима на накопление гликозида. Снижение освеще-

ценности на 40 % от естественной сопровождалось более чем двукратным увеличением накопления салидрозида на фоне 70 %-ного возрастания содержания сахаров.

В то же время на фоне выраженных изменений фонда растворимых сахаров содержание розавина – гликозида коричневого спирта – в корнях и каудексе колебалось незначительно. По-видимому, высокий уровень содержания углеводов не является решающим условием для интенсивности накопления розавина. Синтез розавина контролируется другими факторами, например, количеством доступного для его синтеза фенилаланина или распределением данной аминокислоты между синтезом белка и вторичных метаболитов.

Таким образом, выявлена связь накопления фенольного гликозида салидрозида с изменениями углеводного статуса растений р. розовой. Минимум накопления салидрозида совпадал по времени с уменьшением фонда растворимых углеводов и оба события наблюдались в период репродуктивного развития, что свидетельствует о роли донорно-акцепторных отношений в регуляции вторичных биосинтезов на уровне целого растения.

#### ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫЙ БЕЛОК ВОЛОКОН С КЛЕТЧНОЙ СТЕНКОЙ ЖЕЛАТИНОЗНОГО ТИПА

##### Tissue-specific protein of fibers with gelatinous cell wall

Н.Н. Ибрагимова, Н.Е. Мокшина, Л.О. Ягодина, В.В. Сальников,  
Т.А. Горшкова

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань  
E-mail: [Nibra@yandex.ru](mailto:Nibra@yandex.ru)

Клеточная стенка – ключевая структура растительного организма. Однако почти не затронутой областью исследования клеточной стенки является формирование ее сложнейшей надмолекулярной структуры. Удобным объектом исследования процессов формирования клеточной стенки являются растительные волокна, так как они обладают мощно развитой вторичной клеточной стенкой и большими размерами индивидуальных клеток.

Процесс формирования клеточной стенки в нашей лаборатории изучается на примере флоэмных волокон льна-долгунца. К преимуществам этого объекта относится разграниченность во времени и пространстве процессов удлинения волокна и утолщения его клеточной стенки, а также наличие морфологического индикатора перехода между ними, так называемой точки слома. Льяня-

ные волокна принадлежат к числу клеток, формирующих особый тип вторичных клеточных стенок, который характерен для многих лубоволокнистых культур и желатинозных волокон тяговой древесины. Этот тип вторичной клеточной стенки характеризуется очень толстым S2 слоем, практически полным отсутствием лигнина, аксиальным расположением микрофибрилл целлюлозы и высокой долей галактозосодержащих нецеллюлозных полисахаридов. Волокна этого типа предложено называть желатинозными волокнами.

На стадии формирования вторичной клеточной стенки в волокнах льна обнаруживается водорастворимый высокомолекулярный (около 2000 кДа) полисахарид  $\beta$ -(1→4)-D-галактан (до 90 % галактозы). Этот полимер является ткане- и стадийспецифичным, поскольку обнаруживается только во флоэмных волокнах ниже точки слома, на стадии утолщения клеточной стенки. Судя по динамике и локализации синтеза, галактан играет ключевую роль в процессах формирования и постсинтетической модификации клеточной стенки волокна.

Нами было показано, что вместе с галактаном в высокомолекулярной фракции после хроматографирования на Sepharose CL-4B выходят белки, которые, по всей видимости, связаны с полисахаридом. Причем белки, оцениваемые нами методом Bradford и Ds-Na-электрофорезом, обнаруживались независимо от метода концентрирования полисахарида перед хроматографированием (80 % -ным спиртом или ультрафильтрацией). Один из доминантных белков высокомолекулярной фракции с молекулярной массой полипептидной цепи около 65 кДа, по данным Ds-Na-электрофореза, имел наиболее прочную связь с высокомолекулярным галактаном, при этом он нековалентно связан с полисахаридом и иногда обнаруживался в свободной форме. В последующей работе белок был выделен для определения частичной аминокислотной последовательности. Проанализированные фрагменты этого белка позволили идентифицировать его как белок растительного происхождения с частичной гомологией к глюкозидазам. Благодаря полученным результатам сделано предположение, что исследуемый белок может быть напрямую связан с процессом сборки клеточной стенки и с формированием волокон льна.

Нами был выделен изучаемый белок в количестве, достаточном для последующей иммунизации мышей и выработки поликлональных антител с целью проведения исследований по локализации белка в волокнах льна. С помощью полученных антител (N1) на ультратонких срезах, где использовались вторичные антитела, связанные с коллоидным золотом, показано, что метка обнаруживается только в пузырьках Гольджи и в слое клеточной стен-

ки с аксиальным расположением микрофибрилл целлюлозы. Двойное мечение антителами белка (N1) и галактана (LM5) показало, что метка на белок имеет аналогичное распределение с полисахаридом.

Полученные нами антитела в дальнейшем использовали для обнаружения и установления локализации анализируемого белка в желатинозных волокнах разного типа. Для этого исследовали волокна растений, систематически далеких друг от друга, а также волокна различного происхождения и локализации – первичные и вторичные флоэмные волокна конопли (*Cannabis sativa*) и ксилемные волокна древесины напряжения тополя (*Populus L.*). Было показано, что белок, ассоциированный с галактаном, присутствует в первичных и вторичных флоэмных волокнах конопли, а именно в слоях S2 и S3 вторичной клеточной стенки волокон желатинозного типа и не обнаруживается в клетках других тканей. Кроме того, исследуемый белок присутствовал и в волокнах древесины напряжения тополя, формирующих клеточную стенку желатинозного типа, и не выявлен в волокнах древесины, не формирующих этот тип клеточной стенки.

Проведенные нами исследования позволили выдвинуть предположение о том, что этот белок может служить маркером клеточных стенок желатинозного типа и поставить вопрос о его функциональной роли.

**МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА  
В ХЛОРОПЛАСТАХ: ВКЛЮЧЕНИЕ КИСЛОРОДА  
В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКУЮ ЦЕПЬ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ**

**Mechanisms of reactive oxygen species generation in chloroplasts:  
oxygen incorporation into photosynthetic electron transport chain**

**Б.Н. Иванов, М.М. Мубаракшина, М.А. Козулева, С.А. Хоробрых**  
Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино  
E-mail: [ivabor@issp.serpukhov.su](mailto:ivabor@issp.serpukhov.su)

Генерация различных активных форм кислорода (АФК) в мембранах тилакоида хлоропластов рассматривается как результат особенностей электронного переноса на отдельных участках фотосинтетической электрон-транспортной цепи. Восстановление кислорода на акцепторной стороне Фотосистемы 1 (ФС1) обычно рассматривают как главный источник АФК в хлоропластах. Однако общепринятого представления о механизмах этого процесса не

достигнуто до сих пор, особенно относительно роли ферредоксина. Мы нашли, что только 30-40 % электронного потока от воды к кислороду протекает через ферредоксин как в отсутствие, так и присутствии НАДФ<sup>+</sup>. Анализ полученных результатов предполагает восстановление кислорода одним из внутримембранных компонентов акцепторной части ФС1.

Экспериментальные данные, имеющиеся в литературе, и наши измерения свидетельствуют о незначительной скорости этого процесса восстановления кислорода в Фотосистеме 2 (ФС2). В изолированных из тилакоидных мембран частицах, обогащенных ФС2, мы обнаружили стимуляцию восстановления кислорода при обработках, повреждающих донорную часть ФС2, в частности, донирование электронов от водоокисляющего комплекса. Было найдено, что доноры ФС2 марганец и аскорбат существенно подавляли каталаза-зависимое поглощение кислорода в трис-обработанных частицах. В результате освещения трис-обработанных частиц происходило уменьшение скорости поглощения кислорода, которое коррелировало с возрастанием количества цитохрома *b*-559, восстанавливаемого ферроцианидом.

Сделан вывод, что вызванное светом потребление кислорода в ФС2 при нарушении электронного переноса от воды к реакционному центру ФС2, P680, происходит как в результате восстановления кислорода, приводящего к образованию H<sub>22</sub>, так и при взаимодействии O<sub>2</sub> с органическими радикалами, возникающими после отрыва электронов от молекул долгоживущим P680<sup>+</sup>. Возможные продукты последней реакции – гидропероксиды органических молекул.

Представлены экспериментальные данные, свидетельствующие о комплексном участии пула пластохинона (PQ) в восстановлении кислорода в фотосинтетической электрон-транспортной цепи. Вклад пула PQ в восстановление кислорода в полной фотосинтетической электрон-транспортной цепи при высокой интенсивности света составляет 50 % при pH 5.0 и достигает 70 % при pH 6.5 и 7.8. Данные объясняются как результат восстановления молекул O<sub>2</sub> в ФС1 и пуле PQ с последующим восстановлением супероксидных радикалов, образовавшихся в обоих процессах, пластогидрохиноном в термодинамически выгодной реакции. Такое совместное участие пула PQ и ФС1 в восстановлении кислорода мы назвали «кооперативным восстановлением кислорода». Полученные результаты позволили предположить включение форм кислорода в фотосинтетическую электрон-транспортную цепь как природных участников переноса электронов.

Согласно предложенной схеме, супероксидные анион-радикалы и еще более опасные их протонированные формы, HO<sub>2</sub><sup>•</sup>, могут

быть нейтрализованы внутри мембраны. Таким образом, пул PQ можно рассматривать как один из элементов системы защиты тилакоидных мембран, где пластогидрохинон, функционируя как ловушка супероксидов, производит  $H_2O_2$ . Мы экспериментально показали, что формирование  $H_2O_2$  происходит в основном не в среде, а, главным образом, в тилакоидах, т.е. в самой мембране и в люмене. Доля потока электронов, участвующих во внутритилакоидном формировании  $H_2O_2$ , в суммарном потоке электронов по фотосинтетической электрон-транспортной цепи возрастает с увеличением интенсивности света, достигая при высоких интенсивностях 60 %. Доля потока электронов, участвующих в формировании  $H_2O_2$  в люмене тилакоидов, была не более 10 %.

Есть много данных о зависимости включения реакций адаптации в клетках растения от окислительно-восстановительного состояния пула PQ. Возможно, что именно молекулы  $H_2O_2$ , формирующиеся с участием компонентов этого пула, играют роль сигнала. Возможность генерации  $H_2O_2$  в мембране может иметь фундаментальное значение, так как молекулы, образовавшиеся там, могут выходить из тилакоидов в строму в любой точке мембраны, в то время как мембранная система очистки детоксикации  $H_2O_2$  сконцентрирована на поверхности мембраны вблизи ФС1. Кроме того, такие молекулы  $H_2O_2$  выходят в цитоплазму, минуя также стромальную систему детоксикации.

#### ПРИСУТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ КАРБОНАГИДРАЗЫ В ТИЛАКОИДАХ ЛИСТЬЕВ ГОРОХА

##### Presence of various carbonic anhydrases in pea leaf thylakoids

Л.К. Игнатов, Н.Н. Руденко, М.С. Христин, Б.Н. Иванов  
Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино

В тилакоидах листьев гороха обнаружено несколько карбоангидраз как связанных с пигмент-белковыми комплексами фотосистем, так и одной растворимой, выходящей из люмена.

Карбоангидраза, катализирующая обратимую гидратацию  $CO_2$ , является универсальным ферментом, обнаруженным во всех живых организмах от прокариот до человека. По строению активного центра карбоангидразы разделены на три генных семейства –  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ . Расшифровка генома высшего растения *Arabidopsis thaliana* позволила установить присутствие свыше десятка генов, кодирующих карбоангидразы, принадлежащие ко всем трем семействам. Отдельные органеллы часто содержат несколько изоформ карбоангидразы. Так, в одноклеточной зеленой водоросли *Chlamidomonas*

*reinhardtii* две карбоангидразы  $\alpha$ -типа находятся в периплазматическом пространстве, а две карбоангидразы  $\gamma$ -типа – в митохондриях. Всего в этой водоросли обнаружено девять карбоангидраз в разных компартментах. Нами представлены доказательства присутствия в тилакоидах листьев гороха трех мембраносвязанных и одной растворимой карбоангидраз.

Две мембраносвязанных карбоангидразы обнаружены в мембранных препаратах, обогащенных фотосистемой 2 (ФС2). Одна карбоангидраза, связанная с высокомолекулярными компонентами корккомплекса ФС2, остающаяся в мембранах после обработки солями, взятыми в высокой концентрации. Максимальная активность этой карбоангидразы проявлялась в присутствии тритона X-100, взятого в отношении тритон/хлорофилл = 1. Эта карбоангидраза весьма чувствительна к действию липорастворимого сульфамидного ингибитора этоксизоламида с  $I_{50} = 10^{-9}$  М. Другая карбоангидраза, обнаруженная в ФС2, переходит в раствор при действии солей калия, натрия и особенно кальция и детергентов тритона X-100 и додецилмальтозида. Кажущаяся молекулярная масса этого белка в наших условиях нативного электрофореза равна 50 кД. Он столь же высокочувствителен к действию этоксизоламида, как и высокомолекулярная карбоангидраза. Однако ацетазоламид, слабо проникающий в мембрану сульфамидный ингибитор, оказывает необычное действие на эту карбоангидразу, увеличивая активность при концентрациях ниже  $10^{-6}$  М. Другим необычным свойством этого белка является сохранение высокой ферментативной активности при инкубации его при 90 °С в течение 10-15 мин. Известно, что белок 33 кД, проинкубированный при 90 °С и добавленный к ФС2, лишенной этого белка, восстанавливает кислородвыделяющую функцию ФС2. А. Стемлер показал, что рекомбинантный белок 33 кД обладал карбоангидразной активностью и восстанавливал кислородвыделяющую функцию ФС2. Этот белок относят к классу «естественно развернутых белков» (naturally unfolded proteins), когда ферментативной активностью обладает развернутая молекула белка. Нами установлено, что мембранные препараты ФС2, обработанные 1 % SDS, сохраняли карбоангидразную активность.

В мембранных препаратах, обогащенных фотосистемой 1, также обнаружена высокая активность карбоангидразы, превышающая в 7-10 раз карбоангидразную активность препаратов, обогащенных ФС2. Максимальная активность этой карбоангидразы достигалась в присутствии тритона X-100, взятого в отношении тритон/хлорофилл = 0.3. Эта карбоангидраза была менее чувствительна к сульфамидным ингибиторам с  $I_{50} = 10^{-6}$  М как для липорастворимого этоксизоламида, так и слабопроникающего в мембрану аце-



тазоламида, что свидетельствует о расположении активного центра фермента на поверхности мембраны. Кажущаяся молекулярная масса этой карбоангидразы при нативном электрофорезе около 20 кД.

Наряду с тремя мембраносвязанными карбоангидразами, нами обнаружена растворимая высокомолекулярная, отличная от стромальной, карбоангидраза, предположительно расположенная в люмене тилакоидов. При обработке тилакоидов тритоном X-100 при отношении тритон/хлорофилл, равном или большем единицы она выходит в раствор. После осаждения этих тилакоидов при 12000 g она наблюдалась в супернатанте с помощью нативного электрофореза в ПААГ. При центрифугировании этого супернатанта в течение 1 час при 144000 g эта карбоангидраза оставалась в растворе (в супернатанте). Анализ ее сульфамидами показал, что полное ингибирование этоксизоламидом достигалось при действии концентрациями на три порядка более низкими, чем при ингибировании стромальной растворимой карбоангидразы. Кажущаяся молекулярная масса этой карбоангидразы при нативном электрофорезе 262 кД.

#### ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА В ХЛОРОПЛАСТАХ

##### Peculiarities of energy exchange regulation in chloroplasts

И.М. Карташов

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино  
E-mail: [Kartachov@issp.serpuchov.su](mailto:Kartachov@issp.serpuchov.su)

Выяснение механизмов регуляции энергетического обмена в хлоропластах является одной из важнейших задач современной биологической химии. К настоящему времени накоплено много экспериментальных фактов, свидетельствующих о том, что регуляция энергетического обмена в хлоропластах в значительной степени определяется изменением скоростей генерации АТФ и его потребления, т.е. путем их ускорения или замедления. Это связано с тем, что утилизация АТФ влияет на генерацию АТФ, а последний процесс в свою очередь через внутритилакоидный рН – на образование другого важного соединения – восстановленного NADP, необходимого для энергопотребляющих стадий фотосинтеза. Поэтому представляется вероятным, что действие наиболее важных регуляторных механизмов энергетического обмена в хлоропластах,

прежде всего, может быть направлено на элементарные стадии процессов образования АТФ и его потребления, которые могут контролировать их скорости. К таким элементарным стадиям в процессе фотофосфорилирования можно отнести транспорт (диффузия) субстратов к активным центрам  $CF_1$ , их адсорбцию, каталитическое превращение (образование Р-О-Р связи в АТФ), десорбцию АТФ из активного центра  $CF_1$  и его транспорт (диффузию) к потребителям. В приведенной последовательности сравнительно мало внимания уделяется стадиям диффузии АДФ и АТФ в хлоропластах. Поэтому в работе проведен анализ диффузионных ограничений субстратов фотофосфорилирования в процессах генерации АТФ и его потребления в хлоропластах на основе данных литературы и результатов собственных исследований с использованием теоретических и экспериментальных критериев, выработанных во время исследований функционирования иммобилизованных ферментов. Из анализа следует, что стадии диффузии АДФ из окружающей среды к активному центру  $CF_1$  и последующей диффузии АТФ от активного центра к потребляющим ферментам хлоропластов могут быть более медленными, чем другие, включая стадию образования ковалентной связи в АТФ. Это обусловлено высокой каталитической активностью  $CF_1$  ( $k_{кат} = 300-500 \text{ сек}^{-1}$  – число оборотов АТФ-синтетазы в 1 секунду) и более низкой диффузионной подвижностью аденинуклеотидов в пределах хлоропласта из-за наличия неперемешиваемых слоев, прилегающих к тилакоидной поверхности, и высокой концентрации белка в строме (40-50 вес.%). В условиях *in vitro* в процессе фотофосфорилирования можно выделить два режима функционирования: диффузионный при низких концентрациях АДФ и кинетический при высоких. По аналогии с аденилаткиназой митохондрий животных клеток рассмотрена возможная модель участия аденилаткиназы хлоропластов (К.Ф.2.7.4.3.), катализирующей реакцию:  $2\text{АДФ} \leftrightarrow \text{АТФ} + \text{АМР}$ , в регуляции энергетического обмена путем влияния на транспорт (диффузию) аденинуклеотидов внутри органелл. Для обоснования модели использовали экспериментальные данные по локализации аденилаткиназы в хлоропластах, регуляции ее активности, участию фермента в адаптации растений к различным факторам внешней среды, а также некоторые наблюдения на уровне интактных хлоропластов, свидетельствующие о вероятности подобной модели. В условиях *in vitro* в диффузионном режиме функционирования процесса фотофосфорилирования установлена принципиальная возможность повышения скорости передачи АТФ от хлоропластов к гексокиназе с участием аденилаткиназы. Предполагается, что в хлоропластах на уровне функционирования аденилаткиназы посредством прямой и обратной связи

может осуществляться контроль процесса генерации АТФ в соответствии с его потребностями.

### ВЛИЯНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЭРИТРОМИЦИНОМ ПЛАСТИД НА СИНТЕЗ $\beta$ -ГЛИКОЗИДАЗ ПОДСОЛНЕЧНИКА

Influence of erythromycin modified plastids  
on the synthesis of  $\beta$ -glycosidases in sunflower

Р.М. Кесслер, Н.С. Колоколова, О.В. Рожкова, А.В. Усатов  
Научно-исследовательский институт биологии  
Южного федерального университета, г. Ростов-на-Дону  
E-mail: [usatova@mail.ru](mailto:usatova@mail.ru)

Несмотря на очевидную значимость пластидно-ядерных взаимоотношений в функционировании растительных клеток, многие аспекты этой проблемы изучены пока не достаточно. Удобными маркерами функциональной активности структурных генов являются ферменты. Для исследования влияния функционального статуса пластид на экспрессию ядерных генов, кодирующих  $\beta$ -галактозидазу и  $\beta$ -глюкозидазу, в качестве агента, блокирующего биосинтез белка на 70 S рибосомах, в хлоропластах листьев подсолнечника использовали эритромицин.

Семена инбредной линии 3629 проращивали в стерильных условиях на агаре с добавлением эритромицина в концентрации  $10^{-4}$  М. У проростков на стадии второй-третьей пары настоящих листьев наблюдали снижение содержания хлорофиллов и нарушение внутренней структуры хлоропластов по сравнению с контрольными растениями. При этом активности  $\beta$ -галактозидазы и  $\beta$ -глюкозидазы возрастали на 73 и 40 % соответственно относительно контроля. Для подтверждения связи между увеличением активностей ферментов и уровнем синтеза их молекул проростки срезали и помещали в сосуды с питательной средой, содержащей набор аминокислот, меченных по  $C^{14}$ . Через 16 ч экспозиции проростков проводили гель-фильтрацию водорастворимых белков на Акрилексе А-150 с дальнейшим определением интенсивности включения радиоактивной метки в отдельных белковых фракциях. Во фракции, содержащей оба исследуемых фермента, активность  $\beta$ -галактозидазы и  $\beta$ -глюкозидазы возрастала на 45 и 32 % соответственно относительно контроля. Интенсивность включения метки в данной фракции также была в несколько раз выше, чем в контроле.

Таким образом, в ответ на блокирование синтеза белка на 70 S

рибосомах пластид, происходит увеличение синтеза гидролитических ферментов и, в частности,  $\beta$ -гликозидаз, контролируемых ядерными генами и транслируемых на цитоплазматических рибосомах 80 S. Биологический смысл такого увеличения, по-видимому, состоит в поддержании в клетках необходимого для жизнедеятельности растений пула сахаров за счет реутилизации высокомолекулярных молекул углеводов.

**ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРА РОСТА МЕЛАФЕНА  
НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ДЫХАНИЯ И АКТИВНОСТЬ ОКСИДАЗ  
В КЛУБНЯХ КАРТОФЕЛЯ**

**The influence of melaphen growth regulator  
on the intensity of respiration and activity of oxidases in Potato tubers**

**И.Г. Кириллова**

Орловский государственный университет, г. Орел  
E-mail: [rector@osu.edu.ru](mailto:rector@osu.edu.ru)

К регуляторам роста нового поколения относится синтетический препарат фосфоорганической природы – мелафен (меламиновая соль бис(оксиметил)фосфиновой кислоты). Механизм действия этого регулятора связывают с фосфорной группировкой, принимающей участие в процессах фосфорилирования белков и липидов мембран клеток посредством протеинкиназ. В настоящей работе исследовано действие мелафена на интенсивность дыхания и активность окислительно-восстановительных ферментов (каталазы и пероксидазы) в клубнях растений картофеля сорта Скорoplодный. Опыты проводили в условиях вегетационного домика (почвенная культура). Обработку мелафеном ( $10^{-6}$  М/л) проводили двумя способами: путем замачивания посадочных клубней в водном растворе данного регулятора в течение 10 мин. и опрыскивания надземных органов растений картофеля в фазе бутонизации. Клубни для анализа отбирали в конце вегетации. Показано, что под влиянием мелафена увеличилась интенсивность дыхания клубней 1.3-1.7 раза по сравнению с контролем. Усиление дыхания в органах-акцепторах ассимилятов (клубнях), по-видимому, может способствовать усилению их аттрагирующей способности. Установлено, что мелафен повысил концентрацию сахарозы в клубнях – основной транспортной формы сахаров. На фоне активизации дыхания клубней растений картофеля, обработанных этим препаратом, отмечено увеличение в них активности окислительных фер-

ментов, утилизирующих перекись водорода – каталазы и пероксидазы. При воздействии мелафена пероксидазная активность в тканях клубня возросла в два-три раза, а активность каталазы – в 1.5- 1.7 раза по сравнению с контролем, что может свидетельствовать об активизации дыхательной системы клетки. Таким образом, показано, что обработка регулятором роста мелафеном усиливает напряженность метаболических процессов в клубнях растения картофеля, что в конечном итоге может положительно сказаться на продуктивности данной культуры и устойчивости к стрессорам.

### СОДЕРЖАНИЕ ЦИНКА И МЕДИ В РАЗВИВАЮЩЕМСЯ И СТАРЕЮЩЕМ КОЛЕОПТИЛЕ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

#### Zinc and copper content in developing and aging coleoptiles of wheat seedlings

Г.Я. Коломийцева, Т.А. Смирнова, А.Н. Прусов, Б.Ф. Ванюшин  
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского  
МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва  
E-mail: [prusov@belozersky.msu.ru](mailto:prusov@belozersky.msu.ru)

Считается, что цинк и медь могут участвовать в регуляции программируемой смерти клеток – фундаментального процесса селективного и упорядоченного удаления клеток, обеспечивающего нормальное развитие организмов. Методами атомного абсорбционного анализа и инверсионной вольтамперометрии изучено содержание цинка и меди в coleoptile этиолированных проростков пшеницы в разные сроки после прорастания зерновки (четыре, восемь и 14 дней), характеризующиеся определенными физиологическими и биохимическими показателями развития и постепенного отмирания coleoptile. Содержание цинка и меди изменяется в ходе развития и старения coleoptile по-разному: содержание цинка непрерывно возрастает, причем наиболее заметно между восьмым и 14-м днями развития проростка, а содержание меди, напротив, достигнув максимума на восьмой день, далее снижается. Эти изменения совпадают по времени с наблюдаемыми признаками апоптозной гибели клеток и подъемом протеолитической активности в coleoptile. Накопление цинка и параллельное снижение содержания меди в стареющем coleoptile наиболее выражены в апикальной части coleoptile, которая является наиболее старой и богатой апоптозными клетками. Таким образом, по-видимому, существует корреляция между изменениями в содержании в coleoptile цинка и меди и вступлением клеток coleoptile

в необратимую стадию апоптоза. В зерновке и корнях содержание цинка и меди также тканеспецифично изменяется с возрастом проростка. Предполагается, что выраженные модуляции в содержании цинка и меди в колеоптиле пшеницы связаны с индукцией и протеканием терминальных стадий апоптоза.

Работа поддержана РФФИ (грант 05-04-48071).

**ЛИПОКСИГЕНАЗНАЯ И ГИДРОПЕРОКСИДЛИАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ  
ПРИ ХРАНЕНИИ И ПРОРАСТАНИИ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ  
(*SOLANUM TUBEROSUM* L.)**

**Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities during storage  
and germination of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.)**

**В.Н. Копич, О.В. Харченко**

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, г. Киев

E-mail: [viktor@bpci.kiev.ua](mailto:viktor@bpci.kiev.ua)

В растениях при участии ферментов липоксигеназного пути из полиненасыщенных жирных кислот образуются фитооксипины – биологически активные вещества, которые являются природными биорегуляторами. Эти соединения играют важную роль в регуляции метаболизма клетки растения, выступая в качестве сигнальных молекул и вторичных мессенджеров, принимающих активное участие в защите растения от патогенных факторов.

Весь каскад реакций выделяют в отдельную липоксигеназную сигнальную систему, участвующую в регуляции метаболизма клетки. К данным ферментам относятся и гидропероксидлиазы, которые катализируют превращение первичных продуктов липоксигеназных реакций в альдегиды и альдокислоты.

Изучение ферментов липоксигеназного пути и продуктов их реакций является необходимым условием для понимания механизмов регуляции метаболизма растительной клетки, а также для разработки схем ферментативного синтеза их продуктов с целью использования в сельском хозяйстве и пищевой промышленности.

Цель работы – проведение сравнительного анализа активностей липоксигеназы и гидропероксидлиазы при хранении клубней картофеля.

Показано, что на стадии инициации прорастания наблюдалась максимальная активность как липоксигеназы, так и гидропероксидлиазы. На стадии апикального доминирования активность липоксигеназы была в два раза ниже, а гидропероксидлиазная активность практически отсутствовала, в то время как на стадии

дочерних клубней наблюдалось уменьшение активности обоих ферментов в два-три раза по сравнению с их активностью на стадии инициации прорастания. Полученные данные коррелируют с повышением содержания исходных субстратов гидропероксидлиазной реакции, что свидетельствует об участии данных ферментов в процессах роста и развития растений.

### РАЗДЕЛЕНИЕ ВКЛАДОВ ФИТОХРОМОВ А И В В РЕГУЛЯЦИИ УСТЬИЧНЫХ ДВИЖЕНИЙ У *PISUM SATIVUM* L.

#### Differentiation of phytochromes A and B contribution in regulation of stomatal movements in *Pisum sativum* L.

Г.В. Кочетова, С.В. Константинова, У.Б. Баштанова

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва  
E-mail: [urtica@gala.net](mailto:urtica@gala.net)

Растения имеют несколько фоторецепторных систем для измерения длительности, направления и интенсивности света. В соответствии с полученной информацией модулируются процессы их роста и развития. Устьичный аппарат растений регулирует два разнонаправленных процесса: поглощение  $\text{CO}_2$  и испарение воды. Наибольшие поглощение  $\text{CO}_2$  и продуктивность фотосинтеза наблюдаются при максимально открытых устьицах, что, однако, может привести к потере воды и увяданию растения. Необходимый компромисс достигается работой множества рецепторных систем в устьичных клетках, с помощью которых воспринимаются как сигналы внешней среды, важнейшим из которых является свет, так и внутренние гормональные сигналы. Кроме хлорофиллов, регулирующих устьичные движения и интенсивность транспирации через фотосинтез, в замыкающих клетках устьиц функционируют все известные растительные фоторецепторы: фототропины, предположительно зеаксантин, фитохромы; некоторые исследователи предполагают также наличие криптохромов и ретиналь-содержащих (родопсин-подобных) рецепторов.

Ранее в нашей группе была показана красная/дальнекрасная (К/ДК) обратимость при исследовании транспирационных ответов у бесхлорофилльного мутанта гороха *XL18*: красный свет (КС) вызывал открывание устьиц, а дальний красный (ДКС) – закрытие. Она характерна для части фитохром-зависимых ответов, а именно низкоинтенсивных, регулируемых фитохромом В. Настоящее исследование посвящено возможному участию в процессе и фотолабильного фитохрома А, реакции которого на К и ДК свет

сонаправленны.

Обнаружение и разделение ответов, обусловленных фитохромами, является сложной задачей, поскольку эти фоторецепторы сходны по спектрам поглощения. Дополнительную сложность приносит хлорофилл, также поглощающий в красной области и регулирующий движение устьиц. В настоящее время не описаны двойные мутанты по одному из фитохромов и хлорофиллу. Использование в качестве объекта бесхлорофилльного мутанта гороха *XL18* позволило нам исключить из суммы ответов хлорофилл-зависимый, т.е. любой устьичный ответ в красной-дальней красной (К-ДК) области был обусловлен фитохромной системой, в которой основное физиологическое значение имеют два мажорных фитохрома: А и В.

Нами получены световые кривые, характеризующие открывание устьиц в ответ на красный ( $\lambda = 601, 650, 670$  нм) и дальний красный свет ( $\lambda = 696, 729$  нм), а также световые кривые, характеризующие открывание на КС ( $\lambda = 676$  нм) и закрывание на ДКС ( $\lambda = 696, 711, 729, 743, 763$  нм), данный после КС ( $\lambda = 660$  нм). Световые кривые для длин волн КС, данного сразу после темновой адаптации, или после предосвещения более коротковолновым КС ( $\lambda = 660$  нм) линейны в полулогарифмической системе координат, т.е. открывание на КС либо регулируется одним фитохромом В, либо оба мажорных фитохрома действуют в этом процессе сонаправленно. Об участии фитохрома А в процессе свидетельствует тот факт, что при действии ДКС ( $\lambda = 696$  и  $729$  нм) наблюдается открывание устьиц, хотя этот свет фотохимически неактивен при переводе фитохрома В в физиологически активную форму. Таким образом, фитохром А всегда вызывает открывание устьиц – и в К, и ДК областях. Фитохром В вызывает открывание только в К области, а в ДК области вызывает закрывание.

Нелинейный характер световых кривых при исследовании закрывания устьиц на обращающий ДКС после предосвещения КС свидетельствует о разнонаправленном действии двух фоторецепторов: фитохром А вызывает открывание устьиц на ДКС, а фитохром В – закрывание (при интенсивном освещении преобладает ответ фитохрома В, и устьица закрываются). Вклад в ответ фитохрома А увеличивается при удлинении периода темновой адаптации, в течение которой происходит его ресинтез и накопление.

Таким образом, нами получены доказательства участия фитохромов А и В в регуляции устьичных движений. Так как полученные световые кривые являются суммарными по двум фитохромам, необходимо математическими методами разложить их на составляющие, и для каждого из фитохромов А и В получить спектры действия устьичных движений.



**ЗАКОНОМЕРНОСТИ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ  
ТРАНСПОРТНОЙ СИСТЕМЫ АММОНИЯ  
ПЛАЗМАЛЕММЫ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ**

**Main rules of plant cell's plasma membrane ammonium  
transport system activity regulation**

**А.П. Кудряшов, Т.В. Цап, А.С. Осюк**

Белорусский государственный университет, г. Минск

E-mail: kudrant@mail.ru

Азот играет исключительно важную роль в процессах жизнедеятельности любого живого организма. Наличие этого элемента в составе белков, нуклеиновых кислот, пигментов и других физиологически значимых веществ указывает на исключительно высокие потребности организма в азоте, которые зеленые растения удовлетворяют за счет поглощения из среды его минеральных соединений и простых органических (мочевина) соединений. В настоящее время доказано существование специфических транспортных систем, осуществляющих перенос ионов аммония через плазмалемму внутрь растительной клетки. Транспортная система ионов аммония (ТСА) плазматической мембраны играет исключительно важную роль в обеспечении растений азотом, поскольку аммиак, как слабое основание, в нейтральных и слабокислых средах (например, в почве) в основном находится в виде иона  $\text{NH}_4^+$ , кроме того, все другие соединения, составляющие основу азотного питания растений, усваиваются организмом лишь после их превращения в аммиак.

Ввиду высокой биологической активности  $\text{NH}_3$ , его поступление внутрь клетки должно находиться под жестким контролем. Нами предполагается два типа механизмов регуляции ТСА – электростатические и биохимические. Функционирование электростатических механизмов регуляции обусловлено электрическим полем мембраны. С увеличением разности потенциалов на мембране (РЭП) возрастает максимальная скорость транспорта и уменьшается константа Михаэлиса, с падением РЭП, наоборот, транспорт  $\text{NH}_4^+$  подавляется. В то же время эксперименты, проведенные с использованием клеток *Nitella flexilis*, продемонстрировали деполяризующее действие микромолярных концентраций аммонийных солей, обусловленное функционированием ТСА, т. е. активация ТСА приводит к снижению потока ионов  $\text{NH}_4^+$  внутрь клетки. Однако при функционировании ТСА реально невозможна «катастрофическая» деполяризация, приводящая к многократному снижению потока ионов аммония, поскольку РЭП определяется активностью и дру-

гих систем ионного транспорта, обеспечивающих поддержание электрических параметров плазмалеммы на определенном уровне (калиевые каналы и  $H^+$ -АТФазная помпа). Эксперименты, проведенные в режиме фиксации потенциала, не выявили влияния освещения или рН среды на поток ионов  $NH_4^+$  внутрь клеток *N. flexilis*. В то же время при освещении суспендированных клеток *Chlorella vulgaris* отмечается практически мгновенное, более чем трехкратное увеличение скорости поглощения  $NH_4^+$ , которое обусловлено гиперполяризацией плазмалеммы клеток *Ch. vulgaris* в результате функционирования фотоиндуцированной  $H^+$ -АТФазной помпы. Сама по себе гиперполяризация мембраны должна приводить к возрастанию потока ионов  $NH_4^+$ , однако чрезмерный рост поступления  $NH_4^+$  внутрь клеток при указанных условиях невозможен, поскольку в этом случае возросшая проводимость ТСА может индуцировать заметную деполяризацию плазмалеммы, нарушающую ее стабилизацию в энергизованном состоянии.

Биохимические механизмы регуляции ТСА функционируют обособленно от электростатических и связаны с внутриклеточным метаболизмом соединений азота. На наш взгляд, регуляция активности ТСА этими механизмами должна быть связана с цитоплазматическим содержанием продуктов первичной ассимиляции  $NH_3$  (аминокислотами и их амидами). В связи с этим нами было проведено определение качественного и количественного состава свободных аминокислот в растениях с активированной и инактивированной ТСА. Составы свободных аминокислот в клетках *Ch. vulgaris* и корней проростков ячменя или томата заметно различались между собою, в то же время выявляются определенные закономерности изменения содержания отдельных аминокислот и их амидов при активации и инактивации ТСА. Нами зарегистрировано заметное повышение содержания глутамина у растений с инактивированной ТСА, хотя при этом отмечается минимальная концентрация аспарагиновой кислоты. Указанный факт, вероятно, связан не только с особенностями биохимических превращений соединений азота у растений в различных вариантах эксперимента, но и отражает участие продуктов первичной ассимиляции минерального азота в регуляции поступления аммония в растительную клетку. Возможно, именно соотношение концентраций аспарагиновой и глутаминовой кислот является фактором, регулирующим активность ТСА плазмалеммы растительной клетки.

Таким образом, работа автономно функционирующих электростатических и биохимических механизмов регуляции поступления аммония в клетку обеспечивает оптимизацию поглощения минерального азота с учетом особенностей метаболизма при конкретных условиях жизнедеятельности растений.

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ  
ФОСФОРООРГАНИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЯ МЕЛАФЕНА  
НА РОСТ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ КЛЕТОК ХЛОРЕЛЛЫ**

**The investigation of phosphoroorganic compound melafen effect  
on the growth and energetic processes of chlorella cells**

Н.Л. Лосева, О.А. Кашина<sup>1</sup>, А.Ю. Алябьев, Л.Х. Гордон, В.И. Трибунских,  
С.Г. Фаттахов<sup>2</sup>

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань  
E-mail: [loseva@kcn.ru](mailto:loseva@kcn.ru)

<sup>1</sup> Казанский государственный университет, г. Казань

<sup>2</sup> Казанский институт органической и физической химии  
им. А.Э. Арбузова КазНЦ РАН, г. Казань

Большое внимание уделяется изучению механизмов действия природных фитогормонов и их синтетических аналогов, поскольку этим соединениям принадлежит ключевая роль в регуляции жизни растений на всех этапах их онтогенеза.

Цель работы – изучение влияния фосфоорганического препарата мелафена, синтезированного в Казанском институте органической и физической химии им. А.Э. Арбузова, на рост и энергетические процессы одноклеточной зеленой водоросли *Chlorella vulgaris*. Мелафен – меламинавая соль бис(оксиметил) фосфиновой кислоты – обладает низкой молекулярной массой, хорошо растворим в воде и малотоксичен для теплокровных животных ( $LD_{50} = 2000$  мг/кг веса мышей). Препарат имеет в своей структуре фосфорную группу, которая, по мнению химиков, является наиболее активной.

Одним из очень чувствительных процессов в интегральном ответе растительных организмов на любые воздействия является рост, который характеризуется плотностью суспензии, коррелирующая со скоростью развития и деления клеток. Действие мелафена испытывали в диапазоне концентраций: от  $3 \cdot 10^{-6}$  до  $3 \cdot 10^{-10}$  М.

Наиболее эффективно препарат влиял на рост культуры водоросли в концентрации  $3 \cdot 10^{-8}$ – $3 \cdot 10^{-10}$  М. В концентрации  $3 \cdot 10^{-6}$  М оказывал ингибирующее действие на рост клеток суспензии. В дальнейшей работе использовались в основном концентрации мелафена  $3 \cdot 10^{-8}$ – $3 \cdot 10^{-10}$  М.

Поскольку рост является энергозависимым процессом, и мелафен имеет в своей структуре фосфорную группу, способную взаимодействовать с различными биомолекулами, была проведена серия работ, в которой сравнивалось влияние мелафена и АТФ при равных концентрациях на рост культуры. Скорости роста клеток

хлореллы были близки и при действии мелафена в концентрации  $3 \cdot 10^{-8}$ – $3 \cdot 10^{-9}$  М и при действии АТФ в концентрации  $3 \cdot 10^{-9}$  М.

Наши многочисленные экспериментальные данные показали четкое стимулирующее влияние препарата на рост и развитие культуры. Абсолютные значения величин стимуляции роста мелафеном могли колебаться, что зависело от многих причин и, в первую очередь, от физиологического состояния культуры (исходной плотности и т.д.), но сохранялось превышение скорости роста при действии препарата по сравнению с контролем.

Следующим этапом исследования явилось изучение влияния мелафена на скорость энергетических процессов растительной клетки. Скорость фотосинтеза и дыхания измеряли полярографическим методом, который основан на амперометрическом определении поглощенного/выделенного кислорода. По углу наклона полярографических кривых можно рассчитывать количество поглощенного кислорода в единицу времени, т.е. скорость дыхания или же выделенного кислорода, иными словами, скорость фотосинтеза изучаемых объектов.

Мелафен в концентрации  $3 \cdot 10^{-9}$  М оказывал существенное влияние на скорость фотосинтеза, увеличивая скорость выделения кислорода до 24 %. Необходимо отметить и то, что эффект стимуляции скорости фотосинтеза сохранялся в течение длительного времени, практически, в течение всего онтогенетического развития клеток водоросли.

Значительный интерес представляло изучение влияния мелафена на скорость дыхания клеток хлореллы. Наблюдалась стимуляция скорости дыхания хлореллы при действии мелафена по сравнению с контролем. Степень стимуляции поглощения кислорода зависела от концентрации мелафена. Так, при концентрации мелафена  $3 \cdot 10^{-8}$  М интенсивность дыхания увеличивалась на 4, а при концентрации мелафена  $3 \cdot 10^{-9}$  М – на 18 % к 4 ч воздействия. Через 12 ч разница была еще больше – на 14 и 21 % соответственно.

Итак, экспериментально было показано, что мелафен оказывал значительное влияние на увеличение скорости энергетических процессов как фотосинтеза, так и дыхания. Об эффективности использования энергии можно судить по скорости теплопродукции. Выделение метаболического тепла является интегральным показателем физиологического состояния растительной клетки, так как отражает взаимодействие всех функциональных систем организма, все изменения, связанные с анаболическими и катаболическими процессами в клетках. Именно скорость теплопродукции характеризует эффективность использования энергии, являясь мерой потери энергии из тканей в среду.

Скорость тепловыделения в вариантах с мелафеном оставалась выше контроля на всем протяжении опыта и зависела от концентрации мелафена: при концентрации  $3 \cdot 10^{-8}$  М – на 50, при концентрации  $3 \cdot 10^{-9}$  М – на 70 % за 1 ч, на 45 и 70 – за 2 ч, на 25 и 56 – за 3 ч соответственно. Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод о положительном влиянии препарата на энергетический баланс растительных клеток. Дополнительная энергия, образованная при триггерном действии мелафена на клетку, является основой ускорения метаболических процессов клеток хлореллы, что, в свою очередь, отражается на скорости роста культуры.

Из всего вышесказанного можно заключить, что препарат мелафен является перспективным регулятором роста растений и требует дальнейшего изучения.

#### РУТИНОЗА – НОВЫЙ ТРАНСПОРТНЫЙ ДИСАХАРИД У РАСТЕНИЙ?

##### Is rutinose a novel transport carbohydrate in plants?

А.Н. Мельникова<sup>1,3</sup>, Н.С. Мамушина<sup>1</sup>, Е.К. Зубкова<sup>1</sup>, Д.Р. Баташев<sup>1</sup>,  
Ю.В. Гамалей<sup>1</sup>, О.В. Войцеховская<sup>1</sup>, К. Pawlowski<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Stockholms universitet, Botaniska institutionen, Stockholm

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург

Исследования углеводного метаболизма у *Datisca glomerata* (Datiscaseae) показали, что в органах этого растения накапливаются два необычных дисахарида: рутиноза (альфа-L-рамнопиранозид-(1→6)- D-глюкоза) и метилрутиноза (альфа-L-рамнопиранозид-(1→6)-1-O-альфа-D-метилглюкоза) (Schubert et al., 2002). Рутиноза в растительном мире встречается в составе гликозидной части рутина, но как свободный дисахарид впервые была обнаружена у *D. glomerata*, а метилрутинозу ранее в растениях не находили. Чтобы рассмотреть вопрос, являются ли эти углеводы транспортными сахарами у *D. glomerata*, мы исследовали состав сахаров в экссудатах черешков листьев и апопласте листьев *D. glomerata*. Одновременно было изучено строение терминальной флоэмы *D. glomerata* методом ТЭМ. Оказалось, что как в экссудатах, так и апопласте листьев присутствуют рутиноза и сахароза. Это согласуется со структурой клеток-спутников флоэмных окончаний листа: по организации терминальной флоэмы *D. glomerata* относится к примитивному апопластому типу, т.е. сахара у этого растения могут загружаться во флоэму, главным образом, из апопласта с помощью мембранных транспортеров. Таким образом, можно предположить, что значительная доля углерода (по предваритель-

ным данным от 10 до 60 % от общего транспортируемого углерода) у *D. glomerata* транспортируется по флоэме в виде рутинозы. Это было бы довольно необычным явлением, поскольку рутиноза – восстанавливающий дисахарид, а по флоэме поставляются нередуцирующие сахара. Для того, чтобы определить, участвует ли рутиноза в транспорте ассимилятов у *D. Glomerata*, мы исследовали распределение  $^{14}\text{C}$  между различными углеводами в листьях и черешках после экспозиции растений в атмосфере  $^{14}\text{CO}_2$  в динамике, т.е. в интервалы от 0 до 24 час после экспозиции. Для этого нами была отработана методика тонкослойной хроматографии и радиохимического анализа применительно к составу сахаров у *D. glomerata*. В докладе будут представлены результаты данного исследования.

#### ВЛИЯНИЕ СВЕТОВОГО РЕЖИМА НА ВЕЛИЧИНУ ФОТОАКТИВАЦИИ ФЕРРЕДОКСИН-НАДФ<sup>+</sup> ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

##### Effect of light growth conditions on photoactivation of ferredoxin-NADP<sup>+</sup>oxidoreductase

М.К. Николаева

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: vamsa@mail.ru

Терминальный компонент электрон-транспортной цепи фотосинтеза, ферредоксин-НАДФ<sup>+</sup> оксидоредуктаза (ФНР), катализирует обратимый перенос электронов между ферредоксином и НАДФ. В последние годы показано также, что ФНР участвует в циклическом переносе электронов от восстановленного НАДФ к переносчикам, расположенным между двумя фотосистемами (Vojko et al., 2003). ФНР принадлежит к числу хлоропластных ферментов, активность которых регулируется светом. Индуцируемая светом активация ФНР является одной из важных реакций в системе динамической регуляции электрон-транспортной цепи фотосинтеза. Несмотря на значительные успехи в изучении структуры и свойств ФНР, вопрос о механизме световой регуляции активности этого фермента остается открытым.

Цель настоящей работы – изучение влияния светового режима при выращивании растений на величину фотоактивации ФНР. Опыты проводили с хлоропластами, выделенными из растений бобов, выращенных при 8, 80 и 120 Вт/м<sup>2</sup>. Хлоропласты освещали красным светом интенсивностью 160 Вт/м<sup>2</sup> в течение 2-3 мин. и

определяли НАДФН-диафоразную активность ФНР. Контролем служила активность ФНР хлоропластов, находившихся в темноте. Было показано, что величина фотоактивации ФНР зависит от предварительной световой подготовки растений. Наибольшее увеличение активности фермента происходило при освещении хлоропластов растений, выращенных при низкой интенсивности света ( $8 \text{ Вт/м}^2$ ). Перестановка растений с  $8 \text{ Вт/м}^2$  на более интенсивный свет ( $100 \text{ Вт/м}^2$  на 72 ч) приводила к снижению степени фотоактивации ФНР.

Ранее мы обнаружили различия между листьями разных световых вариантов в скорости накопления окисленного Р700 при освещении предварительно затемненных листьев (Николаева и др., 2005). Известно, что окисление Р700 при освещении предварительно затемненных листьев отражает процесс световой регуляции различных систем фотосинтетического аппарата, в том числе и активацию ФНР (Harbinson, Hedley, 1993). Результаты настоящей работы, а также проведенного ранее исследования фотоиндуцированного окисления Р700 в листьях растений бобов разных световых вариантов позволяют предполагать, что существуют различия в регуляторных процессах, обеспечивающих фотоактивацию ФНР у растений, выращенных на свету разных интенсивностей.

Изучали также влияние обработки хлоропластов трипсином на процесс фотоактивации ФНР. Известно, что трипсин не гидролизует ФНР, однако нарушает связь фермента с мембраной, приводя к его солюбилизации (Forti et al., 1983). Изолированные хлоропласты подвергали «мягкой» обработке трипсином в течение 2 мин. при  $22^\circ\text{C}$ . Затем добавляли 10-кратный избыток ингибитора трипсина и определяли активность нециклического переноса электронов, а также активность ФНР после трехминутного освещения хлоропластов. Показано, что обработка трипсином ингибировала нециклический перенос электронов, тогда как ФНР теряла способность к фотоактивации. Полученные результаты дополняют имеющиеся в литературе данные о том, что сохранение взаимосвязи ФНР с мембраной, как и структуры самой мембраны, являются необходимыми условиями осуществления процесса фотоактивации ФНР.

Работа поддержана грантом РФФИ (06-04-48326-а).

**УГЛЕВОДНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ И АНОМАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ПРОВОДЯЩИХ ЭЛЕМЕНТОВ ФЛОЭМЫ И КСИЛЕМЫ****Carbohydrate metabolism and abnormal development of phloem and xylem conductive elements**

Л.Л. Новицкая

Институт леса Карельского НЦ РАН, г. Петрозаводск  
E-mail: [novits@krc.karelia.ru](mailto:novits@krc.karelia.ru)

Одна из важных фундаментальных проблем физиологии древесных растений заключается в выявлении механизмов регуляции их роста и развития, поиске путей эффективного управления этими процессами. Большой интерес в данной связи имеет изучение физиолого-биохимических аспектов формирования структурных аномалий проводящих тканей дерева – флоэмы и ксилемы.

Исследования проводили на формах березы повислой с типичной для вида прямослойной структурой древесины (*Betula pendula* var. *pendula* – обычная береза) и с аномальной узорчатой древесиной (*B. pendula* var. *carelica* – карельская береза). Рисунок древесины карельской березы во многом обусловлен наличием темноокрашенных включений, представляющих собой крупные аномальные прослойки паренхимных клеток; в проводящей флоэме имеет место склерификация ситовидных трубок, которая заключается в отложении очень толстых лигнифицированных оболочек.

Установлено, что для растений березы с узорчатой текстурой древесины, в отличие от обычной березы, характерно повышенное содержание сахарозы в проводящей флоэме. Учитывая известную морфогенетическую роль сахарозы, было высказано предположение, что ее высокий уровень может быть причиной наблюдаемых структурных аномалий. Проверка этой гипотезы включала серию экспериментов по созданию зон избыточного содержания сахарозы в тканях ствола обычной березы и слабоузорчатой карельской березы. Их результатами были усиление насыщенности рисунка древесины у карельской березы и появление всего комплекса характерных аномальных структур у обычной березы повислой.

Влияние сахарозы на цитогенез проводящих тканей может осуществляться через несколько регуляторных механизмов. Во-первых, сама сахароза влияет на активность и образование расщепляющих ее ферментов. Во-вторых, продукты расщепления сахарозы по принципу обратной связи могут оказывать репрессирующее действие на синтез инвертазы и сахарозосинтазы. Результаты экспериментов по введению в ткани ствола березы растворов экзогенных сахаров указывают на то, что индукция аномального



камбиального роста связана с повышением уровней самой сахарозы и продуктов ее расщепления – УДФ-глюкозы и фруктозы. Другой продукт расщепления сахарозы – глюкоза, даже в очень высоких концентрациях (20 %) изменения программы развития клеток не вызывает. Это свидетельствует о большом резерве использования моносахарида в камбиальной зоне и находится в соответствии с данными о высокой метаболической активности глюкозы, которая обычно не накапливается в зонах активного роста. То же можно сказать и об УДФ-глюкозе. Фруктоза намного медленнее, чем глюкоза и УДФ-глюкоза, вовлекается в метаболизм. Пути ее метаболизации в клетке начинаются с образования фруктозо-6-фосфата, который через серии ферментативных реакций может включаться в энергетический обмен, пентозофосфатный цикл, синтез крахмала, образование УДФ-глюкозы и, следовательно, синтез структурных полисахаридов клеточной стенки.

Таким образом, поступление сахарозы в камбиальную зону сопровождается ее интенсивным расщеплением в инвертазной и сахарозсинтазной реакциях с образованием глюкозы, УДФ-глюкозы и фруктозы. Глюкоза и УДФ-глюкоза активно используются в новообразовании клеток камбиальной зоны и отложении крахмала, фруктоза же частично используется, частично накапливается в ткани. При увеличении ее количества до определенного уровня происходит вовлечение фруктозы в дополнительный синтез УДФ-глюкозы, что сопровождается образованием склерейд – клеток с очень толстыми целлюлозными оболочками.

Судя по изменению характера дифференциации клеток в опытах с введением высоких концентраций фруктозы (образование склерейд не наблюдается, происходит сильное расширение древесных лучей в зоне дифференциации молодой ксилемы, формируются прослойки паренхимных клеток), появление большого избытка фруктозы, очевидно, подавляет расщепление сахарозы и приводит к ее интенсивному радиальному оттоку по лубо-древесным лучам вплоть до слоев молодой ксилемы, клетки которой еще не утратили способности к делению, а оболочки клеток – к растяжению. Это предположение находится в соответствии с данными об ингибирующем действии фруктозы на образование инвертазного белка, т.е. о репрессии фруктозой гена, ответственного за синтез инвертазы. С другой стороны, избыток фруктозы в камбиальной зоне может быть использован для ресинтеза сахарозы, которая по градиенту концентрации также перемещается в радиальном направлении в более глубокие слои ствола и переориентирует дифференциацию элементов ксилемы на формирование клеток запасающей паренхимы.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ (грант 05-04-49932а).

**БИОСИНТЕЗ НОВОГО ОКСИЛИПИНА – ЦИКЛОПЕНТЕНОНА  
CIS-12-ОКСО-10-ФИТОЕНОВОЙ КИСЛОТЫ В КОРНЯХ ПОДСОЛНЕЧНИКА****Biosynthesis of novel oxylipin cyclopentenone  
*cis*-12-oxo-10-phytoenoic acid in sunflower roots**

А.В. Огородникова, Л.Ш. Мухтарова, Ф.К. Мухитова, А.Н. Гречкин  
Казанский институт биохимии и биотехнологии РАН, г. Казань  
E-mail: [anyuta\\_ogorodnik@mail.ru](mailto:anyuta_ogorodnik@mail.ru)

Липоксигеназный путь превращения мембранных липидов в настоящее время можно считать самостоятельной сигнальной системой. Образование оксигенированных производных жирных кислот – оксилипинов – является результатом включения липоксигеназной системы. Продукты липоксигеназного каскада являются высокоэффективными биорегуляторами. Большинство из них участвует в создании устойчивости растений к патогенам и другим неблагоприятным факторам среды. Семейство оксилипинов насчитывает многие десятки соединений, причем постоянно появляются сообщения об открытии новых его представителей. Со дня открытия первого циклического оксилипина прошло более 20 лет. Однако некоторые особенности контроля циклизации окисей аллена и ее механизмов остаются предметом дискуссии.

Проведенная серия экспериментов с корнями подсолнечника показала пример образования нового оксилипина циклопентеноновых производных из линолевой кислоты и ее гидроперекиси. Полученные результаты демонстрируют, что основным направлением липоксигеназного каскада в корнях подсолнечника является биосинтез *cis*-12-оксо-10-фитоеновой кислоты (*cis*-12-оксо-ФЕК), который является предшественником фитогормона жасмоновой кислоты и родственных C<sub>12</sub>-соединений (жасмоноидов). В данном случае субстратом для образования *cis*-12-оксо-ФЕК служила линолевая кислота и ее 13-гидроперекись. Субстрат практически полностью превращался в *cis*-12-оксо-ФЕК.

Путь биосинтеза *cis*-12-оксо-ФЕК, обнаруженный в корнях подсолнечника, состоит из двух этапов: на первом происходит превращение жирной кислоты или ее гидроперекиси в окись аллена, а на втором – циклизация этой окиси аллена с образованием *cis*-12-оксо-10-фитоеновой кислоты, катализируемая алленоксидциклазой.

Были проведены эксперименты с разной концентрацией фильтрата гомогената корней подсолнечника в реакционной смеси, которые показали, что степень разбавления фильтрата гомогената корней подсолнечника, влияет на выход *cis*-12-оксо-ФЕК по отно-

шению к другим продуктам реакции (*α*-кетолу). Также проводились эксперименты инкубации гомогената с разными субстратами: линолевая кислота и ее 13- и 9-гидроперекисями. Они свидетельствовали о специфичности данной растительной липоксигеназы при окислении линолеата в положении С-13 (13-липоксигеназа). В ходе работы было обнаружено влияние возраста корней подсолнечника на образование *cis*-12-оксо-ФЕК. Показано, что 1.5-3-суточные корни подсолнечника являются наиболее активными в биосинтезе *cis*-12-оксо-ФЕК по сравнению с шести-семисуточными. Представлены данные анализа биосинтеза *cis*-12-оксо-ФЕК, полученные методом ВЭЖХ, GSMS, ЯМР.

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ПРИРОДА СИНЕРГИЧЕСКОГО УСИЛЕНИЯ  
ФИТОТОКСИЧНОСТИ ГЕРБИЦИДОВ –  
ИНГИБИТОРОВ АЦЕТИЛ-КОА-КАРБОКСИЛАЗЫ**

**Physiological nature of synergistic increasing  
of acetyl-CoA-carboxylase inhibitor herbicides phytotoxicity**

**Л.В. Озерова, В.В. Швартау**

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, г. Киев  
E-mail: [ozet1980@mail.ru](mailto:ozet1980@mail.ru)

Сильное засорение пахотных земель злаковыми сорняками обуславливает широкое применение граминицидов – ингибиторов ацетил-КоА-карбоксилазы (АКК) классов циклогександионов и арилоксифеноксипропионовой кислоты, а также актуальность исследований по усилению эффективности химического контроля злаковых сорняков. Поэтому изучали возможные механизмы усиления фитотоксичности граминицидов для определения условий проявления синергизма во взаимодействии и повышения фитотоксичности препаратов и их смесей.

В условиях вегетационных экспериментов подтверждены данные о синергическом взаимодействии между феноксапропом и флуазифопом в отношении чувствительного и среднеустойчивого видов злаков (овес и ячмень, соответственно). Впервые установлен синергизм при взаимодействии граминицидов разных химических классов: феноксапропа и тепралоксидима, а также флуазифопа и тепралоксидима.

Показана зависимость уровня взаимодействия феноксапропа и флуазифопа от фона питания злаковых растений. Активность феноксапропа и флуазифопа снижается при недостатке основных элементов питания в почве. Повышение уровня питания, прежде всего азотом, обуславливает возрастание фитотоксичности смесей,

при этом наблюдается изменение аддитивного взаимодействия на синергичное. Зависимость синергизма во взаимодействии феноксапропа и флуазифопа от условий питания растений можно объяснить ускорением роста и развития злаковых сорняков, что является условием эффективного действия граминицидов.

Для раскрытия физиологических аспектов действия граминицидов и их смесей изучили изменение пигментного состава растений и реакцию ферментов детоксикации после обработки ингибиторами АКК.

Уже в первых работах по изучению механизма действия граминицидов отмечалось, что они снижают содержание пигментов в листьях чувствительных растений. Нами показано, что граминициды отличаются по влиянию на пигментный состав листьев злаков. Феноксапроп и флуазифоп снижали содержание хлорофилла *a* на 50, *хл b* – на 50 и 40 % соответственно. Тепралоксидим влиял в меньшей мере – 35 %-ное снижение содержания *хл a* и 30 %-ное – *хл b*. Следует отметить синергичное уменьшение содержания хлорофиллов *a* и *b* (на уровне 90 %) при использовании смеси феноксапроп + флуазифоп. Поэтому для оценки фитотоксического действия граминицидов и определения уровня их взаимодействия можно проводить детектирование содержания пигментов в листьях растений.

Исследовано действие граминицидов и других соединений на содержание цитохром-Р450-зависимых монооксигеназ (цит-Р450) в этиолированных колеоптилях пшеницы. Подтверждены данные по индуцирующему действию 1,8-нафталевого ангидрида (НА) на ферменты этой группы. Показано, что феноксапроп и флуазифоп снижают содержание цит-Р450, повышенное обработкой НА, до контрольного уровня – около 20 мМ/г белка. Активность тепралоксидима была противоположной.

После обработки проростков пшеницы смесями граминицидов феноксапроп + флуазифоп и флуазифоп + тепралоксидим содержание цитохром-Р450-зависимых монооксигеназ снижалось почти до контрольного уровня, что свидетельствует о тенденции к аддитивности во взаимодействии граминицидов на уровне ферментов метаболизма ксенобиотиков. Вероятно, синергизм во взаимодействии граминицидов обусловлен изменениями в содержании цит-Р450, а регуляторы активности монооксигеназных систем могут быть синергистами и антидотами граминицидов.

Таким образом, разработаны высокоэффективные смеси граминицидов – ингибиторов АКК, определены особенности проявления их действия и условия для реализации синергизма. Очевидно, что механизм действия современных граминицидов имеет сложный кооперативный характер, который реализуется, в частности,

на уровне цит-Р450: блокируя индукцию активности цит-Р450, флуазифоп и феноксапроп, снижают потенциальную способность чувствительных растений к детоксикации.

### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МИНЕРАЛЬНОГО И УГЛЕРОДНОГО ОБМЕНА В ПРОЦЕССАХ ИОННОГО ГОМЕОСТАТИРОВАНИЯ У ГЛИКОФИТОВ

#### Mineral and carbon metabolism interactions in course of ion homeostasis maintenance in glycophytes

Н.Г. Осмоловская

Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург  
E-mail: [natalia@no2704.spb.edu](mailto:natalia@no2704.spb.edu)

Гомеостатирование параметров внутренней среды, включая параметры ионного состава, достигаемое посредством формирования и поддержания ионного гомеостаза в компартментах растительной клетки, является одним из фундаментальных свойств растительного организма, определяющих устойчивость его функционирования как целостной биологической системы. В последние годы внимание исследователей сосредоточено на расшифровке молекулярно-генетических механизмов транспорта ионов на плазмалемме и тонопласте, обеспечивающих цитозольный гомеостаз как основных минеральных ионов ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $NO_3^-$ ), так и потенциально токсичных ( $Na^+$ ,  $Cl^-$ , ионы тяжелых металлов), в том числе в условиях засоления или дефицита ионов в среде. Однако не менее существенным, особенно для гликофитов, представляется вопрос об участии в процессах ионного гомеостатирования продуктов углеродного метаболизма, в частности, анионов органических кислот. Одним из аспектов этой проблемы является функциональная взаимосвязанность обмена органических кислот с процессами азотного метаболизма в растениях, рассматриваемая как с точки зрения регулирования формой источника азота соотношения синтеза и расходования органических кислот, так и с позиции участия органических кислот в работе биохимического рН-стата и в компенсации избытка катионов, возникающего при ассимиляции нитратного азота в клетках листа. Однако применительно к гликофитам важное значение приобретают и другие аспекты, связанные с контролируемой аккумуляцией калиевых солей органических кислот как основы поддержания тургора в клетках гликофитов; ролью обмена органических кислот при формировании калиевого гомеостаза в цитозоле; наличием рециркуляции калия в виде

$K^+ + NO_3^- / K^+ + \text{малат}$  в системе корень/побег; сопряженностью кальцефильного обмена минеральных катионов с высокой аккумуляцией органических кислот; регулируемым формированием пулов растворимых и нерастворимых солей щавелевой кислоты у растений с оксалатным типом обмена органических кислот и др. Эти вопросы рассматриваются нами на основе анализа литературы и собственных экспериментальных данных, полученных при исследовании характера ионного гомеостаза в надземных органах гликофитов разной таксономической принадлежности, отличающихся типом обмена органических кислот, и в зависимости от фазы онтогенеза (ювенильный, зрелый, стареющий) и функционального состояния (акцептор, донор) листа.

В докладе обосновывается концепция приоритетной роли обмена органических кислот в процессах формирования ионного состава и ионного гомеостаза в надземных органах гликофитов. На примере разных таксонов показана общая закономерность преобладания водорастворимых органических анионов над минеральными в клетках гликофитов уже в фазу ювенильного листа и ее сохранение в онтогенезе. В основе отмеченной тенденции, наряду с онтогенетически-регулируемой направленностью обменных процессов (акцептор-донор), по-видимому, лежат структурно-морфологические изменения клеток листа в онтогенезе, а именно увеличение вакуолярного компартмента, который становится основным местом сосредоточения пулов минеральных и органических солей. У большинства исследованных гликофитов концентрация  $K^+$  в клетках  $K^+$ -обеспеченных растений удерживалась на относительно постоянном уровне в ходе онтогенеза, свидетельствуя о близости концентраций вакуолярного и цитозольного  $K^+$ , тогда как содержание двухвалентных катионов возрастало в онтогенезе параллельно с увеличением пула карбоксилатов. У растений с преимущественным обменом органических кислот по типу ДТК в большей степени накапливались водорастворимые соли, при этом низкие константы ионизации комплексов  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  с ДТК, очевидно, существенны для обеспечения осмотической функции вакуоли. В листьях растений с оксалатным типом обмена органических кислот это достигалось через преимущественное формирование запасных пулов нерастворимого оксалата  $Ca^{2+}$  (и  $Mg^{2+}$ ).

Таким образом, в отличие от галофитов, ионный состав клеток которых в значительной степени образован засоряющими минеральными ионами, у гликофитов он формируется преимущественно за счет солей органических кислот. Видоспецифические особенности ионного состава листьев гликофитов на разных этапах их онтогенеза позволяют говорить, что обмен минеральных катионов и их участие в процессах ионного гомеостатирования у гли-

кофитов во многом обусловлены генотипическими функциональными особенностями углеродного метаболизма, ведущего к накоплению либо кислот цикла ДТК, либо щавелевой кислоты.

**РАЗОБЩЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИЙ  
ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ: УЧАСТИЕ БЕЛКОВ-  
ПЕРЕНОСЧИКОВ**

**The oxidative phosphorylation uncoupling of winter wheat mitochondria  
by fatty acids: the participation of carrier proteins**

**Н.Ю. Пивоварова, О.И. Грабельных, Т.П. Побежимова, А.В. Колесниченко,  
В.К. Войников**

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск  
E-mail: [natasha\\_pivo@pisem.net](mailto:natasha_pivo@pisem.net)

Жирные кислоты (ЖК) являются природными разобщителями окислительного фосфорилирования, один из механизмов действия которых связан с функционированием белков внутренней митохондриальной мембраны, таких как АДФ/АТФ-антипортер и разобщающие белки («*UnCoupling Protein*», UCP). Разобщение окислительного фосфорилирования митохондрий, обусловленное действием жирных кислот, имеет значение как адаптивный к действию холода механизм. В настоящей работе изучена способность C<sub>12</sub>-C<sub>24</sub> насыщенных и ненасыщенных жирных кислот разобщать процессы окисления и фосфорилирования в митохондриях озимой пшеницы и определено участие в этом процессе АДФ/АТФ-антипортера и разобщающего белка PUMP («*Plant Uncoupling Mitochondrial Protein*»). В качестве ингибитора АДФ/АТФ-антипортера использовали 1 мкМ карбоксиатрактилазид (КАТ), а ингибиторами UCP-подобных растительных разобщающих белков явились 0.5-2 мМ ГТФ, ГДФ, АТФ, АДФ.

Показано, что такие насыщенные ЖК, как С 12:0; С 16:0; С 18:0 и ненасыщенные ЖК, такие как С 18:1 (n-9 *цис*), С 18:1 (n-12 *цис*), С 18:2 (n-9, 12), С 18:3, С 22:1 (n-9 *цис*) вызывают разобщение окислительного фосфорилирования митохондрий, т.е. усиление скорости нефосфорилирующего дыхания (V<sub>4</sub>) и снижение величины коэффициента дыхательного контроля (ДК), и набухание органелл. Установлено, что насыщенные жирные кислоты являются менее эффективными разобщителями окислительного фосфорилирования по сравнению с ненасыщенными. Наиболее выраженный эффект среди насыщенных ЖК отмечали для пальмитиновой кислоты (С 16:0), которая вызывала двукратную стимуляцию V<sub>4</sub> и двукратное увеличение степени набухания митохондрий

(по сравнению с митохондриями, инкубируемыми без добавления кислоты). Однако при последующем добавлении АДФ к митохондриям, инкубируемым с изучаемыми нами насыщенными ЖК, наблюдали снижение эффективности окислительного фосфорилирования во всех препаратах (около 30-50 %-ного снижения коэффициента ДК и отношения АДФ:О). При этом снижение ДК и отношения АДФ:О были также наиболее сильными при добавлении пальмитиновой кислоты. Из ненасыщенных жирных кислот наибольшим разобщающим действием обладали кислоты С 18 ряда, особенно  $\alpha$ -линоленовая (С 18:3), которая вызывала семикратную стимуляцию V4. Увеличение разности оптической плотности митохондриальной суспензии в присутствии  $\alpha$ -линоленовой кислоты через 20 с инкубации было почти в шесть раз больше по сравнению с митохондриями, инкубируемыми без добавления кислоты, а затем снижалось и было в три и 2.5 раза больше через 5 и 10 мин. инкубации соответственно.

Как оказалось, стимуляция скорости нефосфорилирующего дыхания в присутствии насыщенных ЖК обеспечивается функционированием АДФ/АТФ-антипортера, вклад которого в стимуляцию V4 составил около 80-100 %. В отличие от этого в разобщении окислительного фосфорилирования ненасыщенными ЖК в основном принимает участие разобщающий белок PUMP (до 65 % скорости нефосфорилирующего дыхания было чувствительно к ингибиторам этого белка). Полученные результаты свидетельствуют о различии в механизмах разобщения процессов окисления и фосфорилирования насыщенными и ненасыщенными жирными кислотами в митохондриях озимой пшеницы. Участия данных белков в разобщении, вызванном добавлением эруковой (С 22:1, n-9 *цис*) и нервоновой (С 24:1, n-9 *цис*) кислот, не наблюдали.

Таким образом, разобщающая активность жирных кислот и их влияние на набухание митохондрий зависят от длины цепи жирной кислоты, присутствия и количества двойных связей в ней. Разобщение окислительного фосфорилирования в митохондриях и набухание в присутствии жирных кислот являются взаимосвязанными процессами. Механизм эффективного разобщения окислительного фосфорилирования жирными кислотами в митохондриях озимой пшеницы связан с функционированием белков-переносчиков внутренней митохондриальной мембраны, таких как АДФ/АТФ-антипортер и разобщающий белок PUMP, роль которых в разобщении насыщенными и ненасыщенными жирными кислотами различается.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-4812.2006.4), междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 47, молодежного проекта СО РАН № 115 и Фонда содействия отечественной науке.



**ИЗМЕНЕНИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ МИТОХОНДРИЙ  
В КЛЕТКАХ КОРНЕЙ ПШЕНИЦЫ  
ПРИ СНИЖЕНИИ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ**

**Ultrastructural changes of mitochondria  
in wheat roots cells when functional activity in decreased**

**А.А. Пономарева, Е.Н. Буфетов, О.О. Поныгалова**  
Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань  
E-mail: [ponomareva@mail.knc.ru](mailto:ponomareva@mail.knc.ru)

Митохондрии являются органеллами, которые не только обеспечивают клетку энергетическими ресурсами, но и играют ключевую роль в регуляции генерации активных форм кислорода, являются неотъемлемым звеном в работе сигнальных систем клетки, участвуют в запуске и развитии апоптоза и т.д. К настоящему времени достаточно подробно изучены состав и пространственное расположение всех комплексов электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий. Хотя вопрос взаимодействия разных путей переноса электронов при изменении функциональной активности органелл и их взаимосвязь с конформационным состоянием митохондрий все еще мало изучен. Исследовали изменения в ультраструктурной организации митохондрий при снижении их функциональной активности.

В работе использовали соединения, которые непосредственно влияют на работу ЭТЦ митохондрий: ингибитор I комплекса ЭТЦ – ротенон (10 мкМ), ингибитор II комплекса ЭТЦ – малонат (15 мМ), ингибитор АТФ-синтазы – олигомицин (50 мкМ), протонофор – карбонилцианид-3-хлорфенилгидразон (СССР, 5 мкМ). Все вышеперечисленные соединения вызывали снижение интенсивности поглощения кислорода клетками отсеченных корней пшеницы в первые часы воздействия (1-4 ч), которое затем переходило в стимуляцию дыхания (5-6 ч). Однако на ультраструктурном уровне происходили более разнообразные изменения, затрагивающие всю внутриклеточную организацию клетки, что особенно ярко выразилось в перестройках митохондрий, которые изменяли не только свою внутреннюю структуру, но и форму. Изначально в клетках нативных корней пшеницы и при их инкубации в контрольной среде митохондрии имеют овальную форму, среднюю плотность матрикса, в котором расположены многочисленные кристы, что соответствует ортодоксальному типу митохондрий. При действии ротенона изменения происходили в течение первого часа. Через 10 мин. наблюдали митохондрии с уменьшенным количеством

крист, через 20 мин. – митохондрии тороидальной (кольцевой) формы, а с 1 по 6 ч – ортодоксальные.

При действии малоната появлялись митохондрии извилистой нехарактерной формы с более светлым матриксом и уменьшенным количеством крист (1 ч), просветленные митохондрии (2 ч), митохондрии сильно увеличены в размерах с электронно-прозрачным матриксом без крист (3 ч), митохондрии нормального размера, но с просветленным матриксом (4 ч), ортодоксальные митохондрии (6 ч).

Таким образом, наличие альтернативных путей переноса электронов по ЭТЦ, минуя I и II комплексы, позволяет митохондриям сохранить свою функциональную активность, восстановить ортодоксальный вид, а клеткам адаптироваться к воздействию как ротенона, так и малоната.

При действии олигомицина наблюдали митохондрии нехарактерной извилистой формы с более светлым матриксом и уменьшенным количеством крист (1 ч), просветленные митохондрии (2 ч), митохондрии сильно увеличены в размерах, матрикс электронно-прозрачный без крист (3-6 ч). Блокирование работы АТФ-синтазы отражается на ультраструктуре митондрий, что проявляется в редукции крист и просветлении органелл. Это приводит к истощению энергетических ресурсов клетки и исключает возможность адаптации.

При действии протонфора наблюдали конденсированные митохондрии (1 ч), митохондрии с просветленным матриксом (2-4 ч), конденсированные митохондрии-кристы расширены, внутренняя мембрана размыта (6 ч). Выявленные изменения обусловлены постепенным проникновением СССР в клетку и его работой сначала на плазмалемме, а затем непосредственно на мембранах митондрий. Отсутствие трансмембранного градиента на мембранах и низкие значения рН цитоплазмы исключают возможность адаптации клеток.

Таким образом, выявлен широкий спектр конформационных изменений митондрий при нарушении работы ЭТЦ на разных ее участках, что позволяет судить о возможных компенсаторных, приспособительных, а также необратимых деструктивных процессах, происходящих в клетках.

**БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ПРОЦЕССОВ  
СВОБОДНОГО ОКИСЛЕНИЯ  
В РАСТИТЕЛЬНЫХ МИТОХОНДРИЯХ**

**Biochemical mechanisms and physiological role  
of free oxidation in plant mitochondria**

**В.Н. Попов**

Воронежский государственный университет, г. Воронеж

E-mail: [pvn@bio.vsu.ru](mailto:pvn@bio.vsu.ru)

Ранее было показано, что клеточное дыхание *in vivo* в норме происходит не только сопряженно с запасанием энергии, но и без такого сопряжения. Второй тип дыхания был назван свободным. Высказано предположение, что свободное окисление участвует в терморегуляторном термогенезе, в образовании или разрушении метаболитов, детоксикации ксенобиотиков и даже (косвенно) в запасании энергии. Предположение, что несопряженное с запасанием энергии окисление дыхательных субстратов через альтернативную оксидазу в растительных митохондриях выполняет функцию защиты клеток от окислительного стресса было подтверждено в проведенных нами экспериментах на изолированных митохондриях из семян гороха и сои. Нами изучались биохимические механизмы и физиологическая роль разобщенного и несопряженного с запасанием энергии электронного транспорта в растительных митохондриях. При исследовании разобщения дыхания в растительных митохондриях жирными кислотами было показано изменение влияния на митохондрии лаурата, карбоксиаттрактилата, аттрактилата, нуклеотидов и БСА после экспозиции клубней картофеля на холоде. Инкубация клубней при 4 °С в течение 48-96 час приводила к увеличению эффекта разобщения, которое снималось добавлением БСА и частично ADP, ATP, UDP, GDP, карбоксиаттрактилатом и аттрактилатом. GDP и UDP были менее эффективны, чем ADP и ATP, а аттрактилат был менее эффективен по сравнению с карбоксиаттрактилатом. Ресопрягающий эффект нуклеотидов отсутствовал в случае их добавления после КАтр. IDP и CDP не вызывали ресопряжения митохондрий, разобщенных жирными кислотами ни в контрольных, ни адаптированных к холоду растениях. Это показывает, что индуцированное холодом разобщение митохондрий жирными кислотами в клубнях картофеля частично опосредовано функционированием ATP/ADP антипортера. Исследованы кинетические характеристики транспорта нуклеотидов и жирных кислот для ATP/ADP антипортера из клубней картофеля.

С помощью иммуноферментного анализа показано наличие в митохондриях картофеля термогенин-подобных разобщающих бел-

ков, но отсутствие карбоксиаттрактант-нечувствительного респиряющего эффекта нуклеотидов позволяет предположить, что их вклад в разобщение митохондрий клубней картофеля жирными кислотами был менее существенным или же данный механизм в растительных митохондриях не чувствителен к нуклеотидам. Полученные данные по механизмам разобщающего действия ЖК в растительных митохондриях и влиянию пуриновых нуклеотидов на ингибирование аконитазы экзогенным пероксидом водорода подтверждают гипотезу об участии разобщающих белков и АТР/АДР антипортера в транспорте протонов и активных форм кислорода (АФК) через мембрану. Это говорит о том, что они играют важную роль в регуляции метаболизма АФК как в организме животных, так и растений.

Кроме того, изучен ферментный состав электронтранспортной цепи митохондрий термогенного растения *Arum orientale*. Показано, что митохондрии, выделенные из термогенных тканей этого растения (в отличие от нетермогенных тканей *A. orientale* или *Zea mays*), обладают исключительно высокими активностями двух несопряженных NADH-дегидрогеназ, окисляющих внутримитохондриальный и цитоплазматический пулы NADH. Высказано предположение, что функционирование полностью несопряженной дыхательной цепи митохондрий, состоящей из несопряженных NADH:хинон оксидоредуктаз и цианид-устойчивой альтернативной хинол-оксидазы, является основным механизмом термогенеза у растений.

Таким образом, нами получены оригинальные данные о механизмах физиологической регуляции индукции активности несопряженного и разобщенного дыхания.

Исследования были поддержаны грантами РФФИ и Президента РФ для молодых докторов наук.

**ВЛИЯНИЕ СВЕТОВОГО РЕЖИМА  
НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ТЕМНОВОГО ДЫХАНИЯ СЕМЯДОЛЕЙ ПРОРОСТКОВ  
ЯСЕНЯ ЗЕЛЕННОГО (*FRACXINUS LANCEOLATA* L.)**

**Light condition influence on dark respiration value  
in *Fracxinus lanceolata* L. cotyledons**

**В.Т. Попова**

Воронежская государственная лесотехническая академия, г. Воронеж  
E-mail: [pvn77@list.ru](mailto:pvn77@list.ru)

Исследование отдельных звеньев клеточного метаболизма является одной из важнейших задач современной биологии. Оно имеет теоретическое и практическое значение, так как позволяет прибли-

зяться к пониманию функционирования растительного организма как целостной системы и благодаря этому создает условия для решения проблем, связанных с повышением устойчивости растений к неблагоприятным факторам.

Долго существовало мнение, что свет подавляет темновое дыхание. Филиппова (1982), Шахов (1983) и Ракитин (2001) систематизировали данные о влиянии света на основные этапы темнового дыхания. Сделано заключение, что окислительный пентозофосфатный путь, гликолиз и окислительное фосфорилирование на свету ингибированы. Однако, учитывая центральное положение данных метаболических путей в обмене веществ растения и их роль в энергообмене, трудно согласиться с утверждением о независимости или полном подавлении процессов дыхания светом.

Объектом исследования служили зеленые и этиолированные семядоли проростков ясеня зеленого (*Fracxinus Lanceolata* L.) двухнедельного возраста.

Изучение влияния светового режима на темновое дыхание в зеленых семядолях проростков ясеня зеленого позволило выявить, что этот процесс является светозависимым.

Было установлено, что в зеленых семядолях при интенсивности освещения 50 Дж/м<sup>2</sup> происходит резкое торможение процесса темнового дыхания. Его величина снижается с 0.08 до 0.045 мг СО<sub>2</sub> мг сырой массы.

Значительная активация дыхания в темноте по сравнению с контрольными растениями объясняется возросшей ролью ЦТК как поставщика энергии для биосинтетических процессов.

Торможение высоким светом интенсивности дыхания связано, скорее всего, с тем, что энергозатраты, необходимые для нормального функционирования растений, полностью покрываются работой фотосинтетического аппарата. Однако полной инактивации ЦТК не происходит, так как в данных условиях его основной функцией является обеспечение оттока ди- и трикарбоновых кислот на анаэробные реакции.

Исследования влияния света на этиолированные проростки представляют большой интерес, так как в данном случае можно изучать непосредственно действия света на дыхательный метаболизм без учета роли фотосинтеза. Это необходимо для проверки результатов, полученных при изучении действия света на изолированные растения. В этиолированных семядолях при их освещении наблюдается значительное падение интенсивности дыхания, что, по-видимому, связано со снижением роли цикла Кребса как поставщика энергии в связи с активацией фотосинтеза.

Интенсивность дыхания этиолированных семядолей, освещен-

ных светом в 25 Дж/м<sup>2</sup>с, снижалась более чем в 1.5 раза, повышение интенсивности составляло всего 0.06 мг СО<sub>2</sub> мг сырой массы.

Это позволяет сделать вывод, что световой режим оказывает влияние на интенсивность светового дыхания. Увеличение освещенности приводит к активации фотосинтетических процессов, что, в свою очередь, позволяет обеспечивать энергетические потребности организма за счет использования световой энергии. Важность дыхательных процессов при этом падает, и следовательно, клетка может частично блокировать этот процесс. Однако полная невозможна из-за того, что этот процесс обеспечивает синтез углеводов и аминокислот.

**УЧАСТИЕ ПРОТЕИНКИНАЗ И ПРОТЕИНФОСФАТАЗ  
ПРИ СТИМУЛИРУЮЩЕМ ВОЗДЕЙСТВИИ НОРАДРЕНАЛИНА  
НА ВОДОНАГНЕТАЮЩУЮ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ КОРНЯ**

**Participation of protein kinases and protein phosphatases  
under stimulating effect of noradrenaline on the root water pumping activity**

М.С. Попова

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: Zhvn@jppras.ru

У отделенных корней этиолированных проростков кукурузы (*Zea mays* L.) нейротрансмиттер норадреналин ( $1 \cdot 10^{-5}$  М) стимулировал экссудацию в среднем на 30 %, увеличивая корневое давление за счет его метаболической составляющей. При этом осмотическое давление экссудата несколько снижалось. Температурный коэффициент ( $Q_{10}$ ) интенсивности экссудации, напротив, увеличивался, что согласуется как с возрастанием абсолютной величины метаболической составляющей, так и ее доли в суммарном корневом давлении.

Для ориентировочного определения путей трансдукции сигнала, индуцируемого при воздействии норадреналина, испытаны ингибиторы двух унифицированных звеньев сигнальных систем – стауроспорин (ингибитор протеинкиназ) и оадаевая кислота (ингибитор протеинфосфатаз). У корней контрольного варианта стауроспорин существенно замедлял, а оадаевая кислота, напротив, ускоряла экссудацию. Это может означать, что протеинкиназы и протеинфосфатазы участвуют в регуляции корневого давления в норме.

Удивляться тому, что ингибитор протеинфосфатаз оказывает

не ингибирующее, а стимулирующее действие на экссудацию не приходится, поскольку протеинфосфатазы дефосфорилируют белки, тем самым освобождая «поле действия» для протеинкиназ. Иными словами, уровень фосфорилированности белков определяется не только «приходной» протеинкиназной, но и «расходной» протеинфосфатазной реакцией; поэтому ооадаевая кислота и оказывает на экссудацию эффект, диаметрально противоположный эффекту ингибитора протеинкиназ стауроспорина, тормозящего экссудацию.

В присутствии стауроспорина в инкубационной среде стимулирующий эффект норадреналина не только полностью снимался, но и интенсивность экссудации уменьшалась настолько, что становилась ниже таковой в контроле. Ооадаевая кислота оказывала прямо противоположное действие – она заметно усиливала стимулирующее действие норадреналина.

Полученные данные делают вероятным участие протеинкиназ и протеинфосфатаз как при регуляции корневого давления в норме, так и при стимулирующем воздействии нейротрансмиттера норадреналина на экссудацию.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 06-04-48522).

#### **УЧАСТИЕ G-БЕЛКОВ ПРИ СТИМУЛИРУЮЩЕМ ВОЗДЕЙСТВИИ НОРАДРЕНАЛИНА НА ВОДОНАГНЕТАЮЩУЮ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ КОРНЯ**

##### **Participation of G-proteins under stimulating effect of noradrenaline on the root water pumping activity**

**М.С. Попова**

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: Zhvn@jppras.ru

В настоящее время принято считать, что G-белки (белки, способные взаимодействовать с ГТФ) принимают участие в функционировании целого ряда сигнальных систем, представляя собой следующее за трансмембранным рецепторным белком звено этих систем.

Для выяснения возможности участия G-белков в трансдукции сигнала при стимулирующем воздействии нейротрансмиттера норадреналина на водонагнетающую деятельность корня применены ингибитор ГТФ-связывающей активности G-белков гуанозинтиодифосфат (GDP $\beta$ S) и стимулятор указанной активности гуанозинтиотрифосфат (GTP $\gamma$ S). Опыты проведены с отделенными корнями

этиолированных проростков кукурузы (*Zea mays* L.), причем помимо обычных корней использованы и так называемые «рукавички». Последние представляют собой корни, у которых полностью удален центральный цилиндр со всеми его ксилемными элементами, по которым обычно осуществляется восходящий водный ток; на месте удаленного центрального цилиндра образуется продолговатая пустая полость. Несмотря на такую операцию, «рукавички» выделяли экссудат значительно интенсивнее, нежели целые корни с неудаленным центральным цилиндром.  $1 \cdot 10^{-5}$  М норадреналин стимулировал экссудацию целых корней в среднем на 30, а у «рукавичек» – на 54 %.

У контрольного варианта (инкубация в воде)  $2 \cdot 10^{-5}$  М GDP $\beta$ S тормозил экссудацию: у целых корней на 33, у рукавичек – на 55 %,  $2 \cdot 10^{-5}$  М GTP $\gamma$ S стимулировал экссудацию целых корней на 36, а рукавичек – на 60 %. Это, прежде всего, может свидетельствовать об участии G-белков в регуляции водонагнетающей деятельности корня в норме. Нетрудно заметить, что «рукавички» реагировали на оба агента значительно сильнее, чем целые корни. То же самое можно сказать и относительно совместного влияния названных агентов с норадреналином на экссудацию. В присутствии GDP $\beta$ S стимулирующий эффект норадреналина не только полностью нивелировался, но уровень экссудации опускался ниже контрольного уровня (т.е. на воде) у целых корней на 19, у «рукавичек» – на 45 %.

В присутствии GTP $\gamma$ S стимулирующий эффект норадреналина заметно усиливался только у рукавичек: с одним GTP $\gamma$ S экссудация составляла 160, с одним норадреналином – 154, а при совместном присутствии GTP $\gamma$ S и норадреналина – 179 % от контроля. У целых корней результаты оказались гораздо более скромными: с GTP $\gamma$ S интенсивность экссудации составила 136, с норадреналином – 129, а при совместном присутствии GTP $\gamma$ S и норадреналина – 134 %.

Полученные результаты могут свидетельствовать, во-первых, об участии G-белков в регуляции водонагнетающей деятельности корня в норме и, во-вторых, об участии G-белков в трансдукции сигнала при стимулирующем воздействии норадреналина на экссудацию, причем это участие гораздо отчетливее выражено у «рукавичек», чем у целых корней. Поскольку экссудация «рукавичек» осуществляется в основном за счет метаболической составляющей корневого давления (как ранее было показано в нашей лаборатории), участие G-белков связано, по-видимому, с функционированием именно этой составляющей.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 06-04-48522).



**РОЛЬ ПУЛОВ ОКСАЛАТА ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ИОННОГО БАЛАНСА В ЛИСТЯХ *AMARANTHUS CRUENTUS* L.****Role of oxalate pools in ionic balance formation in leaves of *Amaranthus cruentus* L.**

Н.Ф. Попова, Л.Н. Кучаева, Н.Г. Осмоловская

Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург  
E-mail: *nata-ly-a@ya.ru*

Особенности ионного гомеостатирования в клетках листа гликофитов, согласно ранее предложенной концепции, в значительной степени определяются формированием пулов органических карбоновых кислот. Для многих видов растений характерно накопление кислот цикла ДТК, тогда как у некоторых растений отмечается присутствие значительных количеств щавелевой кислоты. Высокое содержание щавелевой кислоты и ее солей выявлено в листьях растений рода *Amaranthus*. Нами ранее было показано, что оксалат локализуется в листьях амаранта в двух пулах – водорастворимом (соли  $K^+$  и  $Mg^{2+}$ ) и водонерастворимом (соли  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ ). В литературе традиционно считается, что ионы  $Ca^{2+}$  и  $NO_3^-$  стимулируют синтез щавелевой кислоты для детоксикации избытка кальция и/или нейтрализации ионов  $OH^-$ , образующихся при редукции нитрата, соответственно. Однако не исключена и альтернативная ситуация детерминированности поглощения и аккумуляции катионов характером и направленностью реакций углеродного обмена в клетках листа, в частности, уровнем синтеза либо расходом ими щавелевой кислоты. В связи с этим нами в модельной системе исследовано влияние обеспеченности листьев амаранта кальцием или калием в форме нитратных солей в сочетании с сульфатом магния и условий абсолютного минерального дефицита на аккумуляцию оксалата и баланс растворимых и связанных катионов в клетках листа. Опыты проводились на высечках  $d = 15$  мм из зрелых листьев (пятый-восьмой лист) шестинедельных растений *Amaranthus cruentus* L., выращенных в водной культуре и в течение семи дней предынкубированных на низкосолевого растворе, содержащем все катионы ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) и анионы ( $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $H_2PO_4^-$ ) в концентрации 0.5 мг-экв/л. Высечки наслаивались абаксиальной стороной на растворы, содержащие  $KNO_3 + MgSO_4$  (А) или  $Ca(NO_3)_2 + MgSO_4$  (В) в концентрациях 10 мг-экв/л, либо на дистиллированную воду (контроль). Продолжительность эксперимента – 24 час при непрерывном освещении (12 клк).

Было установлено, что внесение нитрата в среду инкубации стимулировало возрастание уровня растворимого оксалата в листовых высечках на свету, причем более существенно (в 1.5 раза по сравнению с контролем на воде) в присутствии  $\text{KNO}_3$ , чем  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , что сопровождалось повышением содержания  $\text{K}^+$  и  $\text{Mg}^{2+}$  либо только  $\text{Mg}^{2+}$  в водорастворимой фракции листа. При снабжении листьев  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + \text{MgSO}_4$  аккумуляция водорастворимого  $\text{Mg}^{2+}$ , более интенсивная, чем в случае использования  $\text{KNO}_3 + \text{MgSO}_4$ , сопровождалась утечкой  $\text{K}^+$ . Соответственно, есть основания говорить о роли магния как заместителя калия при формировании ионного баланса в листьях амаранта и как антагониста кальция в процессах поступления этих ионов в растительную клетку. Изменения в общем содержании растворимых катионов в целом коррелировали с увеличением уровня растворимого оксалата. При использовании нитрата кальция не наблюдалось преобладания синтеза щавелевой кислоты и ее перехода в нерастворимую фракцию в листе по сравнению с вариантом на нитрате калия, при этом общий уровень нерастворимого оксалата поддерживался на исходном уровне. В обоих случаях пул нерастворимого оксалата поддерживался кальцием и магнием в соотношении 3:1. Парадоксальным на первый взгляд явилось значительное снижение уровней нерастворимого оксалата в контроле на воде по отношению к исходному варианту. Однако этот факт, по-видимому, следует рассматривать как свидетельство возможной индукции процесса утилизации запасного водонерастворимого пула оксалата в стрессовых условиях экзогенного дефицита минеральных элементов, что, вероятнее всего, связано с активацией оксалат-оксидазы, в том числе для поддержания ионного гомеостаза в клетках в условиях стресса. Можно заключить, что в условиях обеспеченности минеральными элементами в листьях поддерживаются относительно устойчивое равновесие ионов и стабильное соотношение свободной и связанной форм оксалата, определяемое интенсивностью его биосинтеза в процессах углеродного метаболизма. В стрессовых условиях дефицита минеральных элементов происходит расходование пулов нерастворимого оксалата для поддержания ионного гомеостаза (в первую очередь, калиевого) в клетках с участием его растворимой формы.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют в пользу наличия зависимости аккумуляции катионов от направленности процессов углеродного метаболизма в листьях растений, в частности, от соотношения реакций анаболизма/ катаболизма щавелевой кислоты в листьях *Amaranthus cruentus* L.

**ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ  
НА ХАРАКТЕРИСТИКИ ФОТОАССИМИЛЯЦИОННОГО АППАРАТА *DUNALIELLA*  
*PRIMOLECTA* И *ANABAENA VARIABILIS***

**Influence of organic substrates on photoassimilation apparatus  
characteristics of *Dunaliella primolecta* and *Anabaena variabilis***

**Р.К. Пузанский**

Биологический НИИ Санкт-Петербургского государственного университета,  
г. Старый Петергоф  
E-mail: [puzansky@yandex.ru](mailto:puzansky@yandex.ru)

Активность процессов фотоассимиляции и диссимиляции у фотоавтотрофов регулируется такими трофическими факторами как интенсивность и качество освещения, и доступность органических субстратов. Присутствие в среде некоторых органических веществ приводит к перестройкам фотосинтетического аппарата водорослей и влияет на интенсивность дыхания и фотосинтеза. Степень и характер этих перестроек зависят от трофической лабильности организма и его частных физиологических особенностей. Цель данной работы состояла в изучении влияния глюкозы, фруктозы, этанола и глицерина на следующие характеристики одноклеточной зелёной водоросли *Dunaliella primolecta* и цианобактерии *Anabaena variabilis*: динамику плотности культуры, содержание фотосинтетических пигментов, рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (Рубиско) и интенсивность дыхания и фотосинтеза.

Культуры *D. primolecta* и *A. variabilis* были получены из коллекции лаборатории Микробиологии БиНИИ СПбГУ. Водоросли культивировали аксенично на минеральных средах при круглосуточном освещении (6000 Лк). Опыты проводили по следующей схеме. До начала эксперимента определяли исходные параметры. В дальнейшем водоросли культивировали без внесения органических соединений (контрольный вариант) или с их добавлением. Через трое суток проводили отбор проб для определения исследуемых характеристик. Все опыты ставили в двух вариантах: с освещением и в темноте, все органические вещества использовали в концентрации 0.5 % (w/v). Количественное определение содержания пигментов проводили спектрофотометрически (СФ-26). Содержание Рубиско определяли путем нативного диск-электрофореза растворимых белков с последующей окраской гелей, сканированием и расчетом количества связанного с белком красителя с помощью комплексов компьютерных программ Adobe Photoshop,

Matlab и Microcal Origin. Интенсивность фотосинтеза и дыхания определяли по динамике концентрации кислорода полярографическим методом с использованием электрода Кларка.

Показано, что ни один из использованных субстратов не оказывает значимого влияния на динамику плотности как растущей, так и стационарной культуры *D. primolecta*, а также на содержание фотосинтетических пигментов в клетках этой водоросли. *A. variabilis* продемонстрировала противоположную реакцию. При постоянном освещении добавление фруктозы в среду культивирования приводит к увеличению скорости роста культуры более чем в два раза, глюкоза обладает менее выраженным положительным эффектом. Кроме того, фруктоза, этанол и, в меньшей степени, глюкоза вызывают снижение содержания хлорофиллов «а» и «b» и каротиноидов в клетках *A. variabilis*. Добавление глицерина и этанола приводит к росту интенсивности фотосинтеза и дыхания у *D. primolecta*. У *A. variabilis* этанол и фруктоза вызывают увеличение интенсивности дыхания, но ослабляют фотосинтез. Возможно, рост интенсивности фотосинтеза у дуналиеллы является неспецифическим результатом повышения концентрации углекислого газа, вызванным усилением дыхания клеток. Добавление глицерина в среду культивирования *D. primolecta* приводит к снижению количества Рубиско в расчете на клетку, но данный эффект наблюдается только в растущих культурах. По-видимому, этот эффект является отражением физиологических особенностей объекта. Представители рода *Dunaliella* являются гипергалинными организмами, и используют значительную часть фиксированного углерода для синтеза глицерина, являющегося основным осмотиком клетки.

Суммируя полученные результаты, можно сделать вывод, что только *A. variabilis* продемонстрировала глубокие изменения фотоассимиляционного аппарата при появлении в среде утилизируемых органических субстратов. Эта цианобактерия является факультативным миксотрофом, и, по-видимому, баланс гетеро- и фототрофии в благоприятных условиях может быть легко смещен в сторону гетеротрофии. Именно переход к миксотрофному питанию вызвал резкое увеличение скорости роста культуры *A. variabilis*. *D. primolecta* является значительно более специализированным фотоавтотрофом и, по-видимому, не обладает лабильностью ассимиляционных систем, свойственной более примитивным фотосинтезирующим организмам.

**ИССЛЕДОВАНИЯ БИОПОТЕНЦИАЛОВ СЕМЯН  
И РЕПРОДУКТИВНЫХ ОРГАНОВ ПШЕНИЦЫ И КУКУРУЗЫ  
В СВЯЗИ С ОБМЕННЫМИ ПРОЦЕССАМИ И ПРОДУКТИВНОСТЬЮ**

**Research of biopotentials of seeds and reproductive organs  
of wheat and corn in connection with metabolic processes  
and productivity**

**М.С. Рубцова, Е.К. Крутова, Ю.Н. Кошишова, С.Б. Федулина**  
Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия,  
г. Нижний Новгород  
E-mail: *elena\_krutova@indox.ru*

Проведенные исследования биопотенциалов колоса пшеницы, выращенной на разном фоне азотных и бактериальных удобрений: колошение, цветение, период формирования зерна, молочной спелости, молочно-восковой спелости, восковой спелости показало, что в период формирования зерна и молочной спелости имеется высокая корреляция этого показателя с продуктивностью ( $-0.78$  и  $-0.87$ ), т.е. чем отрицательнее значения биопотенциалов, тем больше урожай (Рубцова М.С., Крутова Е.К., Терехов М.Б, патент РФ 2222180 от 27 января 2004 г.).

Исследования биопотенциалов семян пшеницы позволили заключить, что биоэлектрическая неоднородность семян внутри сорта тесно связана с качеством белка и содержанием в нем незаменимой аминокислоты лизина. Чем выше положительные значения биопотенциалов зерна (зародыш – эндосперм), тем больше в белке этой аминокислоты (Рубцова М.С., Худякова М.В., патент РФ 2075913 от 27 марта 1997 г.).

Разность биопотенциалов колоса менялась в зависимости от фаз развития, смещалась в отрицательную область значений от фазы колошения к фазе молочной спелости, но в фазе восковой спелости изменения происходили в обратном направлении и биоэлектрические потенциалы колоса становились более положительными. В формировании электрической полярности колоса большую роль играли поступающие в него аминокислоты, изменяя ее в соответствии со знаком своего заряда. Так, поступающая в колос аспарагиновая кислота смещала разность биоэлектрических потенциалов колоса в область отрицательных значений, а аргинин – положительных, что мы контролировали с помощью радиоактивной метки. Скорость поступления аминокислоты зависела от величины транспирации колоса. При ограниченной транспирации поступление аминокислот снижалось.

При набухании семян перед их прорастанием происходила биоэлектрическая негативация зародыша семени (пшеница, кукуруза, рожь, тыква) по отношению к эндосперму и зародышевого корешка по отношению к почечке, после чего наступало прорастание. Невсхожие семена не имели отрицательного колебания биопотенциалов, или они были незначительными. По-видимому, биопотенциалы семян играли немаловажную роль в системе пусковых механизмов прорастания.

Как показали исследования набухающих семян кукурузы, гидролиз запасного белка и динамика выхода аминокислот из алейронового слоя в эндосперм коррелировали с динамикой изменения биопотенциалов семени (зародыш – эндосперм, корешок – почечка зародыша). Корреляция была высокой у семян гетерозисных гибридов, снижалась у семян негетерозисных гибридов и почти отсутствовала у семян, потерявших всхожесть.

#### **СИНХРОННОСТЬ ИЗМЕНЕНИЯ ДИНАМИКИ БИОПОТЕНЦИАЛОВ И АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ В НАБУХАЮЩИХ СЕМЕНАХ КУКУРУЗЫ**

##### **Synchronism of change in dynamics of biopotential and enzymes activity in sprouting seeds of corn**

**М.С. Рубцова, Ю.Н. Кошишова, О.Р. Лебедева**

Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия,  
г. Нижний Новгород  
E-mail: [elena\\_krutova@indox.ru](mailto:elena_krutova@indox.ru)

Исследовали динамику биопотенциалов и активность некоторых металлсодержащих ферментов: аскорбатоксидазы, полифенолоксидазы, пероксидазы, каталазы и АТФазы в набухающих семенах кукурузы селекции Кубанской опытной станции ВИР. Было показано, что активность указанных ферментов синхронно изменялась с биопотенциалами у набухающих семян высокогетерозисных гибридов, отличающихся мощностью ростовых процессов и урожайностью зерна. Семена низкогетерозисных гибридов имели нарушения в согласовании в отдельные периоды набухания. Семena высокогетерозисных гибридов отличались очень активной АТФазой. Отсутствие согласования активности аскорбатоксидазы, полифенолоксидазы, каталазы у набухающих семян с биопотенциалами наблюдали у семян высокогетерозисных гибридов и самоопыленных линий в случае потери всхожести в результате длительного хранения. Активность пероксидазы у потерявших всхожесть семян была снижена, но ее динамика синхронно следовала изменениям биопотенциалов.

Возможно, что в согласовании с динамикой биопотенциалов

была внеклеточная пероксидаза, локализованная в апопласте. В то время как клетка находилась в апоптозе, эта пероксидаза сохраняла свои свойства. Также установлено, что при снижении всхожести семян гибридов и самоопыленных линий происходило четкое изменение биопотенциалов: их значения становились более положительными. При обработке таких семян аскорбиновой кислотой их биопотенциалы приобретали более отрицательные значения и всхожесть возрастала. Установленная связь биопотенциалов набухающих семян кукурузы со всхожестью использована нами для разработки способа контроля с помощью показателя биопотенциалов за жизнеспособностью семян самоопыленных линий, находящихся на хранении. Самоопыленные линии являются ценным исходным материалом в селекции гетерозисных гибридов, но быстро теряют всхожесть вследствие длительного самоопыления. Контроль за физиологическим состоянием семян осуществляется без их повреждения и нарушения метаболических процессов. На этот способ получен патент РФ 2222181 от 27 января 2004 г. (авторы Рубцова М.С., Кошишова Ю.Н.).

Другой, не менее полезный способ сравнительной оценки гетерозиса гибридов кукурузы (по зерну) также разработан нами на основании изучения биопотенциалов набухающих семян гибридов и АТФазной активности (патент РФ 2051570 от 10 октября 1996 г., авторы Рубцова М.С., Таова Л.А. и Лебедева О.Р.). Использование показателя биопотенциалов для диагностики хозяйственно-полезных признаков перспективно потому, что измерения проводятся достаточно быстро, а также очень важно, что органы и ткани не повреждаются и контакт электродов происходит через поверхность этих органов.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГАЛАКТИНОЛСИНТАЗЫ  
ATGOL2 (AC009323) В ЛИСТЬЯХ ARABIDOPSIS THALIANA  
МЕТОДОМ ГИБРИДИЗАЦИИ РНК *IN SITU***

**Expression pattern of galactinol synthase AtGOL2 (AC009323)  
in leaves of *Arabidopsis thaliana***

Е.Л. Рудашевская<sup>1</sup>, Ю.В. Гамалей<sup>1</sup>, К. Pawlowski<sup>2</sup>, О.В. Войцеховская<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Stockholms universitet, Botaniska institutionen, Stockholm

В фундаментальной работе Zimmermann and Ziegler (1975) было установлено, что представители многих семейств двудольных транспортируют по флоэме, наряду с сахарозой, олигосахариды рафинозного ряда (РФО) – рафинозу, а также высшие галактозилы

сахарозы: стахиозу, вербаскозу и др. Сопоставление данных по составу флоэмного сока с анатомией мелких жилок листа обнаружило четкую взаимосвязь между структурой клеток-спутников и типом транспортируемых сахаров (Гамалей, 1984; Turgeon et al., 1993; Flora и Madore, 1993, 1996). Оказалось, что у растений с многочисленными плазмодесменными связями между мезофиллом и флоэмой (тип клеток-спутников загрузочных терминалей флоэмы «intermediary cells») РФО преобладают во флоэмном эксудате. У растений с менее развитыми симпластическими связями между мезофиллом и флоэмой (варианты тип спутников «ordinary cells») доля РФО во флоэме снижается. Растения с малочисленными или отсутствующими плазмодесмами на границе флоэмы и мезофилла (тип спутников «ordinary cells» или «transfer cells») транспортируют почти исключительно сахарозу и лишь изредка – следовые количества раффинозы. К настоящему времени показано, что в зрелых экспортирующих ассимиляты листьях растений «intermediary cells» именно эти клетки являются местом синтеза стахиозы (Holthaus and Schmitz, 1991; Voitsekhovskaja, 2002) и предшественника синтеза РФО галактинола (Sprenger and Keller, 2000). Выказано предположение, что синтез крупных по размеру РФО в «intermediary cells» препятствует утечке сахаров из флоэмы в мезофилл через плазмодесмы и таким образом выступает ключевым звеном в загрузке флоэмы у таких растений (модель «полимеризационной ловушки»; Turgeon, 1991). Однако экспериментальные доказательства справедливости и универсальности модели отсутствуют. В то же время наличие у растений с малочисленными плазмодесмами следовых количеств раффинозы во флоэмном эксудате позволяет выдвинуть предположение о том, что и у этой группы растений синтез раффинозы имеет место в клетках-спутниках загрузочных окончаний флоэмы. Таким образом, весьма вероятно, что синтез РФО во флоэме не ограничен видами с «intermediary cells», свойственен более широкому кругу растений. Однако у растений с низкоразвитыми симпластическими связями между мезофиллом и флоэмой до сих пор не была исследована локализация синтеза РФО на уровне тканей листа.

У *Arabidopsis thaliana* клетки-спутники загрузочных терминалей флоэмы относятся к типу «ordinary cells», и плазмодесменные связи с мезофиллом очень малочисленны (Haritatos et al., 2000). Однако *Arabidopsis* транспортирует, наряду с сахарозой, следовые количества раффинозы во флоэме (Haritatos et al., 2001). Кроме того, гетерологичные промоторы генов, кодирующих ферменты биосинтеза РФО – галактинолсинтазу и стахиозосинтазу – активны в клетках-спутниках флоэмы *Arabidopsis* (Haritatos et al., 2000, Voitsekhovskaja, 2002). В связи с этим мы предположили,



что загрузочные окончания флоэмы этого вида могут быть способны к биосинтезу раффинозы. Галактинолсинтаза катализирует первый этап биосинтеза РФО, используя в качестве субстрата УДФ-галактозу. Поэтому для проверки нашей гипотезы мы исследовали локализацию экспрессии одной из семи изоформ галактинолсинтазы *Arabidopsis* – *AtGOL2* (AC009323) с высоким уровнем экспрессии (Taji et al., 2002) методом гибридизации РНК *in situ* (Long et al., 1996). В докладе будут представлены результаты данного исследования.

#### РОДАМИН 123 КАК МАРКЕР СОСТОЯНИЯ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ И ХЛОРОПЛАСТОВ ПРИ МОДИФИКАЦИИ ДЫХАНИЯ И ФОТОСИНТЕЗА В ПРОТОПЛАСТАХ ЯЧМЕНЯ

##### Rodamine123 as marker of mitochondrial and chloroplast membrane state under modification of respiration and photosynthesis in protoplast of barley

Г.Е. Савченко, В.Н. Макаров, Л.Ф. Кабашникова

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, г. Минск

E-mail: [photobio@biobel.bas-net.by](mailto:photobio@biobel.bas-net.by)

Производные родамина (липофильные катионы) применяют для оценки электрического потенциала мембран митохондрий и локализации этих органелл в клетках животного происхождения (*Scaduto, Grotjohann, 1999*). Критериями накопления зондов во внутренних мембранах митохондрий служат тушение и длинноволновый сдвиг их флуоресценции. В наших исследованиях изменение интенсивности флуоресценции родамина 123 (R123) было использовано для оценки состояния мембран митохондрий и хлоропластов при перекрестном ингибировании дыхания и фотосинтеза в норме и в условиях теплового шока (ТШ, 40 °С, 3 ч). Работу проводили с протопластами из тканей мезофилла листьев семидневных проростков ячменя, выращенных при 16-часовом фотопериоде на белом свете (120 мкмоль квантов м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>) и температуре 22/16 °С (день/ночь). Протопласты сохраняли жизнеспособность (целостность плазмалеммы), оцениваемую по окрашиванию трифенилтетразолхлоридом, в течение нескольких часов при комнатной температуре. Для подавления дыхания *in vitro* и *in vivo* применяли азид натрия (10<sup>-4</sup>–10<sup>-3</sup> М), а для ингибирования фотосинтеза – диурон (10<sup>-8</sup>–10<sup>-7</sup> М). Суспензии протопластов, выравненные по содержанию хлорофилла, инкубировали 15 мин. при 37 °С с R123 (конечная концентрация 2.6·10<sup>-6</sup> М). После удаления несвязавше-

гося зонда центрифугированием протопласты переводили в изотонический буфер и затем выделяли хлоропласты (10 °С, 3700g, 20 мин.) и митохондрии (10 °С, 18000 g, 20 мин.). Степень загрязнения митохондрий обломками хлоропластов, контролируемая по содержанию хлорофилла, не превышала 5 %. Спектры флуоресценции R123 в полученных фракциях регистрировали при комнатной температуре ( $\lambda_{\text{возб.}}$  495 нм) на флуориметре SOLAR LSF 222 (Минск). Состояние мембран внутриклеточных органелл оценивали по величине интенсивности флуоресценции R123 в максимуме (530 нм), нормированной по содержанию общего белка во фракциях, флуоресценцию которого регистрировали после добавления к суспензиям 0.5 % SDS ( $\lambda_{\text{возб.}}$  280 нм,  $\lambda_{\text{рег.}}$  330 нм). В специальных экспериментах было показано, что азид натрия и диурон не влияют на параметры флуоресценции R123 в буфере. Структурные изменения мембран хлоропластов характеризовали по низкотемпературным спектрам флуоресценции протопластов ( $\lambda_{\text{возб.}}$  440 нм).

Сравнение спектров флуоресценции R123 в митохондриях, хлоропластах и клеточной фракции, не содержащей органелл, показало, что зонд включался в обе внутриклеточные органеллы: интенсивность флуоресценции R123 в супернатанте была почти на порядок выше, чем в суспензиях митохондрий и хлоропластов, а ее максимум в последних был одинаков и немного сдвинут в красную сторону. Ингибиторы, введенные прямо в протопласты, влияли на этот процесс по-разному: азид натрия ( $10^{-4}$  М) снижал интенсивность флуоресценции R123 (в расчете на белок) на 20-30 % в митохондриях и хлоропластах, соответственно, а диурон ( $10^{-8}$  М) увеличивал ее в 1.85 и 1.6 раза. В этих же экспериментах обнаружено, что диурон существенно видоизменял состояние хлорофилла. В контрольном образце и после ингибирования дыхания азидом натрия наблюдали три пика флуоресценции хлорофилла (при 688-692, 697-10 и 740-744 нм), а после инкубации протопластов с диуроном полностью исчезала полоса при 740 нм, обусловленная свечением фотосистемы 1. Таким образом, события, вызванные действием диурона на хлоропласты, особенно сильно отразились на связывании R123 с митохондриями.

Если ингибиторы инфильтрировали в листья, то их влияние на состояние пигментов в протопластах и на интенсивность флуоресценции R123 в органеллах было менее выразительным, чем при прямом действии на клетки. При этом азид увеличивал интенсивность свечения зонда в обеих органеллах на 15, а диурон – на 38 и 13 % в митохондриях и хлоропластах соответственно. ТП как таковой практически не влиял на включение R123 в митохондрии и хлоропласты. Однако действие обоих ингибиторов в сочетании с

ТШ оказало более сильное влияние на связывание R123 с хлоропластами: в отсутствие ТШ азид и диурон повышали интенсивность флуоресценции зонда лишь на 15 и 13 % по сравнению с контролем, а после ТШ – на 56 и 37 соответственно. Важно, что и в этих экспериментах удалось наблюдать, что события, происходившие в мембранах хлоропластов, влияли на состояние мембран митохондрий, а нарушения дыхательной функции, вызванные действием азида, существенно изменяли интенсивность свечения R123 в хлоропластах именно в условиях ТШ (рост взаимовлияния органелл в стрессе). Эксперименты пока не дают возможности рассматривать результаты в терминах конкретного изменения величины мембранного потенциала, хотя известно, что накопление зонда, по крайней мере, в митохондриях является потенциал-зависимым процессом. Тем не менее, перспективность использования R123 для характеристики взаимодействия внутриклеточных органелл при стрессе не вызывает сомнений.

#### **РОЛЬ ГЛИКОЛАТОКСИДАЗЫ В РЕГУЛЯЦИИ ФОТОДЫХАТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА У C<sub>3</sub> РАСТЕНИЙ**

##### **Role of glycolate oxydase in regulation of photorespiratory methabolism C<sub>3</sub> plants**

**А.Е. Семенов<sup>1</sup>, А.Т. Епринцев, В.А. Глотов**  
Воронежский государственный университет

<sup>1</sup> Воронежская государственная технологическая академия, г. Воронеж  
E-mail: bc366@bio.vsu.ru

Одним из важнейших направлений физико-химической биологии является изучение координации фотосинтетических и дыхательных процессов. Фотодыхание представляет собой стимулированное светом поглощение кислорода и вызванное этим окисление промежуточных продуктов фотосинтеза с выделением CO<sub>2</sub>. Гликолатный путь включает реакции, протекающие в хлоропластах, пероксисомах и митохондриях, т.е. данный путь является глюконеогенетическим. Многие методы, применяемые для обнаружения фотодыхания в листьях, свидетельствуют о его вариабельности у C<sub>3</sub> и C<sub>4</sub> растений. Ключевым ферментом фотодыхательного метаболизма является гликолатоксидаза (КФ 1.1.3.15). Цель нашей работы – изучение особенностей функционирования гликолатоксидазы в листьях C<sub>3</sub> растений для выявления роли этого фермента в регуляции фотодыхательного метаболизма.

В качестве основных объектов использовали листья гороха с.

Рамонский и сои с. Амфор, Лира и Дельта. Растения выращивали гидропонным методом при температуре 20-22° С, 16-часовом освещении дневным светом интенсивностью 400  $\mu\text{моль квант/м}^2\text{с}$ . Активность гликолатоксидазы (ГО) определяли спектрофотометрически при 324 нм. Очистку фермента осуществляли по разработанной нами схеме, включающей получение тканевого экстракта, гельфильтрацию через сефадекс G-25, ионообменная хроматография с использованием ДЭАЭ-фрактогеля и гельхроматографию на сефадексе G-150. Электрофорез нативного фермента проводили по модифицированной методике Девиса. Для специфического проявления гликолатоксидазы применяли модифицированный реагент Шиффа. Для универсального окрашивания белков использовали метод проявления нитратом серебра.

Регуляторные и кинетические свойства фермента изучали на гомогенных или высокоочищенных препаратах. Константы Михаэлиса-Ментон определяли с использованием линейной аппроксимации по методу Хейнса в координатах  $S/V$  от  $S$ .

Применение пятистадийной очистки позволило получить ферментные препараты из листьев гороха и сои с удельной активностью 1.53-1.89 Е/мг белка. Степень очистки составила от 85 до 130 в зависимости от объекта выделения. Выход очищенного фермента колебался от 3 до 8 % в зависимости от вида растений. Большинство полученных препаратов ГО являлись электрофоретически гомогенными. Электрофоретическая подвижность ГО из разных объектов имела практически одинаковые значения, составившие  $R_f$  0.36.

На очищенных ферментных препаратах исследованы физико-химические и регуляторные свойства ГО. Фермент из обоих видов растений активировался ФМН. Максимальное значение активности наблюдалось при рН 7.8-8.2. При этом оптимумы рН при использовании гликолата и глиоксилата в качестве субстрата примерно совпадают. Но оптимум по глиоксилату для фермента из сои немного смещен в сторону щелочных значений.

Были определены  $K_m$  и  $K_i$  ферментных препаратов, выделенных из гороха и сои. Установлено, что  $K_m$  ГО из гороха по глиоксилату несколько ниже, чем  $K_m$  фермента из сои, однако при использовании глиоксилата несколько выше у фермента из гороха. В листьях сои разница в сродстве к этим двум субстратам менее выражена, чем в горохе, однако относительная максимальная скорость окисления глиоксилата для фермента из сои примерно в три раза ниже, чем для гликолатоксидазы из гороха.

По мнению некоторых авторов, в растениях могут присутствовать разные формы ГО, что объясняется различной агрегацией субъединиц фермента. Однако различий в изоферментом составе

гликолатоксидазы, связанных с субклеточной локализацией и видовой специфичностью, нами не обнаружено.

Таким образом получение высокоочищенных препаратов ГО из листьев некоторых растений позволило исследовать основные кинетические характеристики работы этого ключевого фермента фотодыхательного метаболизма. Предполагается с помощью оператора, идентичного неидеальному реле, использовать полученные данные для создания математической модели функционирования фотодыхания у  $C_3$  растений.

### О ДЫХАНИИ РАННЕВЕСЕННИХ РАСТЕНИЙ УМЕРЕННОЙ ЗОНЫ

#### On the respiration of early spring plants in temperate zone

О.А. Семихатова, О.С. Юдина, О.В. Кирпичникова  
Ботанический институт РАН, г. Санкт-Петербург

Исследования дыхания ранневесенних эфемероидов мы проводили в Петербургском ботаническом саду, где эти растения обитают, как во всей Ленинградской области, среди травостоя под пологом лиственных деревьев. Срок их активной вегетации и цветения – половина апреля и часть мая. Их уникальная способность быстрого роста и развития при низкой температуре вызывают интерес у физиологов, занимающихся проблемами адаптации и устойчивости растений. Однако дыхание этой своеобразной группы видов еще мало изучено, несмотря на то, что именно данные о дыхании важны как для решения вышеназванных проблем, так и для оценки кругооборотов азота и углерода. Изучение дыхания тесно связанного с ростом и продуктивностью растения, представляет и практический интерес, так как многие эфемероиды используются в медицине.

Наши исследования проведены на десяти типичных для весенней синузии видах из трех семейств. Первой задачей было определить дыхательную способность этих видов – ДС, т.е. характерную для каждого вида интенсивность дыхания в период полного цветения при средней температуре местообитания. Определения дыхания листьев проводили манометрическим методом (аппарат Варбурга). В опыте – не менее трех биологических повторностей (при четырех-шести обсчетах показаний прибора в каждой). ДС вычисляли как среднее из всех опытов, проведенных в фазу полного цветения в разные годы и на пробах, взятых в разных частях сада. Относительно большой разброс полученных дан-

ных ( $\pm 15-18\%$  при  $n = 9-12$  биологических повторностей) свидетельствует о лабильности обмена у изученных видов – об их способности к модификационным изменениям дыхания в связи с условиями среды. Температура для определения дыхания была выбрана равной  $13\text{ }^{\circ}\text{C}$  как средняя из проведенных измерений в период цветения объектов. Итак, полученные данные ДС листьев имеют следующие величины, выраженные в  $\text{мг CO}_2$  на  $1\text{ г}$  сырого веса в час: семейство *Liliaceae* – 0.19, *Scilla sibirica* – 0.24, *Erythronium sibiricum* – 0.29, *Chionodoxa luciliae* – 0.22, семейство *Papaveraceae* – *Corydalis bracteata* – 0.44, *Corydalis halleri* – 0.42, семейство *Ranunculaceae* – *Ficaria verna* – 0.18, *Anemone ranunculoides* – 0.51, *Anemone nemorosa* – 0.54. Из приведенных данных видно отмеченное нами ранее (1992 г.) сходство величин ДС у представителей одного и того же рода. Более того, манометрические измерения, проведенные Т.К. Горышиной (1975 г.) в лесостепных дубравах, дали сходные величины ДС у *Scilla sibirica*, *Ficaria verna* и *Corydalis halleri* при  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Подтверждает имеющиеся в литературе указания тот факт, что у однодольных видов ДС ниже, чем у двудольных. Пересчет величин ДС на другую единицу выявляет одну из причин этого различия. При выражении ДС на сухой вес у двудольных видов ДС выше уже не в 2.5, а лишь в 1.3 раза. Следовательно, у двудольных эфемероидов большая оводненность листьев.

Следующей задачей нашего исследования было проследить изменение дыхания в период бутонизации – конец цветения. Здесь использовался показатель Ид – интенсивность дыхания в день проведения измерений (две-три биологические повторности, точность  $\pm 10\%$ ). Оказалось, что у большинства видов Ид редко падает при переходе растения от бутонизации к цветению. Так, например, у *Ficaria verna* и *Corydalis bracteata* ДС снижается на 50, у *Corydalis halleri* – на 40%. Интенсивность дыхания тесно связана с темпом роста растения. Поэтому резкое снижение ИД происходит, когда рост прекращается. Выявленное у эфемероидов падение величины ИД свидетельствует о том, что в конце бутонизации у них кончается период активного роста. Этот факт представляет интерес как одна из черт общей характеристики метаболизма эфемероидов, которая нужна и при использовании некоторых видов в медицинских целях.

Кроме того, изучение динамики изменений Ид вскрыло различие между видами в их отношении к изменениям среды – в нашем случае к резкому похолоданию (от  $13-18$  до  $3-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). При принятой нами методике определения дыхания (при  $\text{const. } t^{\circ} = 13\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) изменения ИД выявляли наличие последствий похолодания

на метаболизме объекта. По-видимому, следует подчеркнуть, что последствие фактора имеет не меньшее значение для растения, чем прямое действие, так как дольше длится и обычно свидетельствует о повреждении обмена. Несмотря на то, что определения Ид проводили у нескольких видов практически одновременно, изменения равного хода дыхания в фазу цветения (постепенного небольшого снижения Ид) было отмечено лишь у некоторых. Временное достоверное снижение Ид происходило у всех трех представителей рода *Corydalis* и не наблюдалось у видов *Gagea* и у *Scilla sibirica*. Обнаруженное различие устойчивости к неблагоприятным условиям у разных эфемероидов, вероятно, связано с другими биологическими особенностями видов – их ареалами или происхождением и, возможно, будет востребовано при изучении этих особенностей как дополнительная информация.

Таким образом, представленный материал о дыхании ранневесенних эфемероидов не только характеризует этот важнейший процесс жизнедеятельности, но и несет дополнительную информацию об особенностях изученных объектов.

#### АНИЗОТРОПИЯ ВОДОПРОНИЦАЕМОСТИ КЛЕТОК КОРНЕПЛОДА *DAUCUS CAROTA* ПО ДАННЫМ ЯМР ТОМОГРАФИИ

##### Anisotropy of water permeability of *Daucus carota* taproot cells measured by MRI

T.A. Сибгатуллин<sup>1, 2</sup>, F.J. Vergeldt<sup>2</sup>, A.B. Анисимов<sup>1</sup>, H. van As<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань

E-mail: [Sibgatullin@mail.knc.ru](mailto:Sibgatullin@mail.knc.ru)

<sup>2</sup> Laboratory of Biophysics and Wageningen NMR Centre,  
Wageningen University, Wageningen

E-mail: [Henk.vanAs@wur.nl](mailto:Henk.vanAs@wur.nl)

Водный статус растений в значительной степени определяется проводимостью межклеточных водных транспортных путей (симпластный, апопластный и трансклеточный), из которых последний напрямую связан с проницаемостью мембран клетки. В последние годы все чаще предпочтение в исследованиях водного транспорта растений отдается методам, оказывающим минимальное воздействие на целостность и функционирование растения, таким как методы магниторезонансной томографии (МРТ).

В настоящей работе представлен количественный метод, позволяющий на основе диффузионно-взвешенной МРТ получать пространственно разрешенную информацию о размере и форме

растительных клеток, определять диффузионную проницаемость межклеточных водных транспортных путей.

Предложенный метод позволил на уровне клетки определить диффузионную проницаемость в продольном и поперечном направлении корнеплода *Daucus carota*, не нарушая целостность объекта. Показано, что анизотропия и различие растительных тканей по гидравлической проводимости связаны не только с морфологическими особенностями, но также и анизотропией и различием тканей по проницаемости межклеточных транспортных путей.

Предложенный метод может использоваться для исследования широкого ряда биосистем. В частности, позволяет на целом растении неинвазивно отслеживать изменение водного режима в различных тканях в ответ на воздействие внешних стрессовых факторов.

#### УЧАСТИЕ ТИЛАКОИДНОЙ АЛЬФА-КА *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* В ГЕНЕРАЦИИ И ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ ФИКСАЦИИ CO<sub>2</sub>

##### Thylakoid alfa-CA participation in CO<sub>2</sub> generation and photosynthetic fixation in *Chlamydomonas reinhardtii* cells

М.П. Синетова, А.Г. Маркелова, Е.В. Куприянова, В.Г. Ладыгин<sup>1</sup>,  
Н.А. Пронина

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: [m\\_sinetova@yahoo.com](mailto:m_sinetova@yahoo.com), [npronina@ippras.ru](mailto:npronina@ippras.ru)

<sup>1</sup> Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино

Исследовали локализацию КА (Cah3) в тилакоидных мембранах дикого типа и фотосинтетических мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* с различным составом хлорофилл-белковых комплексов фотосистем, а также фотосинтетические характеристики дикого типа и мутанта *C. reinhardtii cia3*, лишённого активной формы Cah3. С помощью вестернблоттинга показано отсутствие кросс-реакции с антителами к Cah3 у мутанта, лишённого реакционного центра ФС2, в отличие от мутантов, лишённых ФС1 или светособирающих комплексов ФС1 и ФС2. Эти данные показывают, что Cah3 ассоциирована с реакционным центром ФС2 и не связана с комплексом ФС1 и светособирающими комплексами ФС1 и ФС2. Скорость фотосинтетического выделения кислорода и фотохимическая эффективность ФС2 у мутанта *C. reinhardtii cia3*, лишённого активной формы Cah3, ниже по сравнению с диким типом, особенно в клетках, выращенных при недостатке CO<sub>2</sub>. С помощью метода иммуноэлектронной микроскопии с антителами к Cah3



*C. reinhardtii* показано, что фермент преимущественно локализован в ламеллах пиреноида, в котором находится основная доля РБФК. Обсуждается функциональная значимость пиреноида как самостоятельного метаболического микрокомпартамента, в котором СаhЗ играет ключевую роль в образовании и концентрировании CO<sub>2</sub> для РБФК, что может вносить существенный вклад в увеличение эффективности фотосинтеза.

**ВЛИЯНИЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ИНКУБАЦИИ  
КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ С РАЗЛИЧНЫМИ БЕЛКАМИ  
НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ СОИ**

**Effect of preliminary incubation of nodule bacteria with different  
proteins on efficiency of soybean symbiotic systems**

D.M. Sytnikov, D.A. Kirizii, S.Ya. Kots, S.M. Malichenko  
Institute of plant physiology and genetics,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev  
E-mail: sytnikov@list.ru

The influence of preincubation of nodule bacteria (*Bradyrhizobium japonicum*) of various activities with specific and non-specific proteins on the symbiotic efficiency, net assimilation and soybean plant (*Glycine max* (L.) Merr.) development was investigated under the condition of pot experiments. Ambiguous modulating action of specific soybean lectin (SBA) on symbiotic properties of strain with various activities was established, that is greatly reflected on physiological state of the soybean plant. The combined incubation of active strain (634b) with specific lectin intensify the nitrogen fixing activity of soybean nodules, what lead to increased net assimilation and weight gain of the plants. At the same time specific lectin suppressed the symbiotic properties of rhizobia non-active strain (604k). It was shown that preincubation of nodule bacteria with non-specific pea lectin (PSL) practically does not influence on the work of symbiotic apparatus and net assimilation, whereas the effect of preincubation of nodule bacteria with human albumin (USP) was similar to the action of specific lectin on symbiotic productivity.

**ФОСФАТИДНАЯ КИСЛОТА КАК АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЙ РЕГУЛЯТОР  
5-ЛИПОКСИГЕНАЗЫ ИЗ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ  
(*SOLANUM TUBEROSUM* L.)**

**Phosphatidic acid as allosteric regulator of 5-lipoxygenase  
from potatoes tubers (*Solanum tuberosum* L.)**

Т.Д. Скатерная, О.В. Харченко

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, г. Киев  
E-mail: [skaternaya@bpci.kiev.ua](mailto:skaternaya@bpci.kiev.ua)

Липоксигеназный путь превращения полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в биологически активные соединения, в том числе оксипирины, обеспечивает функционирование растительной клетки, в том числе принимает участие в реакции растения на действие патогенных организмов, насекомых, различных абиотических факторов. 5-липоксигеназа (5-ЛО) относится к мембрано-связанным ферментам, для активности которых необходима транслокация белковой молекулы из цитозоля на мембрану клетки.

Для детального анализа механизма действия фосфатидной кислоты (ФК) как структурного компонента мембраны выделяли 5-ЛО из клубней картофеля (*Solanum tuberosum* L.) по схеме, включающей ступенчатое высаливание  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ , ионообменную хроматографию на DEAE-Toyorearl, гидрофобную хроматографию на Butyl-Toyorearl. В мицеллярной системе, состоящей из неионного детергента Луброл РХ и молекул линолевой кислоты (ЛК), в присутствии ФК 5-ЛО имеет два  $\text{pH}_{\text{опт.}}$  – 5.0 и 6.9, тогда как в отсутствии ФК  $\text{pH}_{\text{опт.}} = 6.9$ . Внесение 50 мкМ ФК в реакционную смесь при pH 5.0 приводило к 15-кратному увеличению максимальной скорости ( $V_{\text{max}}$ ) липоксигеназного окисления линолевой кислоты. В таких условиях значение  $V_{\text{max}}$  совпадает со значением  $V_{\text{max}}$  липоксигеназной реакции без эффектора при pH 6.9. Эти данные могут свидетельствовать о том, что локальное изменение pH в примембранном слое, приводящее к сильному снижению активности 5-ЛО, может быть компенсировано присутствием молекул ФК, которые существенно активируют фермент и позволяют поддерживать уровень синтеза окисленных ПНЖК. В то же время известно, что одна из изоформ фосфолипазы Д – фермента, продуктом которого является ФК и субстрат 5-ЛО свободные ПНЖК, также активна при pH 4.5-5.0. Сдвиг локального значения pH в кислую сторону относится к самым ранним событиям в растительной клетке в ответ на действие элиситоров.

Липоксигеназа – аллостерический фермент, проявляющий положительную кооперативность по субстрату. Рассчитанные коэффициенты Хилла указывают на то, что при pH 5.0 с ферментом связывается до шести молекул субстрата, тогда как при pH 6.9 – четыре молекулы. В присутствии 15-50 мкМ ФК происходит замещение эффектором от трех до двух молекул субстрата в аллостерическом центре фермента. В случае недостатка субстрата (50 и 100 мкМ ЛК) фермент проявляет положительную кооперативность по эффектору, связывая от четырех до трех молекул ФК. Аналогично для фосфолипазы Д в литературе показано аллостерическое взаимодействие ФК с молекулой фермента. Также обнаружено, что 30-50 мкМ ФК снижает концентрацию полунасыщения субстратом на 40-60 %, что в некоторой степени свидетельствует о повышении сродства субстрата к ферменту в присутствии фосфолипида. Проведен сравнительный анализ влияния 4-гидрокси-ТЕМ-РО – ингибитора неферментативных свободнорадикальных реакций, не влияющего на функциональные группы фермента и не конкурирующего с субстратом на скорость образования окисленных производных линолевой кислоты в отсутствие и в присутствии ФК. Установлено, что уровень неферментативных процессов, сопровождающих 5-липоксигеназное окисление ПНЖК при нефизиологических значениях pH на 20 % ниже в присутствии ФК.

Предполагается, что фосфатидная кислота способна непосредственно взаимодействовать с молекулой 5-липоксигеназы в аллостерическом центре фермента. При недостатке субстрата и нефизиологических значениях pH ФК способна изменять активность 5-ЛО, поддерживая определенный уровень липоксигеназных метаболитов путем замещения молекул субстрата в аллостерическом центре фермента и повышения сродства фермента к субстрату. Присутствие молекул фосфолипида приводит к повышению уровня специфических продуктов липоксигеназной реакции. Таким образом, фосфатидная кислота может выступать не только как вторичный мессенджер при передаче сигнала в клетке, но и непосредственно влиять на активность ферментов липидного метаболизма в растительной клетке.

**ИЗМЕНЕНИЯ В СОДЕРЖАНИИ ГИСТОНА H1 ПРИ АПОПТОЗЕ  
У КОЛЕОПТИЛЕЙ ПШЕНИЦЫ, И МОЖЕТ ЛИ ОН ВЫЗЫВАТЬ  
ВЫХОД ЦИТОХРОМА C ИЗ МИТОХОНДРИЙ?**

**Changes in histone h1 content in wheat coleoptiles on apoptosis;  
may h1 induce the cytochrome c escape from mitochondria?**

**Т.А. Смирнова, Н.В. Лобышева, А.А. Тоньшин, Б.Ф. Ванюшин**  
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского  
МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва  
E-mail: [vanyush@belozersky.msu.ru](mailto:vanyush@belozersky.msu.ru)

Ранее мы установили, что апоптоз в coleoptiles у этиолированных проростков пшеницы сопровождается снижением содержания гистона H1 и ДНК. При этом отношение гистон H1/ДНК увеличивалось примерно в два раза. В то же время изменений в соотношении подфракций гистона H1 в coleoptile по мере его развития и старения не обнаружено. Те же явления наблюдали и в выделенной из coleoptile фракции, обогащенной ядерным материалом. Следовательно, отмеченное снижение содержания гистона H1 при неизменности состава подфракций характеризует состояние гистона H1 в ядрах клеток развивающегося и стареющего coleoptile. Известно, что у животных каскад апоптозных событий может происходить в результате выхода из ядра в цитоплазму одной из подфракций гистона H1, которая вызывает выброс из митохондрий (MX) цитохрома *c*. Мы попытались выяснить, способен ли растительный гистон H1 вызывать выход цитохрома *c* из MX *in vitro*. В тестовой системе использовали суммарный гистон H1, выделенный из частично очищенных клеточных ядер coleoptiles этиолированных проростков пшеницы, который представлен в SDS-ЭФ шестью подфракциями, и MX из сердца крысы, полученные стандартным методом, обеспечивающим высокую степень интактности этих органелл. Добавление к крысиным MX пшеничного гистона H1 в концентрации 10 и 50 мкг на 1 мл не вызывало достоверного выхода цитохрома *c* в суспензии MX. Исследование содержания цитохрома *c* в гомогенатах и надосадочной жидкости проводили путем анализа дифференциальных оптических спектров окисленной формы цитохромов против восстановленной. Количество цитохрома *c* относительно уровня цитохромов *b*, прочно связанных с внутренней митохондриальной мембраной, оставалось таким же, как и в контроле. При этом в надосадочной жидкости цитохром *c* не обнаруживался. Таким образом, гистон H1 coleoptiles этиолированных проростков пшеницы, по-видимому, не вызывает выхода цитохрома *c* из животных MX.

Работа поддержана РФФИ (грант 05-04-48071).

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНТЕННЫХ КОМПЛЕКСОВ ФОТОСИНТЕЗА  
У СИНЕЗЕЛЕННЫХ, КРАСНЫХ, ПРОХЛОРОФИТНЫХ  
И КРИПТОФИТОВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ С ФОТОСИСТЕМАМИ I И II**

**Interaction of light-harvesting antenna with photosystems I and II  
in blue-green, red, prochlorophyte and cryptophyte algae**

**И.Н. Стадничук<sup>1</sup>, В.А. Бойченко<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, г. Москва

<sup>2</sup> Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино  
E-mail: [stadnichuk@mail.ru](mailto:stadnichuk@mail.ru); [boichev@mail.ru](mailto:boichev@mail.ru)

Две пигментные системы оксигенных фотосинтетиков обозначаются как фотосистема I и фотосистема II. Собственные, называемые также ядерными или коровыми, пигмент-белковые комплексы фотосистем содержат реакционные центры и десятки антенных молекул хлорофилла *a*. Согласно рентгеноструктурным данным, на один реакционный центр в фотосистеме II приходится 36-37 и в фотосистеме I – 96 хлорофилльных молекул. Для компенсации почти троекратной разницы в светопоглощении фотосистема II, как давно установлено, взаимодействует с дополнительной антенной, которая содержит дополнительные пигменты фотосинтеза и не несет реакционных центров. Различают три группы фотосинтетиков: 1) *chlorophyta* – организмы с Хл *a/b*-содержащим пигмент-белковым комплексом, к которым относятся все высшие растения, а также зеленые, харовые и эвгленовые водоросли; 2) *chromophyta* обладают Хл *a/c*-протеином и включают в себя большинство отделов жгутиковых микроводорослей и бурые макроводоросли; 3) третья группа по наличию фикобилипротеинов объединяет красные водоросли, или багрянки, и синезеленые водоросли (цианобактерии). Особняком стоят криптофитовые водоросли с двойной антенной из фикобилипротеинов и Хл *a/c*-протеина.

В ходе различных исследований стали накапливаться сведения об участии дополнительной антенны в функционировании фотосистемы I. Цель нашей работы – изучение взаимодействия светособирающих антенн с фотосистемами I и II у красных, синезеленых и криптофитовых водорослей, объединяемых присутствием фикобилипротеинов. Четвертая исследованная группа, прохлорофиты, является особой разновидностью синезеленых водорослей, вместо фикобилипротеинов, обладающих Хл *a/b*-протеином. О принадлежности дополнительной антенны определенной фотосистеме судили, выявляя соответствующие полосы пигментов в спектрах действия. Спектр действия фотосистемы II регистрировали по фотосинтетическому выделению кислорода в ответ на вспышки мо-

нохроматического света. Спектр действия фотосистемы I регистрировали аналогично по фотоингибированию дыхания или фотосинтетическому выделению водорода. Число антенных молекул пигментов, связанных с одним реакционным центром, определяли по эффективному сечению фотореакции. Соотношение фотосистем I и II в фотосинтетическом аппарате определяли по интенсивности фототвоя на насыщающие вспышки света или с помощью моделирования спектра поглощения клеток суммой спектров действия.

Как установлено, при изучении около 20 различных водорослевых видов общей закономерностью является взаимодействие дополнительных антенн с обеими фотосистемами. Фикобилисомы в составе синезеленых и одноклеточных красных водорослей, Хл *a/b*-протеин у прохлорофитных водорослей и Хл *a/c*-протеин – у криптофитовых передают поглощенную энергию как фотосистеме I, так и фотосистеме II. Миграция энергии от антенных комплексов к фотосистеме I происходит, наиболее вероятно, напрямую, без привлечения механизма спилловера. Соотношение взаимодействующих антенных комплексов и фотосистем полностью соответствует их надмолекулярному строению. Так, у синезеленых и красных водорослей фикобилисомы связываются с димерами фотосистемы II и тримерами фотосистемы I. У прохлорофитных водорослей каждый димер фотосистемы II окружен в плоскости фотосинтетической мембраны семью меньшими по размеру комплексами Хл *a/b*-протеина, а тримеры фотосистемы I находятся в окружении 18-ти Хл *a/b*-протеинов. Лишь у криптофитовых водорослей фикобилипротеины принадлежат исключительно фотосистеме II вследствие того, что вместо фикобилисом, имеющих размеры, сравнимые с размерами комплексов фотосистем I и II, эти белки-пигменты собраны в меньшие по величине гексамеры, позволяющие «точечным» образом соединяться с одной из фотосистем. Однако у фотосистемы I криптофитовых водорослей сохраняется связь с Хл *a/c*-светособирающим комплексом. Особенностью всех водорослей является преобладание в пигментном аппарате фотосистемы I, чье содержание в тилакоидах в два-пять раз превышает количество фотосистемы II. Исключить взаимодействие дополнительной антенны с фотосистемой I или II удастся лишь в мутантных организмах, лишенных ряда полипептидов того или иного комплекса. В этих случаях в пигментном аппарате компенсаторно возрастает доля фотосистемы II, поскольку при ее меньшей собственной антенне отсутствие вспомогательных пигментов или ослабление взаимодействия с ними в наибольшей степени нарушает установившееся соотношение в светопоглощении двух фотосистем.

**АКТИВНОСТЬ КИСЛЫХ ФОСФАТАЗ КОРНЕЙ ПРОРОСТКОВ  
КОРОТКОСТЕБЕЛЬНЫХ СОРТОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ  
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ ФОСФОРНОГО ПИТАНИЯ**

**Acid phosphatase activity of the semidwarf winter wheat  
seedlings roots depending on phosphorus nutrition level**

**М.П. Стахив, В.В. Швартау**

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, г. Киев  
E-mail: [schwartau@mail.ru](mailto:schwartau@mail.ru), [stahiv@ukr.net](mailto:stahiv@ukr.net)

Одним из основных этапов формирования высоких урожаев озимой пшеницы является повышение эффективности поступления и включения в метаболизм элементов питания. Данное направление мало исследовано для современных короткостебельных сортов озимой пшеницы. Эти сорта значительно превышают высокорослые по урожайности, требовательны к режиму орошения и элементам питания, одним из которых является фосфор. Содержание фосфорных соединений в почве весьма высокое, но концентрация доступного для растений ортофосфата редко превышает 1 мкМ. Известно, что только 10-20 % фосфора используется растениями в первый год после внесения удобрений. Остаток фосфатов фиксируется почвами и со временем становится недоступным для растений. Существует взаимосвязь между уровнем фосфатазной активности растений и эффективностью использования фосфора из почвы и удобрений. Фосфатазная активность корней пшеницы мало зависит от содержания фосфора или возрастает при его недостатке в почве. Повышение доз фосфорных удобрений ингибирует фосфатазную активность, что препятствует достижению высоких уровней усвоения и включения в метаболизм фосфора из органических и неорганических эфиров растениями пшеницы. Данные по определению фосфатазной активности и способности короткостебельных сортов озимой пшеницы поглощать фосфор практически отсутствуют.

Поэтому цель нашей работы – определение активности кислых фосфатаз корней проростков короткостебельных сортов озимой пшеницы в зависимости от уровня ортофосфата в среде выращивания.

Объектами исследований были короткостебельные сорта озимой пшеницы Смуглянка, Колумбия, созданные в Институте физиологии растений и генетики НАН Украины, а также высокорослый Украинка 0246. Семена проращивали в условиях водной культуры на растворе, содержащем 10 мМ КСl и 0.5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Концентрацию ортофосфата изменяли от 0 до 10 мМ добавлением КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>.

pH в растворе выращивания поддерживали на уровне 6.0. В качестве субстрата фосфатаз использовали гексагидрат динатриевой соли р-нитрофенилфосфата (НФФ). Реакцию по определению фосфатазной активности проводили на водяной бане при 25 °С. Оптическую плотность растворов определяли при длине волны 405 нм. Повторность опытов шестикратная.

При исследовании особенностей фосфорного питания проростков короткостебельных и высокорослого сортов озимой пшеницы выявлена разница в их реакции на повышение фона фосфорного питания. Уровень фосфора выше 10 мкМ вызывал угнетение ростовых процессов на ранних этапах развития пшеницы высокорослого сорта. Для короткостебельных сортов установлено увеличение накопления массы сухого вещества корнями проростков при повышении фона фосфорного питания.

Показано, что при проращивании семян на контрольном растворе (10 мМ KCl + 0.5 мМ CaCl<sub>2</sub>) у короткостебельных сортов озимой пшеницы активность кислых фосфатаз корней проростков повышается при увеличении фосфорного питания. В то же время для высокорослого сорта уровень ортофосфата в среде выращивания достоверно не влиял на активность ферментов.

Отличия в индукции кислых фосфатаз более четко проявлялись при проращивании семян на контрольном растворе с последующей инкубацией на протяжении суток на средах с ортофосфатом (10 мкМ – 10 мМ). Если на среде без фосфора уровень активности кислых фосфатаз корней составил 7.4-7.5 мкМ гексагидрата динатриевой соли (НФФ)×мин<sup>-1</sup>×г<sup>-1</sup> массы сырого вещества, то при проращивании проростков короткостебельных сортов на растворах с уровнем фосфора от 10 мкМ до 10 мМ уровень ферментативной активности увеличивался в 2.8-2.9 раза.

Данная зависимость совпадает с изменениями в содержании сухих веществ проростков при разных уровнях фосфорного питания. Очевидно, что проростки короткостебельных сортов могут расти на более высоких концентрациях фосфора в среде выращивания. Внесение разных доз ортофосфата не приводило к изменениям ферментативной активности у высокорослого сорта Украина 0246 в отличие от короткостебельных сортов.

Полученные данные свидетельствуют о возможности и целесообразности создания высоких удельных концентраций фосфора для питания короткостебельных сортов озимой пшеницы и являются обоснованием для разработки специализированных удобрений.

Повышенные требования к условиям фосфорного питания могут иметь значение для формирования высокого и качественного урожая.



**РОЛЬ ЦИТОСКЕЛЕТА И СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ  
В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ЛЕКТИНОВ  
ПРИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ И ГОРМОНАЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ**

**Regulation of lectin activity by cytoskeleton  
and signal pathways under low temperature and hormones**

**О.А. Тимофеева, Ю.Ю. Чулкова, Л.Д. Гараева, И.А. Коваль,  
М.А. Московкина, Л.П. Хохлова**  
Казанский государственный университет, г. Казань  
E-mail: *Olga.Timofeeva@ksu.ru*

Изучалось влияние низких температур на активность лектинов проростков пшеницы. Показано, что существует прямая зависимость между активностью лектинов клеточной стенки и степенью морозоустойчивости исследованных сортов озимой пшеницы. Обнаруженная фазность кривых, отражающих изменения активности лектинов, свидетельствует об их участии в формировании стрессового состояния или неспецифического адаптационного синдрома клеточной системы. Установлено, что для лектинов клеточной стенки характерна более быстрая реакция на холодовое воздействие по сравнению с растворимыми лектинами.

Исследования по выяснению механизмов регуляции активности лектинов с участием элементов цитоскелета показали, что обработка растений озимой пшеницы ингибиторами полимеризации цитоскелета (оризалином, 10 мМ; цитохалазином В, 10 мМ) приводит к увеличению активности лектинов клеточной стенки, а обработка цитоскелет-стабилизирующим препаратом диметилсульфоксидом вызывает ее уменьшение. Полученные данные указывают на зависимость активности лектинов от структурной целостности цитоскелета. Обнаружено сортоспецифичное влияние низкотемпературного закаливания и АБК на цитоскелет-индуцированные изменения активности лектинов клеточной стенки озимой пшеницы, что позволяет предположить участие поверхностного аппарата растительной клетки в трансдукции гормонального и низкотемпературного сигналов. Вполне возможно, что наблюдаемые изменения активности лектинов в процессе низкотемпературной адаптации связаны с процессами сборки и разборки микротрубочек.

При действии модификаторов сигнальных систем активность лектинов клеточной стенки изменялась прямо противоположным образом. Так, блокатор кальциевых каналов верапамил увеличивал активность лектинов клеточной стенки в незакаленных растениях, а ингибитор фосфодиэстеразы цАМФ трентал уменьшал. При

гипотермии верапамил первоначально усиливал ответную реакцию лектинов клеточной стенки, а трентал ослаблял. Среди возможных механизмов регуляции функциональной активности цитоскелета важное место отводится процессам фосфорилирования-дефосфорилирования цитоскелетных белков, осуществляемых при участии сигнальных систем, в частности, кальциевой. Вполне возможно, что увеличение или уменьшение первого пика активности лектинов клеточной стенки связано с усилением или замедлением процессов деполимеризации цитоскелетных белков под влиянием верапамила или трентала соответственно. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о важной роли сигнальных систем, таких как кальциевая и аденилатциклазная, в регуляции активности лектинов. При этом их влияние на активность лектинов клеточной стенки может быть опосредовано состоянием цитоскелета.

Клеточная стенка растений, являясь метаболически активным и динамичным компартментом, вовлекается в реакцию формирования морозоустойчивого состояния озимых растений. В ходе холодового закаливания во внеклеточном матриксе растений увеличивается содержание экстенсина, активизируется ряд ферментов, изменяется ее белковый состав. Наблюдаемые нами сортоспецифические количественные и качественные изменения лектинов клеточной стенки при начальном воздействии гипотермии позволяют предположить их важную роль в трансдукции сигнала. Обнаруженные в спектре лектинов клеточных стенок арабиногалактановые белки являются одновременно адгезивными и сигнальными молекулами. Предполагается, что они могут выступать в качестве молекул, связывающих цитоскелет и клеточную стенку растений. Известно, что цитоскелет является одной из первичных «мишеней» действия низких температур. Так, кратковременная разборка тубулиновых и актиновых филаментов необходима для развития адаптации и повышения терморезистентности растений.

Вероятно, появление и/или модификация лектинов клеточных стенок, в том числе и арабиногалактановых белков, под влиянием низких температур приводит к изменению трансмембранных взаимодействий в системе клеточная стенка – плазмалемма – цитоскелет. В результате повышается динамическая нестабильность микротрубочек и микрофиламентов, что запускает каскад ответных реакций, обеспечивающих скоординированное функционирование защитно-приспособительных систем в клетках и формирование морозоустойчивости растений. На основании полученных результатов предполагается схема участия лектинов клеточной стенки в индукции процессов низкотемпературной адаптации растений.

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ  
СТРУКТУРЫ ХЛОРОПЛАСТОВ И МИТОХОНДРИЙ КУЛЬТУРНОЙ  
И ДИКОРАСТУЩЕЙ ФОРМ ПОДСОЛНЕЧНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS* L.)**

**Comparative ultra-structural analysis of chloroplastes and mithohondrion  
in cultural and wild-growing forms in sunflower (*Helianthus annuus* L.)**

**Г.М. Федоренко<sup>1</sup>, Н.С. Колоколова<sup>2</sup>, А.В. Усатов<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Южный научный центр РАН, г. Ростов-на-Дону

E-mail: [gfedorenko@mail.ru](mailto:gfedorenko@mail.ru)

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт биологии

Южного федерального университета, г. Ростов-на-Дону

E-mail: [usatova@mail.ru](mailto:usatova@mail.ru)

Дикорастущие виды с/х растений по сравнению с их культурными формами, как правило, обладают повышенной устойчивостью к действию экстремальных факторов среды в результате того, что являются носителями генных комплексов, коадаптированных длительным естественным отбором. В связи с этим одним из возможных подходов в исследовании клеточных механизмов устойчивости может стать анализ особенностей тонкой структуры клеточных органелл этих форм.

Объектом исследования служили растения дикорастущей и культурной форм подсолнечника *Helianthus annuus* L., выращенные в полевых условиях. В фазу бутонизации растений в клетках листовой паренхимы количественно оценивали структурные характеристики основных энергообразующих органелл – пластид и митохондрий, наиболее полно отражающие уровень их функциональной активности: площадь среза органелл, площадь среза внутренних мембран, число митохондриальных крист, число тилакоидов в гранах и др. Сравнительный анализ электроннограмм клеточных органелл дикорастущей и культурной форм выявил достоверные различия ультраструктурных показателей. Эти различия свидетельствуют о более высоком уровне функциональной активности хлоропластов культурной формы. Так, по сравнению с дикорастущей формой, при большей общей площади органеллы, относителная площадь среза внутренних мембран была существенно выше – более чем на 30 %. В соответствии с уровнем формирования внутренних мембран содержание хлорофиллов в листьях у культурной формы было также больше, чем у дикорастущей. Напротив, выявленные различия структурных параметров митохондрий свидетельствуют о более высокой интенсивности процессов аэробного дыхания, протекающих в клеточных органеллах дикорастущих растений (отношение площади крист к общей площади органеллы почти в два раза превышает этот показатель культур-

ной формы). Сопоставление полученных данных предполагает наличие реципрокной зависимости между уровнем функциональной активности пластид и митохондрий исследуемых форм: высокому уровню функциональной активности хлоропластов культурной формы подсолнечника соответствует более низкий уровень дыхательной активности митохондрий и, наоборот, относительно низкому уровню фотосинтетической активности хлоропластов дикорастущей формы соответствуют митохондрии с высоким уровнем аэробного окисления дыхательных субстратов. Биологический смысл такой реципрокной зависимости очевиден, если предположить, что (чрезмерно) фотосинтетически активные хлоропласты культурных растений (как результат искусственного отбора) могут вызывать у них состояние «биотического стресса». По современным представлениям в условиях стресса повышается вероятность повреждения клеточных структур активными формами кислорода (АФК). Для уменьшения деструктивного действия АФК в клетке существует многоуровневая система защитных механизмов. Одним из этих уровней защиты может быть снижение интенсивности дыхания в митохондриях клеток листовой паренхимы растений, уменьшающее генерацию АФК этими органеллами (что может являться важным условием нормализации метаболизма культурных форм). В свою очередь, менее активным в функциональном отношении хлоропластам дикорастущей формы соответствуют митохондрии с высоким уровнем аэробного дыхания (результат естественного отбора). Это соответствие можно рассматривать как важный элемент реакции дикорастущей формы подсолнечника на возможное действие различных неблагоприятных факторов внешней среды.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 06-04-96754.

#### РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ВНЕШНЕЙ РОТЕНОН-НЕЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ NADH-ДЕГИДРОГЕНАЗЫ ТОМАТА КРАСНЫМ СВЕТОМ

##### Regulation of tomato external rotenone-insensitive NADH-dehydrogenase activity by red light

О.Ю. Фоменко, Е.А. Воронцова, В.Н. Попов  
Воронежский государственный университет, г. Воронеж  
E-mail: [fomenych2001@mail.ru](mailto:fomenych2001@mail.ru)

В дыхательной цепи растительных митохондрий NAD(P)H окисляется за счет функционирования как минимум трех различных ферментов. Внутримитохондриальный NADH окисляется комплексом I, а также ротенон-нечувствительной NADH-дегидрогеназой, функционирование которой не сопряжено с генерированием

трансмембранного потенциала. Кроме того, возможно прямое окисление цитозольного NAD(P)H за счет работы внешних NAD(P)H-дегидрогеназ, локализованных на внешней стороне внутренней митохондриальной мембраны. Данные ферменты несопряженного дыхания играют важную роль в снижении внутриклеточной концентрации кислорода, преодоления ситуации overflow и в поддержании жизнедеятельности растительной клетки при повреждении комплекса IЭТЦ. Таким образом, представляется интересным вопрос о механизмах регуляции их активности. Существуют многочисленные данные о том, что красный свет способен оказывать ингибирующее или стимулирующее действие на активность ферментов. Регулирующее действие красного света опосредуется через систему фитохромов. Нами было предположено, что регуляция активности ротенон-нечувствительных NADHдегидрогеназ может также осуществляться через систему фитохромов.

Цель данной работы – изучение влияния света с различными спектральными характеристиками на активность внешней ротенон-нечувствительной NADHдегидрогеназы зеленых листьев томата.

Опытные растения инкубировались 24 часа в темноте, а затем подвергались 15-минутному облучению светом различных длин волн. В качестве контрольных объектов использовались растения томата, подвергнутые 24-часовой инкубации в темноте. Было показано, что через 24 часа после облучения растений томата красным светом ( $\lambda = 660$  нм) с интенсивностью  $0.044$  Дж/м<sup>2</sup>·с активность внешней ротенон-нечувствительной возрастала в 1.8 раза по сравнению с контролем. Значительное увеличение активности в данных условиях позволяет предположить участие фитохромной системы в регуляции активности исследуемого фермента. Дополнительным доказательством в пользу участия фитохромной системы в регуляции активности ферментов альтернативного пути окисления NADH служит тот факт, что последующее облучение опытных растений дальним красным светом ( $\lambda = 730$  нм) с интенсивностью  $0.044$  Дж/м<sup>2</sup>·с приводило к снятию эффекта, вызванного красным светом. При этом наблюдалось падение активности внешних NADHдегидрогеназ вплоть до уровня контроля. Это объясняется тем, что при облучении растений дальним красным светом активная форма фитохрома переводится в неактивную форму, не оказывающую физиологического эффекта.

Таким образом, полученные данные позволяют предположить участие фитохромной системы в регуляции активности внешней ротенон-нечувствительной NADHдегидрогеназы томата. Физиологическая роль такой регуляции может заключаться в увеличении ее активности в дневное время суток, т.е. в период, когда наиболее вероятно возникновение ситуации overflow из-за интенсивно

протекающего процесса фотосинтеза.

Работа частично поддержана грантами РФФИ и Президента России для молодых докторов наук.

### РОЛЬ ФОСФАТИДИЛХОЛИНА И ФОСФАТИДИЛИНОЗИТА В ЛИПОКСИГЕНАЗНОМ КАТАЛИЗЕ

#### Role of phosphatidylcholine and phosphatidyl inositol in the lipoxygenase catalysis

А.И. Харитоненко, О.В. Харченко

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, г. Киев  
E-mail: [anna@bpci.kiev.ua](mailto:anna@bpci.kiev.ua)

Образование гидропероксидов полиненасыщенных жирных кислот, катализируемое липоксигеназами (ЛО) (линолеат:кислород оксидоредуктазы КФ 1.13.11.12), является ключевой реакцией ферментативного каскада, продукты которого обеспечивают защитную реакцию растительного организма на действие биотических и абиотических стрессов; инициируют процессы старения клетки и ранние стадии апоптоза. Основная часть субстрата реакции локализована в составе мембранных структур, этап транслокации фермента из цитозольной фракции на поверхность мембраны и взаимодействие с ее структурными элементами имеет большое значение в регуляции уровня липоксигеназной активности. Ранее было показано, что распространенные фосфолипиды (ФЛ) – фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилинозит (ФИ) в концентрациях 0.005-0.3 мМ изменяют стационарную скорость окисления линолевой кислоты ( $C_{18:2}$ ) в присутствии 5-ЛО из клубней картофеля в сторону уменьшения и увеличения соответственно.

Цель настоящей работы – изучение механизма влияния ФЛ на скорость липоксигеназного окисления линолевой кислоты в мицеллярной системе, образованной неионным детергентом Lubrol PX. ФИ и ФХ в исследуемых концентрациях несущественно изменяли значения поверхностного потенциала мицеллы и значения pH мицеллярной поверхности. 5-ЛО была выделена из клубней картофеля сорта Луговская и очищена по схеме, состоящей из выщелачивания 25-50 % сульфатом аммония, диализа, ионообменной хроматографии (ДЕАЕ-целлюлоза, pH 7.5) и гидрофобной хроматографии (бутил-сефароза, pH 7.5). Исследуемые ФЛ в концентрации 0.1 мМ вызывали изменение сигмовидной формы зависимости стационарной скорости реакции от концентрации субстрата, что свидетельствует о непосредственном влиянии данных соединений на механизм липоксигеназного катализа. Сравнительный анализ

кинетических констант, рассчитанных по уравнению Хилла, показал, что ФХ приводит к уменьшению, а ФИ – к увеличению максимальной скорости окисления линолевой кислоты. Присутствие ФЛ в два раза увеличивает значение субстратной константы и уменьшает количество молекул субстрата, связанных с 5-ЛО с четырех до двух, что позволяет говорить об аллостерическом механизме регуляции 5-липоксигеназного катализа данными фосфолипидами. Подобный тип регуляции, основанный на липид-белковых взаимодействиях, позволяет поддерживать постоянный уровень активности ключевых ферментов метаболизма растений при изменяющихся концентрациях субстрата.

#### КИНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИНОЛЕОВОГО СПИРТА В ПРИСУТСТВИИ 5-ЛИПОКСИГЕНАЗЫ ИЗ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ (*SOLANUM TUBEROSUM* L.)

Kinetic peculiarities of enzymatic oxidation of linoleic alcohol in the presence of 5-lipoxygenase from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.)

О.В. Харченко, М.Г. Казачков, Т.Д. Скатерная, А.И. Харитоненко, В.Н. Копич  
Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, г. Киев  
E-mail: [olga@bpci.kiev.ua](mailto:olga@bpci.kiev.ua)

Одной из групп ферментов, играющих существенную роль в регуляции физиологических функций растений, являются липоксигеназы (КФ 1.13.11.12). Липоксигеназные метаболиты участвуют в регуляции роста, дифференциации, формировании генеративных органов, реакциях иммунитета растений. Субстратами липоксигеназной реакции являются линолевая, линоленовая,  $\gamma$ -линоленовая кислоты. Нами проведено исследование аэробного окисления линолевого спирта, катализируемого 5-липоксигеназой из клубней картофеля. Обнаружено, что в мицеллярной системе, состоящей из неионного детергента луброла РХ и линолевого спирта, наблюдаются два рН оптимума липоксигеназной активности – 3.8 и 6.5. Рассчитанные по уравнению  $V_{st} = V_{st1} / (1 + [H^+] / K_2 + K_1 / [H^+] + V_{st2} / (1 + [H^+] / K_4 + K_3 / [H^+]))$  значения  $V_{st1}$ ,  $V_{st2}$  соответственно составили 4.71 и 2.67 опт. ед. 235/мин., а  $pK_1$ ,  $pK_2$ ,  $pK_3$  и  $pK_4$  – 2.75, 4.86, 5.57 и 7.48. рН оптимум 6.5 является стандартным для 5-липоксигеназ, значение же первого рН оптимума – 3.8 необычно для этих ферментов и может быть объяснено наличием избытка протонов, компенсирующего отсутствие карбоксильной группы в молекуле субстрата. Добавление в реакционную среду с рН 6.3 додецилсульфата натрия (ДДС) в диапазоне концентраций 0.005-0.15 мМ существенно повышает стационарную скорость реакции

окисления линолевого спирта (максимальная степень активации - 200 раз). Показано, что 5-липоксигеназа проявляет положительную кооперативность по субстрату – линолевому спирту. При постепенном повышении концентрации ДДС происходит замещение субстрата в аллостерическом центре фермента молекулами активатора, с ферментом связывается от трех до двух молекул линолевого спирта. Активирующий эффект на 5-липоксигеназу в реакции окисления линолевого спирта оказывает и природное амфифильное соединение – фосфатидная кислота. В присутствии 50 мкМ фосфатидной кислоты стационарная скорость реакции 5-липоксигеназного окисления линолевого спирта при pH 3.8 увеличивается в семь раз. Добавление в реакционную среду с pH 6.3 фосфатидной кислоты в концентрации 120 мкМ также приводит к шестикратному повышению активности 5-липоксигеназы. Синтезированный нами продукт 5-липоксигеназного окисления линолевого спирта - 9(S)-гидроперокси-10E,12Z-октадиен-1-ол в концентрации 25 мкМ снижал в два раза стационарную скорость реакции окисления линолевой кислоты, катализируемой 5-липоксигеназой, а также уменьшал лаг-период кинетической кривой с 4.5 до 0.5 мин. и оказывал ингибирующее влияние на активность гидропероксилиаза из клубней картофеля в реакциях превращения 9- и 13-гидропероксидов линолевой кислоты. Таким образом, установленная нами возможность ферментативного преобразования необычных практически нерастворимых субстратов в присутствии не только синтетических (ДДС), но и природных амфифильных соединений (фосфатидная кислота), открывает перспективы в поиске новых липоксигеназных метаболитов в растениях и изучении их как потенциальных биорегуляторов липидной природы, синтезированных с участием липоксигеназ.

**ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАЗВИТИЯ  
ИНФЕКЦИОННОЙ НИТИ У ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.)**

**Immunocytochemical analysis of infection thread development  
in pea (*Pisum sativum* L.)**

А.В. Ходоренко<sup>1</sup>, В.Е. Цыганов<sup>1</sup>, А.Ю. Борисов<sup>1</sup>, N.J. Brewin<sup>2</sup>, И.А. Тихонович<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт  
сельскохозяйственной микробиологии, г. Санкт-Петербург  
E-mail: [anna\\_khodorenko@arriam.spb.ru](mailto:anna_khodorenko@arriam.spb.ru)

<sup>2</sup> John Innes Centre, Norwich

Развитие бобово-ризобияльного симбиоза представляет собой совокупность двух процессов – построение компартментов, содержащих клетки ризобий (межклеточные инфекционные нити, внут-



риклеточные симбиосомы) и органогенез клубенька. Колонизация корней растений происходит в результате формирования транс-клеточной туннелеподобной структуры, называемой инфекционной нитью, которая растет через цитоплазму клетки в результате перераспределения материала первичной клеточной стенки. Поверхность симбиотического взаимодействия служит физической точкой контакта между микросимбионтом и хозяином во время совместимой инфекции, а на поздних стадиях используется для обмена питательными веществами и другими молекулами между обоими партнерами. Во время развития симбиоза поверхностные компоненты растения и ризобий подвергаются значительным изменениям, обеспечивающим молекулярное взаимодействие между симбиотическими партнерами. Со стороны бактериальных клеток большую роль в нормальном развитии клубенька играют бактериальные экзо- и липополисахариды. С другой стороны, поверхность взаимодействия хозяина составляют плазматическая мембрана растительной клетки, клеточная стенка и материал внеклеточного матрикса, в который заключены бактериальные клетки.

В настоящем исследовании была использована серия одиночных и двойных мутантов гороха (*Pisum sativum* L.), неспособных фиксировать атмосферный азот, блокированных на различных стадиях развития инфекционной нити, а также их родительские линии: SGE (*∂.m.*), SGEFix-1 (*sym40*), SGEFix-2 (*sym33*), RBT3 (*sym33, sym40*), RBT4 (*sym33, sym42*), Finale (*∂.m.*), RisFixV (*sym42*). Во всех экспериментах растения были инокулированы штаммом 3841 *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Клубеньки гороха были собраны и исследованы с помощью световой, флуоресцентной, конфокальной и трансмиссионной электронной микроскопии.

Была проведена иммулокализация арабиногалактан протеинов-экстензинов (АГП), пектинов первичной клеточной стенки и бактериальных липополисахаридов штамма 3841 *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. У мутантов SGEFix-1 (*sym40*) и SGEFix-2 (*sym33*) выявлено увеличение синтеза АГП в межклеточном пространстве. У мутанта по гену *sym42* отмечено усиление защитных реакций в виде синтеза каллозы вокруг инфекционных нитей и инфицированных клеток и пектиновых веществ вокруг стареющих бактериоидов в инфицированных клетках клубеньков. Таким образом, было показано, что мутация в гене *sym42* запускает защитные реакции растения в ответ на инфекцию клубеньковыми бактериями, приводящие к формированию аномально утолщенных стенок за счет отложения каллозы. Ранее подобное проявление защитных реакций не было описано ни для одного из симбиотических мутантов бобовых растений.

При проведении данного исследования с использованием му-

тационного подхода доказана важная роль перекиси водорода в развитии инфекционного процесса в симбиотическом клубеньке гороха, а также в ходе старения симбиотического клубенька. Показано эпистатирование мутантной аллели гена *sym33* над мутантной аллелью гена *sym40* в отношении признака локализации перекиси водорода в симбиотическом клубеньке. В то же время выявлено взаимодействие мутантных аллелей генов *sym33* и *sym42* в отношении признака локализации перекиси водорода в симбиотическом клубеньке, приводящее к новообразованию фенотипа. Анализ мутантных фенотипов одиночного мутанта SGEFix<sup>-2</sup> и двойного мутанта RBT3, для которых характерно отсутствие эндоцитоза бактерий из инфекционных нитей в цитоплазму растительной клетки, позволяет предположить возможную новую важную функцию перекиси водорода в развитии симбиотических клубеньков – в процессе эндоцитоза. Присутствие перекиси водорода у двойного мутанта RBT4, для которого также характерно отсутствие эндоцитоза бактерий, можно объяснить влиянием второй мутации в гене *sym42*, вызывающей повышенный уровень перекиси водорода, вследствие активации защитных реакций растения в ответ на инфекцию клубеньковыми бактериями.

Работа была поддержана ИНТАС (YSF 04-83-3196), Федеральным агентством по науке (ПИ-19.0/002/140) и РФФИ (05-04-49105-а).

#### ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ УСТОЙЧИВОСТИ ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.) И ЕГО СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ К КАДМИЮ

##### Genetic analysis of garden pea (*Pisum sativum* L.) tolerance and its symbiotic systems to cadmium

В.Е. Цыганов<sup>1</sup>, А.И. Жернаков<sup>1</sup>, А.В. Ходоренко<sup>1</sup>, А.А. Белимов<sup>1</sup>,  
В.А. Сафронова<sup>1</sup>, А.Ю. Борисов<sup>1</sup>, К.-J. Dietz<sup>3</sup>, F. Valuška<sup>2</sup>, И.А. Тихонович<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт  
сельскохозяйственной микробиологии, г. Санкт-Петербург

E-mail: [viktor\\_tsyganov@arriam.spb.ru](mailto:viktor_tsyganov@arriam.spb.ru)

<sup>2</sup> Bonn University

<sup>3</sup> Bielefeld University

Кадмий, за редким исключением, токсичен для всех живых организмов. У растений он вызывает ингибирование роста стеблей и корня, некрозы и хлорозы. Данные эффекты объясняются влиянием кадмия на многочисленные биохимические и физиологические процессы. На клеточном уровне кадмий вызывает некоторые структурные изменения у растений. Он влияет также и на симбиотические взаимодействия растений. Так было показано, что обра-

ботки кадмием ведут к снижению уровня азотфиксации и ассимиляции аммония в клубеньках сои, а также преждевременному старению, вызванному, по-видимому, окислительным стрессом. Микоризные ассоциации способны снижать последствия кадмиевого стресса для растений. В то же время присутствие кадмия может снижать или задерживать колонизацию корней микоризными грибами. Показано, что устойчивость растений к нему определяется генетически. При этом она зависит от взаимосвязанной цепи физиологических и молекулярных механизмов, которые включают поглощение и аккумуляцию кадмия посредством связывания с внеклеточными эксудатами, клеточной стенкой, образование комплексов ионов внутри клетки с органическими кислотами, аминокислотами, фитохелатинами и их транспорт в вакуоли, индукцию биохимических стрессовых ответных реакций, таких как индукцию антиоксидантных ферментов.

Недавно в ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии с помощью химического мутагенеза (с использованием этилметансульфоната (ЭМС)) получен мутант гороха SGE<sup>t</sup>Cd<sup>t</sup>, характеризующийся повышенными аккумуляцией кадмия в тканях растения и устойчивостью к токсичным концентрациям кадмия. Он является первым мутантом высших растений, характеризующимся повышенной устойчивостью к кадмию. Данный мутант представляет собой уникальную модель для изучения молекулярно-генетических и клеточных механизмов устойчивости высших растений к кадмию. Тот факт, что он получен на бобовом растении, делает также возможным изучение влияния кадмия на развитие симбиотических систем, формируемых растением (арбускулярная микориза и азотфиксирующие клубеньки). Показано, что у мутанта снижена, по сравнению с исходной линией, степень индукции кадмием активности некоторых ферментов, индуцирующихся под влиянием стресса, а также синтеза фитохелатинов и глутатиона. В то же время выявлено, что мутант способен не только поддерживать свой рост на токсичных концентрациях кадмия, но и поддерживать, в отличие от исходной линии, гомеостаз некоторых химических элементов, особенно двухвалентных металлов: кальция, магния, марганца. Также показано, что мутант SGE<sup>t</sup>Cd<sup>t</sup> характеризуется способностью поддерживать организацию митотических и кортикальных микротрубочек на концентрациях Cd, вызывающих серьезные нарушения в их организации у растений исходной линии SGE. Доказано, что мутант, в отличие от исходной линии, сохраняет способность формировать симбиотические клубеньки на более высоких концентрациях кадмия. В то же время показано, что мутант характеризуется сниженным уровнем микоризации, по сравнению с исходной линией, в контрольном варианте без кад-

мия. В условиях же кадмиевого стресса степень снижения уровня микоризации, по сравнению с вариантом без кадмия, была ниже у мутантной линии. Полученные результаты крайне важны для практического использования, поскольку являются теоретической базой для создания растительно-микробных систем для фиторемедиации почв, загрязненных кадмием.

Работа была финансово поддержана Администрацией Санкт-Петербурга (PD04-1/4-230, PD06-1.4-210), ИНТАС (01-2170 PC 2001, YSF 04-83-3143).

### ЛАТЕРАЛЬНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ АКВАПОРИНОВ PIP-ТИПА В ПЛАЗМАЛЕММЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

#### Lateral heterogeneity of the pip-aquaporin in plant cell plasmalemma

Т.А. Шевырева, И.М. Жесткова, М.С. Трофимова  
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: [pmembrane@ippras.ru](mailto:pmembrane@ippras.ru)

Согласно современным представлениям, структура биологических мембран включает домены, отличающиеся по составу и физико-химическим свойствам. Примерами таких доменов могут служить так называемые «рафты». Из-за высокого содержания в них стеринов, гликофинголипидов и липидов с насыщенными жирными кислотами «рафты» характеризуются более плотной упаковкой липидных молекул по сравнению с окружающими их участками мембран. Кроме специфического липидного состава, эти мембранные домены характеризуются и определенным белковым профилем. В «рафтах» плазматических мембран растений идентифицированы АТФазы Р- и V-типа, протеинкиназы, мономерные и гетеромерные G-белки,  $\beta$ -тубулин, белки 14-3-3 семейства, аквапорины PIP-типа и др. Показано, что встраивание в мембрану или десорбция из нее сопровождается изменением активности некоторых протеинкиназ и G-белков. Кроме того, установлено, что отдельные мембранные домены могут взаимодействовать между собой с образованием кластеров больших размеров, что рассматривается как один из механизмов регуляции активности белков, включенных в «рафты». Биохимически липидные «рафты» можно характеризовать как мембранный материал, не солибилизируемый в растворах мягких неионных детергентов. Таким образом, мембранные «рафты» рассматриваются как специфические и лабильные по структуре и свойствам домены, функции которых ак-

тивно исследуются в настоящее время.

Ранее нами показано, что кратковременный осмотический стресс активизирует как экзо-, так и эндоцитоз в протопластах из клеток суспензионной культуры мезофилла сахарной свеклы. Кроме того, обнаружено, что транспортируемые везикулы слабо обогащены аквапоринами РІР-типа. Этот факт позволил предположить, что РІР-аквапорины локализованы в малоподвижных доменах плазмалеммы, которые могут представлять собой «рафты». Для экспериментального обоснования этого предположения было использовано два методических подхода. Первый состоял в наблюдении за локализацией маркера стерина – филипина в протопластах. Изменение его локализации при осмотическом стрессе могло свидетельствовать о миграции «рафтов» из плазмалеммы. Второй – в анализе распределения РІР-аквапоринов после солюбилизации плазмалеммы разными типами неионных детергентов. Поскольку известно, что Тритон X-100 сохраняет структуру «рафтов», а додецил мальтозид разрушает, то наличие РІР-аквапоринов в осадке (100000 g, 1 ч) после солюбилизации плазмалеммы Тритоном X-100 может свидетельствовать о присутствии их в «рафтах».

Установлено, что при гиперосмотическом стрессе мембранные структуры, помеченные филипином, не изменяли своего положения по сравнению с изоосмотическими условиями. Их поведение повторяло таковое для РІР-аквапорин содержащих участков плазмалеммы. Эти результаты позволяют нам заключить, что «рафт»-подобные мембранные структуры плазмалеммы растительных клеток содержат аквапорины РІР-типа и обладают относительно низкой подвижностью при осмотически индуцируемом эндоцитозе.

Аквапорины РІР-типа обладали различной устойчивостью к солюбилизации додецилмальтозидом и Тритоном X-100. Обнаружено, что после солюбилизации плазмалеммы Тритоном X-100, аквапорины концентрируются в осадке, в то время как после солюбилизации додецилмальтозидом переходят в супернатант. Это также свидетельствует о присутствии их в «рафтах» и подтверждает предположение о латеральной гетерогенности аквапоринов РІР-типа в плазмалемме.

Исследования выполнены при поддержке РФФИ (грант № 05-04-48919).

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО  
АППАРАТА ХВОИ  
НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ГОЛОСЕМЕННЫХ РАСТЕНИЙ  
В СВЯЗИ С СЕЗОННЫМ НАКОПЛЕНИЕМ РОДОКСАНТИНА  
В ХЛОРОПЛАСТАХ

Structurally and functional characteristics of the needles photosynthetic apparatus of some gymnosperms in connection with the seasonal rhodoxanthin accumulation in chloroplasts

О.А. Шерстнёва, Т.Г. Маслова, Л.С. Буболо, Н.С. Мамушина, Е.К. Зубкова  
Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург  
E-mail: [olgasherst@mail.ru](mailto:olgasherst@mail.ru)

Одними из основных защитных механизмов фотосинтетического аппарата на уровне пигментных систем являются функционирование виолаксантинового цикла (ВЦ) и накопление каротиноида зеаксантина (Зк). Однако некоторые растения способны в определенных условиях к последующему неферментативному окислению Зк до вторичных каротиноидов, рассматриваемых как более эффективные фотопротекторные или экранирующие агенты.

Настоящая работа направлена на комплексное исследование фотосинтетического аппарата хвои *Taxus baccata* (Taxaceae), *Thuja occidentalis* и *Th.occidentalis* f. «Reingold» (Cupressaceae) при накоплении/убыли вторичного каротиноида родоксантина (Рд) в ходе вегетационного цикла растений. Выбранные объекты существенно различались по характеристикам пигментного комплекса и в первую очередь, по интенсивности синтеза Рд в сезонном аспекте. Так, в хвое *T. baccata* Рд не был обнаружен. У *Th. occidentalis* Рд начинал накапливаться зимой и особенно ранней весной, при сочетании высокой инсоляции и низких температур воздуха его уровень достигал 15-20 % от  $\Sigma$ Кар. *Th. oc. f. «Reingold»* характеризовалась значительно меньшим содержанием всех групп пигментов (особенно Хл) и способностью синтезировать Рд в течение всего вегетационного сезона: его относительное количество в годичном цикле колебалось в пределах 13-26 % от  $\Sigma$ Кар, а абсолютное увеличивалось более чем в пять раз в весенний период. Накопление Рд в клетках сопровождалось появлением фракции Зк (порядка 50 % от общего), не вступающей в светозависимые превращения ксантофиллов и, по-видимому, являющейся субстратом для дальнейшего окисления до Рд. На фоне значительного содержания Рд реакции ВЦ проходили несбалансированно и с достаточно низкой интенсивностью, в отличие от работы ВЦ у *T. baccata*. Обратная

реакция ВЦ осуществлялась не полностью, причем со значительно большей скоростью проходила ее первая ступень: эпоксидация Зк до промежуточного компонента антраксантина, что характерно для хлоропластов с несформировавшимися структурно-функциональными взаимосвязями. Активизация работы ВЦ начиналась в апреле при некотором снижении уровня Рд. Что касается других показателей фотосинтетического аппарата хвойных, то при смене сезонов года, когда естественно изменяются освещение и температура воздуха, они претерпевали ряд существенных обратимых структурно-функциональных перестроек. Так, в осенне-зимний период происходило накопление суммарного количества пигментов, в весенний (март-апрель) – снижение Хл на фоне нарастания уровня Кар. Изменение содержания Кар осуществлялось у всех объектов в основном за счет накопления ксантофиллов ВЦ (более чем в два раза) и Рд (у туй). Величины потенциальной интенсивности фотосинтеза, измеряемые при температуре среды обитания, также имели сезонную зависимость: были максимальными в летний период, с конца ноября до середины весны – минимальными, а к концу апреля фотосинтетическая активность начинала восстанавливаться. Показана четкая сезонная динамика изменений размеров и формы пластид, их месторасположение в клетке. Выявлена сезонная реорганизация тилакоидной системы хлоропластов. В зимне-весенний период в строме накапливались крахмал и пластоглобулы (Пг). Хотя изменение числа хлоропластов и размеров тилакоидной системы не совпадало с динамикой содержания общего количества пигментов, была показана четкая корреляция между накоплением Кар и увеличением объема Пг для всех изученных видов. У *Th. oc. f. «Reingold»* в строме пластид присутствовали как осмиофильные (обычного вида), так и светло-серые округлые и более крупные, чем Пг, включения, наибольшее количество которых было в марте на фоне максимального накопления клетками Рд. Возможно, Рд содержит именно в этих внутривнутрихлоропластных образованиях.

Таким образом, в сезонном аспекте показано, что накопление Рд в хлоропластах происходит при низких температурах воздуха, тормозящих ферментативные реакции. Для этого периода характерны существенное преобразование пластидома и очень низкая фотосинтетическая активность хвои. Так, наибольшее содержание Рд приходится на самый функционально неактивный этап в вегетационном цикле вечнозеленых растений. Активизация фотосинтетической деятельности в апреле связана с возвращением пластидома в состояние, близкое к летнему, и сопровождается интенсификацией работы ВЦ и снижением уровня Рд. Можно предположить, что функциональная значимость Рд заключается, во-первых, в его высокой антиокислительной способности. Во-вторых,

накопление Рд в значительных количествах в пределах хлоропласта, возможно, обратимо изменяет его структуру, подавляя функциональную активность в моменты самого неблагоприятного периода в сезонном цикле развития растений.

### МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

#### Metabolic activity of plant mitochondria under osmotic stress

А.Г. Шугаев, Н.А. Шугаева, И.П. Генерозова, Э.И. Выхребенцева  
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва  
E-mail: [ag\\_shugaev@ippras.ru](mailto:ag_shugaev@ippras.ru)

Известно, что митохондрии при определенных условиях реагируют подобно осмометрам на изменения тоничности инкубационной среды. При этом изменение объема матрикса оказывает существенное влияние на метаболическую активность органелл. В частности, в митохондриях печени крысы в условиях, приводящих к конденсации матрикса (в гипертонических 0.5-0.7 М растворах сахарозы или маннита), наблюдалось практически полное ингибирование скорости окисления субстратов в состоянии З (потеря дыхательного контроля) и активности АТФазы. Результаты аналогичных исследований, проведенных на митохондриях растений, немногочисленны и противоречивы. Полученные нами результаты свидетельствуют о наличии общей (с митохондриями животных) тенденции к изменению в гипертонических растворах сахарозы или маннита процесса окислительного фосфорилирования в митохондриях корнеплода свеклы и гипокотилей этиолированных проростков гороха. В частности, при изменении концентрации осмотиков в диапазоне 0.5-1.0 М наблюдалось снижение в 3-3.5 раза скорости окисления малата в состоянии З и скорости синтеза АТФ, а также уменьшение в полтора-два раза величины дыхательного контроля (ДК) по Чансу. В то же время митохондрии растений оказались гораздо более устойчивыми к осмотическому стрессу и сохраняли способность к синтезу АТФ и отчетливый ДК в гипертонических 1.0 М-ных растворах сахарозы и маннита. Несмотря на то, что причины обнаруженных различий не известны и требуют дальнейших исследований, очевидно, что подобное свойство митохондрий растений может иметь важное значение для поддержания процесса выработки энергии в экстремальных условиях. Известно, что при действии на растения различных типов абiotического стресса (засухи, засоления) происходят существенные



обезвоживание организма и повышение осмотичности цитоплазмы клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ № 07-04-01615.

**ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ОСНОВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ  
НА РАННИХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ  
И БЕРЕЗЫ ПУШИСТОЙ**

**Changes in the content of primary metabolites  
at early ontogeny stages in *Betula pendula* and *B. pubescens***

Т.А. Шуляковская, М.К. Ильинова, Г.К. Канючкова, С.М. Шредерс, А.В. Репин  
Институт леса Карельского НЦ РАН, г. Петрозаводск  
E-mail: sea@onego.ru

Цель нашей работы – изучение динамики показателей основного метаболизма в процессе прорастания семян и формирования проростков, всходов, сеянцев березы двух наиболее распространенных видов. Объектами исследования явились семена, однонедельные и трехнедельные проростки, шести-е и 10-недельные всходы, 15-недельные сеянцы березы повислой *Betula pendula* Roth и березы пушистой *B. pubescens* Ehrh. Из показателей метаболизма определяли содержание липидов и их жирнокислотный состав, а также содержание белкового азота, состав и содержание свободных аминокислот. Жирнокислотный состав липидов изучали с помощью хроматографа «Хроматэк-Кристалл-500», свободные аминокислоты – на автоматическом аминокислотном анализаторе ААА-339.

Липиды – главная форма запаса углерода в семенах многих видов растений. У березы в семенах велико содержание липидов: 67 % от абсолютно сухого вещества у березы пушистой и 48 – у б. повислой. К трехнедельному возрасту проростки содержали уже 20 % липидов у б. пушистой и 26 у б. повислой. К периоду формирования шестинедельных всходов уровень липидов дошел до 5-6 %, причем их содержание было примерно одинаковым в листьях, стебельках и корнях всходов березы обоих видов. Дальнейшее развитие всходов (оно происходило в благоприятных условиях питания, освещения, влажности) сопровождалось накоплением липидов в надземных органах. В составе запасных липидов семени на линолеовую кислоту (18:2) приходилось более 80 % от общего количества жирных кислот. Линоленовая кислота (18:3) была представлена лишь 1-2 %. В трехнедельных проростках преобладали

триеновые кислоты (главным образом, линоленовая), доля которых составила примерно треть от общего количества. Параллельно происходило снижение уровня диеновых кислот (главным образом, линолевой), относительное содержание которых доходило до 20 %. В листьях всходов березы доля триеновых кислот продолжала расти: в шестинедельных их стало 47 % у б. пушистой и 49 – у б. повислой, в десятинедельных – 54 и 57 % соответственно. В стебельках и корнях липиды содержали больше всего диеновых кислот: 30-43 в стебле и 41-52 % в корнях. Таким образом, в проростках, а затем в листьях всходов линолевая кислота превращалась в линоленовую, т.е. отмечалась десатурация, которая происходит под влиянием мембраносвязанных десатураз хлоропластов и эндоплазматической сети в присутствии активированных форм кислорода. Большое количество двойных связей в жирной кислоте делает ее более активной в обменных процессах. Белки являются главной формой запаса азота в семенах растений. В семенах б. пушистой 86 % общего азота приходилось на белковый, у б. повислой – 75. В первую неделю прорастания семян уровень белкового азота снижался до 46 и 49 % соответственно, что связано с активным гидролизом запасных белков. Интенсивный рост и развитие проростков приводили к тому, что в трехнедельном возрасте в них уже 76-79 % общего азота входило в состав белков. В органах всходов белковый азот возрос до уровня более 90 % от общего. В семенах березы свободные аминокислоты определялись в очень незначительных количествах. В однонедельных проростках березы пушистой обнаружено 23 различных аминокислоты в свободном состоянии, у б. повислой – 21. У обеих берез преобладали одни и те же аминокислоты: глутамин (31 и 39 % соответственно), аспарагин (26 и 18) и аргинин (25 и 15). В результате гидролитического распада запасных белков семени при прорастании выделяются глутаминовая и аспарагиновая кислоты, из которых затем образуются амиды глутамин и аспарагин, предохраняющие дикарбоновые аминокислоты от окисления. Высокое содержание аргинина в прорастающих семенах говорит о значительном участии этой аминокислоты в построении запасных белков. В трехнедельных проростках больше половины всех аминокислот составлял цитруллин. Эта непротеиногенная аминокислота является транспортным азотсодержащим веществом, характерным для березы. В высоких концентрациях определялся цитруллин в стеблях и корнях всходов березы (в шестинедельных – до половины всех кислот, а в 10-недельных – до 75-77 %). В листьях всходов проходил активный обмен аминокислот. При значительном преобладании цитруллина в стебельках и корнях шестинедельных всходов в их листьях обнаруживалось несколько аминокислот с

примерно одинаковым содержанием:  $\gamma$ -аминомасляной кислоты в листьях. Эта кислота является частью межклеточного сигнального пути, приводящего к регуляции роста и развития растения. Таким образом, получена картина перестройки метаболизма от расщепления и использования запасных веществ основных элементов – углерода и азота – при прорастании семян до стабилизации обменных процессов, обеспечивающих жизнедеятельность березы на ранних этапах онтогенеза.

### ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА АМИНОКИСЛОТ В ПОЧКАХ И ЛИСТЬЯХ БЕРЕЗЫ В ПЕРИОД ВЕГЕТАЦИИ

#### Changes in amino acid composition in buds and leaves of birch during the growing season

Т.А. Шуляковская, Л.В. Ветчинникова, А.В. Репин, С.М. Шредерс  
Институт леса Карельского НЦ РАН, г. Петрозаводск  
E-mail: sea@onego.ru

Аминокислоты играют важную роль в физиолого-биохимических процессах, происходящих в растениях. В то же время их состав и содержание в тканях и органах древесных растений исследованы пока недостаточно. Цель нашей работы – изучение динамики состава и содержания аминокислот почек и листьев березы в процессе их развития. Объектами исследования служили 20-30-летние деревья березы повислой *Betula pendula* Roth и березы пушистой *B. pubescens* Ehrh. Почки и листья отбирали в следующие фазы развития: набухающие почки (в условиях Карелии – конец апреля), распускающиеся почки (начало мая), сформировавшиеся листья (конец июня), желтеющие листья и молодые почки текущего года (конец сентября), покоящиеся почки (середина ноября). Извлечение аминокислот из тканей осуществляли по методу Б.П. Плешкова (1976), очистку экстракта от сахаров – на колонке с катионитом (смола КУ-2). Освобождение связанных аминокислот из белков проводили путем гидролиза с 6N HCl в запаянных ампулах в термостате при температуре 105 °С в течение одних суток. Состав аминокислот и их содержание изучали с помощью автоматического аминокислотного анализатора ААА-339.

Полученные результаты показали, что у исследованных берез наибольшее количество белковых и свободных аминокислот (на единицу сухого вещества) накапливалось в почках в период их набухания и распускания. Это обусловлено началом ростовых процессов растений в весенний период, когда в апикальных частях метаболизм аминокислот направлен главным образом на синтез

белка. Основной приток аминокислот в меристематические клетки происходит из зрелых тканей. По мере роста листовой пластинки менялось соотношение количества белковых аминокислот и свободных: его максимальная величина наблюдалась в сформировавшихся листьях (в конце июня). Снижение содержания свободных аминокислот в это время объясняется тем, что при завершении роста листовых пластинок у них существенно уменьшаются потребности в образовании белка, а вновь синтезируемые во взрослых листьях аминокислоты перемещаются в растущие ткани. В осенний период пожелтение листьев сопровождалось распадом белков и усилением оттока образующихся при этом свободных аминокислот, выносящих азот из листьев перед опадом. В составе белков почек и листьев берез обнаружено 16 аминокислот. Преобладающими из них являются лизин, а также глутаминовая, аспарагиновая кислоты, лейцин и аргинин. Аминокислотный состав белков почек и листьев березы незначительно изменялся в процессе их вегетативного развития от набухания почек весной до формирования новых почек осенью. Небольшая вариабельность количества отдельных связанных кислот, отмеченная при смене фаз развития растений, могла быть вызвана изменением не только состава аминокислот, но и соотношения различных групп белков, поскольку в нашей работе анализировался усредненный состав суммарных белковых аминокислот, полученный при гидролизе разнообразных белков растительных тканей. Состав свободных аминокислот более мобильный, чем белковых. Так, в почках при набухании и распускании некоторое преимущество над остальными было у аспарагиновой кислоты (13-15 % от всех кислот – в апреле и 12-23 – в мае). Содержание глутаминовой и  $\gamma$ -аминомасляной кислот, аргинина в эти фазы развития растений достигло десяти и более процентов. Во взрослых листьях обнаружено существенное преимущество глутаминовой и аспарагиновой кислот (24-28 и 22-25 % от общего количества аминокислот соответственно). В желтеющих листьях увеличилась доля глутаминовой кислоты (30-39 %), а аспарагиновой заметно снизилась (12-16 %). В это же время во вновь образовавшихся почках отмечено значительное содержание аргинина (19-34 %). В покоящихся почках концентрация аргинина возросла до 29-47 %. Преобладание отдельных свободных аминокислот в определенные фазы развития изученных берез, вероятно, связано с их функциональной ролью на разных этапах вегетации растений. В период роста, когда происходит активный метаболизм в распускающихся почках, повышается доля кислот глутаминовой и аспарагиновой групп. Среди них аспарат и особенно глутамат являются наиболее активными метаболитами. Находясь в центре обменных процессов в растущих тканях, глутамат активно расходуется. Во взрослых, полностью сформированных листь-

ях, завершение ростовых процессов сопровождается накоплением глутаминовой и аспарагиновой кислот, которые используются не так интенсивно, как в период роста. Дальнейшее увеличение доли глутамата в желтеющих листьях может быть связано с распадом белков и подготовкой азотных соединений к оттоку из листьев перед их опадом. В осенних почках, особенно в период покоя, отмечена высокая доля аргинина, который служит важным запасным азотным соединением, накапливающимся осенью и расходуемым весной. Описанные выше изменения в составе свободных аминокислот в почках и листьях берез связаны со сменой фаз развития растений и не зависят от их видовой принадлежности.

### ОСОБЕННОСТИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ФОТОСИНТЕЗА У МУТАНТНЫХ ФОРМ РАСТЕНИЙ

#### Energetic support of photosynthesis in mutants forms of plants

М.М. Якубова, З.М. Хамрабаева

Таджикский государственный национальный университет, г. Душанбе

E-mail: awst2001@mail.ru

$H^+$ -АТФаза хлоропластов является составной частью энзиматической системы, обеспечивающей аккумуляцию и использование энергии в ходе физиолого-биохимических процессов в организме. Исследование активности данного фермента и выявление его функциональных особенностей представляют еще больший интерес в связи с изучением мутантных форм растений. Использование мутантов открывает широкие перспективы для изучения механизма фотосинтеза, взаимосвязи между функциональными характеристиками и структурной организацией фотосинтетического аппарата, а также для исследования его потенциальных возможностей.

Из хлоропластов хлопчатника и арабидопсиса впервые был выделен очищенный сопрягающий фактор  $CF_1$ , изучены его АТФазная активность и влияние на нее различных факторов.

Выявлена важная закономерность, указывающая на то, что более высокая активность фермента у растений, обладающих большей функциональной активностью хлоропластов, а также продуктивностью связана не с изменением структуры самой  $H^+$ -АТФазы, а с особенностями мембранной организации фотосинтетического аппарата и его функциональной активностью.

Ответная реакция  $CF_1$  в мембраносвязанном и растворимом со-

стояниях в результате воздействия этанола как модификатора мембраны на уровне белок-липидных взаимодействий у растений, относящихся к различным таксономическим группам (хлопчатник и арабидопсис), проявляется по-разному.

Концентрации этанола, при которых наблюдается максимум активирующего действия, были одинаковыми для  $CF_1$  хлоропластов арабидопсиса как в мембраносвязанном, так и растворимом состоянии. Эти данные подтверждают предположение о том, что активации подвергается именно солюбилизованная форма фермента. Принято считать, что активация АТФазы при высоких концентрациях спирта обусловлена диссоциацией  $CF_1$  и активацией уже солюбилизованного фермента. Диссоциация  $CF_1$  в присутствии высоких концентраций спирта связана, по-видимому, с увеличением содержания спирта в мембране, что приводит к перестройке липидного бислояного окружения мембранных белков и изменению липидного матрикса.

Что же касается хлопчатника, то была выявлена другая закономерность: этанол как модификатор АТФазной активности оказывал неодинаковое воздействие на очищенный  $CF_1$  у исходного сорта и его мутанта. Удельная активность  $CF_1$ , выделенного из хлоропластов мутанта, превышала таковую у исходной формы. Можно было бы считать, что различия в активности очищенного  $CF_1$  вызваны изменениями в самом ферменте, но денситограммы белков  $CF_1$  после электрофореза и у исходного сорта, и у мутанта идентичны, т.е. по молекулярной массе, субъединичному составу изменений не произошло. Эти результаты наталкивают на мысль о том, что обнаруженные различия в АТФазной активности  $CF_1$  двух форм хлопчатника могут быть обусловлены различиями конформационной структуры белков  $CF_1$ . В литературе встречаются сообщения о микрогетерогенности сопрягающих белков, выделенных из хлоропластов шпината, пшеницы, ржи. Различия АТФазной активности электрофоретически чистых препаратов  $CF_1$ , изолированных из хлоропластов двух форм хлопчатника, пока можно объяснить лишь микрогетерогенностью этих форм  $CF_1$ .

Таким образом, можно заключить, что хлоропласты растений, различающихся по активности фотосинтетического аппарата, характеризуются различным уровнем энергообмена, которое, возможно, обусловлено генетическими особенностями самого растения. Следовательно, АТФазная активность  $CF_1$  тилакоидных мембран может служить биохимическим инструментом, определяющим потенциальные возможности хлоропласта при выявлении адаптационных механизмов на уровне фотосинтетического аппарата, а также и в качестве теста, указывающего на продуктивность растения.