

Карельский научный центр
Российской академии наук

ТРУДЫ

КАРЕЛЬСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

№ 12, 2015

Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

Петрозаводск
2015

Научный журнал
Труды Карельского научного центра
Российской академии наук
№ 12, 2015
Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

Scientific Journal
Transactions of the Karelian Research Centre
of the Russian Academy of Sciences
№ 12, 2015
EXPERIMENTAL BIOLOGY Series

Главный редактор
А. Ф. ТИТОВ, член-корр. РАН, д. б. н., проф.

Редакционный совет

А. М. АСХАБОВ, академик РАН, д. г.-м. н., проф.; Т. ВИХАВАЙНЕН, доктор истории, проф.; А. В. ВОРОНИН, д. т. н., проф.; С. П. ГРИППА, к. г. н., доцент; Э. В. ИВАНТЕР, член-корр. РАН, д. б. н., проф.; А. С. ИСАЕВ, академик РАН, д. б. н., проф.; А. М. КРЫШЕНЬ (зам. главного редактора), д. б. н.; Е. В. КУДРЯШОВА, д. флс. н., проф.; В. В. МАЗАЛОВ, д. ф.-м. н., проф.; И. И. МУЛЛОНЕН, д. фил. н., проф.; Н. Н. НЕМОВА, член-корр. РАН, д. б. н., проф.; В. В. ОКРЕПИЛОВ, академик РАН, д. э. н.; О. Н. ПУГАЧЕВ, член-корр. РАН, д. б. н.; Ю. В. САВЕЛЬЕВ, д. э. н.; Д. А. СУБЕТТО, д. г. н.; Н. Н. ФИЛАТОВ, член-корр. РАН, д. г. н., проф.; В. В. ЩИПЦОВ, д. г.-м. н., проф.

Editor-in-Chief
A. F. TITOV, RAS Corr. Fellow, DSc (Biol.), Prof.

Editorial Council

A. M. ASKHABOV, RAS Academician, DSc (Geol.-Miner.), Prof.; N. N. FILATOV, RAS Corr. Fellow, DSc (Geog.), Prof.; S. P. GRIPPA, PhD (Geog.), Assistant Prof.; A. S. ISAEV, RAS Academician, DSc (Biol.), Prof.; E. V. IVANTER, RAS Corr. Fellow, DSc (Biol.), Prof.; A. M. KRYSHEN' (Deputy Editor-in-Chief), DSc (Biol.); E. V. KUDRYASHOVA, DSc (Phil.), Prof.; V. V. MAZALOV, DSc (Phys.-Math.), Prof.; I. I. MULLONEN, DSc (Philol.), Prof.; N. N. NEMOVA, RAS Corr. Fellow, DSc (Biol.), Prof.; V. V. OKREPILOV, RAS Academician, DSc (Econ.); O. N. PUGACHYOV, RAS Corr. Fellow, DSc (Biol.); Yu. V. SAVELIEV, DSc (Econ.); V. V. SHCHIPTSOV, DSc (Geol.-Miner.), Prof.; D. A. SUBETTO, DSc (Geog.); T. VIHAVAINEN, PhD (Hist.), Prof.; A. V. VORONIN, DSc (Tech.), Prof.

Редакционная коллегия серии «ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ»

А. С. ГОРЮНОВ, к. ф.-м. н., доцент; В. А. ИЛЮХА (зам. отв. редактора), д. б. н., доцент; Н. Н. НЕМОВА (отв. редактор), чл.-корр. РАН, д. б. н., проф.; Н. М. КАЛИНКИНА, д. б. н.; О. Н. ЛЕБЕДЕВА, к. б. н., доцент; Е. М. МАТВЕЕВА, к. б. н.; Л. Л. НОВИЦКАЯ, д. б. н.; Е. К. ОЛЕЙНИК, д. б. н., доцент; Л. П. СМИРНОВ, д. б. н.; Л. В. ТОПЧИЕВА (отв. секретарь), к. б. н.

Editorial Board of the Experimental Biology Series

A. S. GORYUNOV, PhD (Phys.-Math.), Assistant Prof.; V. A. ILYUKHA (Deputy Editor-in-Charge), DSc (Biol.), Assistant Prof.; N. N. NEMOVA (Editor-in-Charge), RAS Corr. Fellow, DSc (Biol.), Prof.; N. M. KALINKINA, DSc (Biol.); O. N. LEBEDEVA, PhD (Biol.), Assistant Prof.; E. M. MATVEEVA, PhD (Biol.); L. L. NOVITSKAYA, DSc (Biol.); E. K. OLEJNIK, DSc (Biol.), Assistant Prof.; L. P. SMIRNOV, DSc (Biol.); L. V. TOPCHIEVA (Executive Secretary), PhD (Biol.).

ISSN 1997-3217 (печатная версия)
ISSN 2312-4504 (онлайн-версия)

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

© Карельский научный центр РАН, 2015
© Институт биологии Карельского
научного центра РАН, 2015
© Институт леса Карельского научного
центра РАН, 2015

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 616–092

МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ

П. Н. Кравченко, Е. К. Олейник

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Аутоиммунные болезни относятся к заболеваниям с неясной этиологией. Спектр аутоиммунных заболеваний широк, к наиболее известным из них относятся диабет 1 типа, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, рассеянный склероз, болезнь Крона, витилиго и др. Ключевую роль в развитии аутоиммунных реакций играют нарушения иммунологического гомеостаза. Несмотря на многочисленные исследования, точные механизмы развития аутоиммунитета все еще остаются малоизученными. В обзоре представлен анализ данных литературы о механизмах нарушения иммунологической толерантности. Дано описание наиболее обсуждаемых теорий развития патологических аутоиммунных процессов: теория наследственной предрасположенности, теория нарушения иммунологической регуляции с участием регуляторных Т-клеток, теория сетевой регуляции, инфекционная теория развития аутоиммунных заболеваний (молекулярная мимикрия, поликлональная активация лимфоцитов). Теория наследственной предрасположенности отражает важнейшую роль наследственных факторов в развитии аутоиммунитета, в частности, представлены сведения о связи аутоиммунных расстройств с главным комплексом гистосовместимости человека. Также в работе приведены данные, свидетельствующие о том, что развитие аутоиммунных процессов в организме может быть связано с изменениями в содержании и функционировании регуляторных Т-лимфоцитов. Эти клетки принимают непосредственное участие в механизмах клеточного иммунного ответа при аутоиммунных заболеваниях и могут служить объяснением нарушения иммунологической толерантности, впоследствии приводящей к развитию и прогрессированию иммунопатологии. В описании теории сетевой регуляции раскрывается идея идиотип-антиидиотипических взаимодействий, которые могут быть механизмом контроля аутоиммунных реакций в норме или приводить к активации аутореактивных клонов. Инфекционная теория развития аутоиммунных патологий, которая представлена в обзоре, основывается на результатах многочисленных исследований и указывает на то, что вирусы могут провоцировать сбои иммунитета и приводить к аутоиммунизации.

Ключевые слова: аутоиммунитет; аутоиммунные заболевания; HLA; Treg-клетки; HCMV; EBV; суперантигены.

P. N. Kravchenko, E. K. Oleinik. MECHANISMS OF IMMUNOLOGICAL TOLERANCE DISRUPTION

Autoimmune diseases belong to disorders with an unclear etiology. The spectrum of autoimmune diseases is wide, the most well known of them are type 1 diabetes, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, multiple sclerosis, Crohn's disease, vitiligo, and others. The key role in the development of autoimmune reactions is played by disturbances of immunological homeostasis. Despite numerous researches, the exact mechanisms of autoimmunity still remain unclear. The analysis of data provided by the literature on the mechanisms of disorders of immunological tolerance is presented in the review. The most discussed theories of pathological autoimmune processes development are described: the theory of hereditary predisposition, the theory of immunological dysregulation and regulatory T-cell dysfunction, the theory of network regulation, the infectious theory of autoimmune diseases development (molecular mimicry, polyclonal activation of lymphocytes). The theory of hereditary predisposition reflects the critical role of hereditary factors in the development of autoimmunity, in particular, the data on relations of autoimmune disorders to human major histocompatibility complex are provided. In addition, the data indicating that the development of autoimmune processes in an organism can be associated with changes in the content and function of regulatory T-lymphocytes are provided in the work. These cells are directly involved in the mechanisms of cellular immune responses in autoimmune diseases and may explain the disorders of immunological tolerance, subsequently leading to the development and progression of immunopathology. The idea of idiotype-anti-idiotype interactions, which can serve as a mechanism ensuring normal autoimmune reactions or lead to the activation of autoreactive clones, is revealed in the description of network regulation theory. The infectious theory of development of autoimmune pathologies presented in the review is based on the results of numerous researches and suggests that the viruses can provoke failures of immunity and lead to autoimmunity.

Key words: autoimmunity; autoimmune diseases; HLA; Treg cells; HCMV; EBV; superantigens.

Введение

Аутоиммунные болезни относятся к заболеваниям с неясной этиологией и патогенезом. В настоящее время известно более 80 различных типов аутоиммунных заболеваний (АИЗ), многие из которых приводят к потере трудоспособности людей активного возраста. К наиболее часто встречающимся аутоиммунным патологиям относятся такие заболевания, как ревматоидный артрит (РА), системная красная волчанка (СКВ), сахарный диабет 1 типа (СД1), рассеянный склероз (РС) и др. Данная группа заболеваний гетерогенна по степени распространения и типу иммунных механизмов, преобладающих при ответе на аутоантиген. Это может быть преимущественно клеточная реакция, состоящая в формировании эффекторных субпопуляций Т-лимфоцитов, и/или гуморальная реакция, проявляющаяся в выработке аутоантител. Ключевую роль в развитии аутоиммунных реакций играют нарушения иммунологического гомеостаза, которые в норме контролируют толерантность Т- и В-лимфоцитов к аутоантигенам. Активированные аутореактивные Т- и В-клетки индуцируют воспаление и повреждение собственных тканей организма.

Как правило, все аутоиммунные расстройства включают воспалительный процесс как один из ведущих патогенетических механизмов их возникновения.

Несмотря на многочисленные исследования, точные механизмы развития аутоиммунитета все еще остаются неясными. В настоящее время существует несколько теорий развития патологических аутоиммунных процессов, среди которых наиболее обсуждаемыми и аргументированными являются теория наследственной предрасположенности, теория расстройства иммунологической регуляции с участием регуляторных Т-клеток, теория сетевой регуляции, инфекционная теория развития АИЗ (молекулярная мимикрия, поликлональная активация лимфоцитов).

Теория наследственной предрасположенности

Данные обширных иммуногенетических исследований указывают на важнейшую роль наследственных факторов в развитии АИЗ. Многими учеными показана связь полиморфизмов гена RTPN22 (регулирует активацию лимфоцитов) с развитием таких заболеваний,

как PA [Chang et al., 2012; Song et al., 2013], PC [Lee et al., 2012], витилиго [Song et al., 2012] и др. В ряде работ была идентифицирована ассоциация полиморфизма гена цитотоксического Т-лимфоцитарного антигена 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA4) с СД1 [Wafai et al., 2011], воспалительными заболеваниями кишечника [Lee et al., 2014], язвенным колитом [Chen et al., 2010]. CTLA4 является негативной ко-стимуляторной молекулой, ингибирующей активацию и пролиферацию лимфоцитов. С множественными аутоиммунными реакциями связаны мутации гена FOXP3, который является необходимым для развития и функционирования регуляторных клеток (Treg) [Sakaguchi et al., 2010]. Активно обсуждается взаимосвязь полиморфизма гена IL2RA и/или IL2RB с развитием язвенного колита, воспалительных заболеваний кишечника [Bouzid et al., 2013], СД1 [Barrett et al., 2009; Stahl et al., 2010], PC [Maier et al., 2009; Wang et al., 2011], PA [Stahl et al., 2010; Knevel et al., 2013].

В литературе имеются многочисленные данные об ассоциации аутоиммунных расстройств с главным комплексом гистосовместимости человека HLA (**Human leukocyte antigens**). К настоящему времени установлено, что большинство аутоиммунных заболеваний ассоциируются с наличием в HLA-фенотипе следующих антигенов: DRB1, DR2, DR3, DR4 и DR5 (табл. 1).

Таблица 1. Ассоциации АИЗ с HLA-комплексом

HLA-DR аллели	Ассоциации с АИЗ	Литература
DR7, DRB1	Ревматоидный артрит	Shimane et al., 2013; Furukawa et al., 2012
DR3, DR4	Диабет 1 типа	Menconi et al., 2010; Hasham, Tomer, 2012; Johnson et al., 2012
DR3, DR5	Аутоиммунный тиреодит	Menconi et al., 2010; Hasham, Tomer, 2012
DR2, DRB1	Системная красная волчанка	Moser et al., 2009; Shimane et al., 2013
DR3, DR4	Аутоиммунный гепатит	Liberal et al., 2013

Выявленные ассоциации, по-видимому, объясняются тем, что гены системы HLA участвуют в селекции Т-лимфоцитов в тимусе. При наличии определенных аллелей генов системы HLA не происходит элиминации Т-лимфоцитов, которые несут на своей поверхности рецепторы к аутоантигену определенных клеток, тогда как в норме такие Т-лимфоциты, как правило, элиминируются на стадии созревания. Таким образом, при наличии предрасположенности к АИЗ в крови циркулирует некоторое количество аутореактивных Т-лимфоцитов, активирующихся при повышении уровня аутоантигена

в крови, что может иметь место при разрушении ткани (химическими веществами, вирусами) либо при появлении в крови вирусных агентов, чьи антигены имеют перекрестную реакцию с антигенами клеток организма.

Некоторое представление о механизме ассоциации генов HLA-DRB1 с АИЗ дает гипотеза общего антигенного эпитопа. Предполагается, что варианты генов HLA-DRB1 кодируют синтез очень близких друг другу последовательностей аминокислот (лейцин-глутамин-лизин-аргинин-аланин) в третьей гипервариабельной области DRβ-цепей, образуя антигенсвязывающую полость. Эти последовательности называются «общим эпитопом» (shared epitope – SE). С одной стороны, предполагается, что конформация данного участка может приводить к презентации артритогенных пептидов CD4+ лимфоцитам. Е. А. James с соавт. [2010] было показано, что молекулы HLA-DRB1 с общим антигенным эпитопом связывают определенные цитруллинированные пептиды, полученные из предполагаемых аутоантигенов, связывая цитруллин, но не аргинин. С другой стороны, к развитию АИЗ может приводить молекулярная мимикрия между аминокислотными последовательностями SE и вирусными антигенами. Так, у больных PC было выявлено значительное сходство между комплексом DRB5*0101- EBV (*Epstein-Barr virus, EBV*, вирус Эпштейн-Барр) и DRB1*1501-ОБМ (основного белка миелина), что, возможно, и способствует их узнаванию одним и тем же Т-клеточным рецептором [Lang et al., 2002]. Также было выявлено, что гликопротеин 110 EBV имеет последовательность аминокислот QKRAA, соответствующую таковой в третьем гипервариабельном регионе HLA DRB1 аллелей, ассоциированных с риском развития PA. Т-клеточный пролиферативный ответ к gp110EBV, содержащему QKRAA-последовательность, определяется только у больных PA с наличием HLA DRB1 в сравнении с контрольной группой без QKRAA [Ollier, 2000].

Кроме того, установлено, что некоторые аллельные сочетания ассоциируются с протективным действием к развитию АИЗ. Так, например, при диабете 1 типа к таким гаплотипам относятся DR2 (DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602), DR5 (DRB1*1101-DQA1*0102-DQB1*0301) [Рыжков и др., 2013], при PA – DRB1*11, DRB1*13, DRB1*15, DQA1*01:02, DQA1*01:03, DQB1*06:02 [Shapira et al., 2010]. Эти наблюдения подтверждают ранее сформулированное предположение о механизме ассоциации между генами HLA II класса и PA – гипотезу резистентности PA, или RAP гипотезу (Rheumatoid Arthritis Protective hypothesis)

[Zanelli et al., 1995; Snijers et al., 2001]. Согласно этой теории, протективное действие последовательности DERAА может включать в себя презентацию DRB1-образованных пептидов DQ молекулами, приводящую к генерации DRB1-специфических регуляторных CD4⁺ Т-клеток или к элиминации потенциальных аутореактивных Т-клеток в тимусе.

Таким образом, полученные данные о сложных взаимоотношениях между генами и АИЗ свидетельствуют о существовании общих генов аутоиммунной предрасположенности, которые и могут выступать как одна из причин развития аутоиммунного процесса. Однако наследственный фактор не обязательно определяет развитие аутоиммунитета, поскольку существует варьирование межпопуляционных и межэтнических особенностей аллельного полиморфизма генов.

Теория нарушения иммунологической регуляции с участием регуляторных Т-клеток

Возникновение аутоиммунизации может быть связано и с нарушением иммунологической толерантности в организме. В иммунной системе существует ряд механизмов для контроля ауто толерантности, центральным из которых является клональная селекция и апоптоз аутореактивных Т-клеток в тимусе. В норме иммунная система сдерживает аутореактивность лимфоцитов с помощью регуляторных механизмов. Особое место в этом вопросе отводится популяции Трег-лимфоцитов, благодаря их уникальной способности подавлять функции множества иммуноцитов, включая классические CD4⁺ Т-хелперы, цитотоксические CD8⁺ Т-лимфоциты, натуральные киллерные (NK)-, В- и антиген-презентирующие клетки. Трег-клетки представляют собой отдельную популяцию иммунокомпетентных лимфоцитов, которая составляет в среднем 3–5 % от общего числа CD4⁺ Т-клеток периферической крови человека [Sakaguchi et al., 2010]. Трег-клетки играют важную роль в контроле аутоиммунитета, аллергии, трансплантационной толерантности, иммунного ответа против вирусов, паразитов, бактерий и дрожжей. Tregs активно участвуют в поддержании ауто толерантности и предотвращении аутоиммунной реакции. Удаление Tregs приводит к экспансии Т-эффекторных клеток с последующим развитием аутоиммунных расстройств [Wing, Sakaguchi, 2010]. Широкий спектр супрессорных механизмов, используемых Трег-клетками, может осуществляться с помощью клеточно-контактной

супрессии (при участии в межклеточном взаимодействии CTLA-4/B7, цАМФ или гранзимов). Также супрессия может быть опосредована локальной секрецией ингибиторных цитокинов (TGF-β, IL-10, IL-35) или конкурентным связыванием факторов роста [Sojka et al., 2008].

Механизмы, которые обеспечивают супрессию аутоиммунного ответа на клеточном уровне, изучены недостаточно. Предполагается, что нарушение иммунной регуляции с участием Трег-клеток при аутоиммунизации может быть вызвано снижением количества Tregs и/или ослаблением их функционирования вследствие различных дефектов. Также нарушение иммунной регуляции может быть вызвано резистентностью аутореактивных эффекторных Т-лимфоцитов к супрессии Трег-клеток [Buckner, 2010, Wehrens et al., 2011], или конверсией Трег-клеток в эффекторные в условиях провоспалительного микроокружения [Zhou et al., 2009; O'Shea, Paul, 2010; Bailey-Bucktrout, Bluestone, 2011]. Наиболее сильно аутоиммунные реакции проявляются при генетических дефектах, затрагивающих развитие Трег-клеток. Это прежде всего наблюдается у больных с IPEX-синдромом (Х-ассоциированная иммунная дисрегуляция, полиэндокринопатия, энтеропатия) и scurfy мышей, которые развиваются в результате мутации гена FOXP3/Foxp3 и связаны с множественными аутоиммунными реакциями [Sakaguchi et al., 2010]. FOXP3 является ключевым маркером регуляторных лимфоцитов, необходимым для поддержания пула Трег-клеток на периферии и важным для реализации их супрессорной функции.

В недавних исследованиях были получены данные о снижении содержания Трег-клеток в периферической крови больных при таких аутоиммунных заболеваниях, как РА [Kim et al., 2012; Niu et al., 2012; Li et al., 2014], СКВ [Suen et al., 2009; Habibagahi et al., 2011], РС [Antiga et al., 2010], СД1 [Luczynski et al., 2009; Ryba-Stanislawowska et al., 2013], болезнь Бехчета [Kim et al., 2012]. Получены сведения о том, что Tregs могут накапливаться непосредственно в местах локального воспаления. Было показано увеличение Tregs в органах-мишенях – в цереброспинальной жидкости у больных РС [Venken et al., 2008; Fritsching et al., 2011], в синовиальной жидкости больных РА [Moradi et al., 2014] по сравнению с периферической кровью этих же больных. Экспериментальные исследования также свидетельствуют о негативной корреляции между уровнем Трег-лимфоцитов и активностью заболевания при аутоиммунных расстройствах, включая РА [Kawashiri et al., 2011; Kim et al., 2012], РС [Venken et al., 2008;

Saresella et al., 2008], СКВ [Habibagahi et al., 2011] и др. По данным ряда исследователей, уровень Tregs может не отличаться от контроля, или даже их содержание в крови может быть увеличено [Alonso et al., 2009; Marwaha et al., 2010; Nie et al., 2013], однако наряду с этим отмечается снижение супрессорной функции этих клеток [Radstake et al., 2009; Mikulkova et al., 2011; Prado et al., 2013]. Количественный дефект Treg-клеток может проявляться вследствие снижения уровня экспрессии FOXP3, что было показано у больных РА [Hun et al., 2008] и РС [Venken et al., 2008].

Функциональный дефект Treg-клеток при РС также может быть связан с низким уровнем экспрессии мРНК IL-10 [Martinez-Forero et al., 2008]. Больные СКВ характеризуются дисбалансом секреции регуляторных цитокинов (увеличением IL-10, снижением TGF- β и IL-2) [Ohl, Tenbrock, 2011]. Некоторые авторы связывают нарушение супрессорной функции Treg-клеток с IL-2, который необходим для дифференцировки Tregs на периферии и поддержания стабильной экспрессии FOXP3 и CD25 [Davidson et al., 2007]. В ряде работ на мышинных моделях было продемонстрировано, что дефицит IL-2, IL-2Ra или IL-2R β приводит к формированию аутоиммунной патологии [Bettini, Vignali, 2009; Russell et al., 2012; Garg et al., 2012], которая может отменяться адаптивным переносом Treg-клеток [Malek, Castro, 2010]. Так, в исследовании с NOD мышами (non-obese diabetic mice, экспериментальная модель диабета 1 типа) была выявлена связь между снижением функциональной активности Treg-лимфоцитов в местах воспаления с понижением уровня IL-2 [Bettini, Vignali, 2009]. Также были обнаружены нарушения в сигнальном каскаде IL-2R Tregs больных диабетом 1 типа, приводящие к уменьшению восприимчивости Treg-клеток к IL-2, вследствие чего снижалась его доступность Treg-клеткам [Long et al., 2010].

Также ослабление супрессии может быть связано с недостаточной экспрессией Treg-ассоциированных молекул, которые могут участвовать в контакт-зависимой супрессии. Предполагается, что у больных РА происходит снижение экспрессии CTLA-4 на Treg-клетках, что может быть важным механизмом нарушения их супрессорной активности [Flores-Borja et al., 2008]. Однако данные, касающиеся терапии анти-CTLA-4 Ig (абатацептом – биологическим противоревматическим препаратом) в отношении функциональной активности Treg-лимфоцитов у больных РА, показали противоречивые результаты. Одни исследователи наблюдали только снижение количества

Treg-клеток, при отсутствии изменений их функциональной активности [Pieper et al., 2013], в то время как другие, напротив, отмечают увеличение супрессорной активности Treg-клеток, несмотря на снижение их числа [Alvarez-Quiroga et al., 2011]. Среди других причин дисфункции Treg-клеток рассматривается нарушенная регуляция апоптоза. Показано, что Tregs имеют повышенную чувствительность к индукторам апоптоза у больных СКВ [Miyara et al., 2005], СД1 [Jailwala et al., 2009].

В ряде исследований сообщается, что причиной нарушения иммунной регуляции являлись не Tregs, а резистентность эффекторных клеток к Treg-опосредованной супрессии, вследствие их чрезмерной активации [Schneider et al., 2008; Buckner, 2010]. Так, A. Schneider с соавт. [2008] была продемонстрирована устойчивость эффекторных Т-клеток пациентов с СД1 к супрессии, опосредованной Treg-клетками, выделенными из крови здоровых доноров. Подобный феномен резистентности Т-эффекторов был обнаружен и при системной красной волчанке, болезни Крона, псориазе, ювенильном идиопатическом артрите [Schneider et al., 2008; Buckner, 2010; Wehrens et al., 2011]. Механизмы, с помощью которых эффекторные Т-клетки становятся резистентными к супрессии, неизвестны. У пациентов с ювенильным идиопатическим артритом было показано, что гиперактивация протеинкиназы-В в воспалительных эффекторных Т-клетках и была причиной устойчивости к Treg-опосредованной супрессии [Wehrens et al., 2011]. В другом исследовании сообщается о IL-6-опосредованной резистентности к Treg-клеточной супрессии у больных псориазом [Goodman et al., 2009].

Последние исследования показали, что FOXP3⁺ Treg-лимфоциты могут сохранять пластичность развития и перепрограммироваться в Т-хелперные клетки в условиях определенного микроокружения [Zhou et al., 2009; O'Shea, Paul, 2010; Bailey-Bucktrout, Bluestone, 2011]. Было продемонстрировано, что FOXP3⁺ Tregs секретируют цитокины, ассоциированные с Т-хелперными клетками, такие как IFN- γ , IL-2 и IL-17 [Komatsu et al., 2009]. В ряде работ было обнаружено увеличенное количество FOXP3⁺IFN- γ ⁺ клеток у пациентов с РС [Dominguez-Villar et al., 2011], СД1 [Mc Clymont et al., 2011]. Эти так называемые IL-17, секретирующие CD4⁺FOXP3⁺, Tregs могут играть существенную роль в воспалении [Bovenschen et al., 2011; Komatsu et al., 2014; Wang et al., 2015]. В периферической крови больных РА данные клетки обладают потенциальной

супрессорной активностью, а уже непосредственно в сайте воспаления – синовиальной жидкости – показывают ее отсутствие и могут быть патогенными [Wang et al., 2015].

Таким образом, в последние годы накоплены убедительные данные о том, что Treg-клетки контролируют периферический иммунный ответ и принимают непосредственное участие в механизмах клеточного иммунного ответа при АИЗ. Изменения в содержании и функционировании Treg-лимфоцитов могут служить объяснением нарушения иммунологической толерантности, впоследствии приводящей к развитию и прогрессированию иммунопатологии. Противоречивые данные о количестве и функционировании Treg-клеток, наблюдаемые в случае определенных аутоиммунных заболеваний, могут объясняться отсутствием специфического маркера Treg. Также следует учитывать, что Treg-лимфоциты могут включать различные механизмы супрессии при одной и той же патологии.

Теория сетевой регуляции

Еще недавно считалось, что секреция аутоантител против собственных иммуноглобулинов является причиной патологических изменений в организме человека, приводящих к аутоиммунным расстройствам. Впоследствии было обнаружено, что выработка аутоантител является свойством нормальной иммунной системы, направленной на сохранение и поддержание молекулярно-клеточного гомеостаза. Их синтез поддерживается в определенных границах, необходимых для выполнения регуляторных функций, а их гиперпродукция (как и гипопродукция) может вести к развитию тех или иных патологических состояний [Зайчик и др., 2013]. В 1974 году Нильсом Ерне [1974] была предложена идея идиотип-антиидиотипического (ИАИ) взаимодействия. Данная теория базируется на уникальных свойствах В- и Т-клеточных рецепторов. Согласно этой гипотезе, иммунная система представляет собой цепь взаимодействующих антигенных идиотипов иммуноглобулинов и антиидиотипических антител. И иммунный ответ поддерживает баланс этой иммунорегуляторной сети, в которой взаимодействуют идиотипы и антиидиотипы рецепторов Т- и В-лимфоцитов.

В соответствии с концепцией идиотипической сети в организме существует равновесие между идиотипами (в том числе антителами к чужеродным антигенам) и антиидиотипами (в том числе этими антигенами). Под влиянием экзогенного антигенного стимула

(антиидиотипа) либо поступающего от клеток собственного организма происходит разбалансировка сети, восстанавливаемая синтезом антител (идиотипа, антител 1-го порядка). Антитело 1-го порядка, действуя как антиген, вызывает образование к своему идиотипу антител 2-го порядка и т. д. При этом антитело каждого порядка как бы несет «внутренний образ» антигена, который передается эстафетно в цепи образования антиидиотипических антител. И так продолжается, пока система не вернется к прежнему устойчивому состоянию [Uner, Gavalchin, 2006]. ИАИ-взаимодействия обуславливают возможность как стимуляции, так и супрессии лимфоцитов под влиянием антиидиотипических антител.

При иммунном ответе вырабатываются антитела, образуются иммунные комплексы и/или развивается клеточно-опосредованный иммунитет. Для того чтобы сбалансировать эти медиаторы иммунопатологии и не дать им «работать» против собственных тканей, одновременно включается регуляторный механизм, представляющий собой сложную сеть Т-, В-клеток и антител, который в целом можно назвать антиидиотипическим иммунным ответом [Jacobsen et al., 2010]. Этот механизм обеспечивает контроль, необходимый для предотвращения патологической активации аутореактивных лимфоцитов во время бесчисленных иммунных реакций, генерируемых «хозяином» в пределах собственного организма. Нарушение ИАИ-взаимодействий может способствовать развитию аутоиммунных заболеваний. Сегодня наблюдается всплеск интереса к изучению ИАИ-взаимодействий в связи с новыми открытиями в области молекулярно-генетических исследований рецепторов Т- и В-лимфоцитов [Beduleva, Menshikov, 2010; Routsias et al., 2011; Larsson et al., 2013; Храмова и др., 2014]. В этих работах показано, что аутореактивные лимфоциты могут контролироваться идиотипическими лимфоцитами – супрессорами.

Таким образом, ИАИ-взаимодействия могут быть механизмом контроля аутоиммунных реакций в норме или приводить к активации аутореактивных клонов.

Инфекционная теория развития АИЗ (молекулярная мимикрия, поликлональная активация лимфоцитов)

Как возможные этиологические факторы аутоиммунных заболеваний, таких как СКВ, РА, РС, синдром Шегрена, рассматриваются возбудители инфекций. Механизмы, с помощью которых данные патогены приводят к срыву

иммунной толерантности и запуску аутоиммунного процесса, остаются не до конца раскрытыми. Есть несколько гипотез, объясняющих, как вирусные инфекции связаны с АИЗ. Одна из них – гипотеза молекулярной мимикрии, появившаяся около 20 лет назад, является наиболее убедительной моделью развития аутоагрессии.

Концепция «молекулярной мимикрии», предложенная Р. Домейном в 1964 г., основана на структурном сходстве (по аминокислотной последовательности) между патогеном или его метаболитом и тканями макроорганизма (аутоантигенами). Иммунный ответ в конечном итоге может развернуться на собственный пептид в результате перекрестной реактивности с эпитопом инфекционного возбудителя, что приводит к активации специфических наивных аутореактивных лимфоцитов. В результате протективный иммунный ответ, направленный против патогенных антигенов, может завершиться аутоиммунной реакцией. В эксперименте было показано, что развитие энцефаломиелита у крыс могло быть индуцировано инъекцией полипептида вируса гепатита В. Этот полипептид из десяти аминокислот (ICGYGSLPQ E) содержит участок, почти идентичный фрагменту основного миелинового белка (ICGYGSLPQE). Совпадение наблюдалось по шести последовательно расположенным аминокислотам [Fujinami, Oldstone, 1985].

Большое количество исследований посвящено роли вирусов в патогенезе аутоиммунных патологий, как наиболее вероятных этиологических факторов аутоиммунных заболеваний. Наиболее изучена взаимосвязь АИЗ с герпес-вирусами, в частности с γ -герпес-вирусами, такими как *EBV*, цитомегаловирус человека (*HCMV*, *Human cytomegalovirus*), поскольку данные вирусы характеризуются тропизмом к лимфоидным клеткам (Т- и В-лимфоцитам). Исследования, связанные с изучением серологических показателей и/или вирусной нагрузки, также указывают на потенциальную роль этих вирусов в развитии АИЗ, включая РА [Reynier et al., 2009; Krzysztalowska-Wawrzyniak et al., 2011; Mohammad et al., 2014], СКВ [Krzysztalowska-Wawrzyniak et al., 2011; Esen et al., 2012; Draborg et al., 2012], РС [Lucas et al., 2011; Perron et al., 2012; Pakpoor et al., 2013], СД1 [Schulte et al., 2010; Zanone et al., 2010; Mohammad et al., 2014].

Все эти вирусы характеризуются широкой распространенностью среди людей и персистенцией в организме. Активация вирусной инфекции и ее переход в латентное состояние тесно взаимосвязаны с состоянием иммунной

системы. Данные вирусы могут влиять на функцию медиаторов межклеточного взаимодействия, так как могут кодировать некоторые цитокины, гомологичные цитокинам хозяина, блокировать запрограммированную клеточную смерть. Так, например, продукты генов *HCMV* способны вызывать иммуносупрессию за счет модулирования передачи сигналов и активации сигнальных путей, нарушая функции $IFN\gamma$, ингибируя апоптоз, воздействуя на Fas-зависимые сигналы. Более того, *HCMV* способен кодировать *IL10* сходный с *IL10* хозяина, тем самым оказывая влияние на функции иммунной системы человека [Halenius, Hengel, 2014]. *EBV* также может подавлять иммунный ответ хозяина с помощью кодирования гомологичного *IL-10*, что в свою очередь может способствовать персистенции вируса в организме [Ouyang et al., 2014]. Предполагается, что в инфицированных Т-клетках может нарушаться Т-клеточный апоптоз в результате экспрессии белка **ZEBRA** вируса *EBV*, который приводит к инактивации NF- κ B [Dreyfus et al., 1999] и усилению экспрессии p53 [Dreyfus et al., 2000].

Молекулярная мимикрия может инициировать аутоиммунизацию в результате развития перекрестной иммунной реакции при структурном сходстве антигенных детерминант вируса и хозяина (табл. 2) либо в результате модификации антигенов тканей организма.

Однако все больше накапливается данных, свидетельствующих в пользу того, что одной лишь молекулярной мимикрии недостаточно для развития АИЗ. Широко распространено мнение о том, что суперантигены вносят значительный вклад в развитие аутоиммунитета. Суперантигены представляют собой группу патогенных бактериальных и вирусных белков, которые способны активировать большое количество Т- и В-лимфоцитов, независимо от антигенной специфичности этих клеток. Отличительной особенностью суперантигенов является то, что они способны активировать лимфоциты без необходимого предварительного процессинга и презентации на поверхности антиген-презентирующих клеток (АПК). При этом суперантиген, минуя этот необходимый для специфического распознавания этап, способен одновременно связывать молекулы МНС II класса на поверхности АПК и фрагмент вариабельной части бета-цепи Т-клеточного распознающего рецептора на поверхности Т-клетки, имитируя таким образом узнавание антигена Т-клеточным рецептором. В результате происходит активация поликлональных Т-лимфоцитов с массивным высвобождением цитокинов, участвующих в воспалительных процессах,

Таблица 2. Примеры АИЗ с предполагаемым механизмом действия молекулярной мимикрии инфекционных агентов

АИЗ	Орган-мишень	Аутоантиген	Патоген, несущий элементы, имеющие схожую структуру с аутоантигеном	Литература
СД1	β-клетки поджелудочной железы	I-A2 ₈₀₅₋₈₁₇ ; GAD65	<i>Rotavirus (RV-P7₄₀₋₅₂)</i>	Honeyman et al., 2010
		GAD65	<i>rubella</i>	Ou et al., 2000
		I-A2	<i>Enterovirus (V-P1)</i>	Harkonen et al., 2002
		GAD65	<i>CMV</i>	Hiemstra et al., 2001
РС	Миелин	ОБМ	<i>EBV (EBNA1)</i>	Lünemann et al., 2008; Cheng et al., 2012
			<i>HHV-6 (U24)</i>	Tejada-Simon et al., 2003
		МОГ	<i>CMV (UL86)</i>	Brok et al., 2007
			<i>HERV-W (ERVEW2)</i>	do Olival et al., 2013
РА	Суставы (хрящи и кости)	СЕР-1 человека	<i>P. gingivalis (СЕР-1)</i>	Lundberg et al., 2008
		Коллаген (p62)	<i>EBV (EBNA-1 (p107))</i>	Li et al., 2013
СКВ	Системно (кожа, суставы, почки, ЦНС)	Аутоантитела против эпителиальных SmB, SmD1	<i>EBV (EBNA-1)</i>	James, Harley, 1992; Sabbatini et al., 1993
		Антитела против Ro (aa169–180)	<i>EBV (EBNA-1 (aa 58–72))</i>	McClain et al., 2005
		pP65	<i>CMV (UL83)</i>	Halenius, Hengel, 2014
Аутоиммунная язва	Клетки эпителия желудка	H+/K+-ATPase	<i>H. pylori</i>	Amedei et al., 2003
Аутоиммунный панкреатит	Клетки поджелудочной железы	Карбоангидраза II человека	<i>H. pylori (α-карбоангидраза)</i>	Guarneri et al., 2005
		UBR2	<i>H. pylori (PBP)</i>	Frulloni et al., 2009

Примечание. I-A2 (tyrosine phosphatase-like insulinoma Ag 2) – инсулинома-ассоциированный антиген 2; GAD65 (glutamic acid decarboxylase) – глутаматдекарбоксилаза; **ОБМ** – **основной белок миелина**; **МОГ** – **миелин-олигодендроцитарный гликопротеин**; СЕР-1 (citrullinated-α-enolase peptide) – цитрулированный пептид α-энлаза; **H+/K+-ATPase (gastric H+/K+-adenosine triphosphatase)** – **H+/K+ – аденозин трифосфатаза желудка**; PBP (plasminogen-binding protein) – плазминоген-связывающий белок; UBR2 (ubiquitin-protein ligase E3 component n-recogin 2) – компонент n-recogin 2 убиквитин-протеин лигазы E3. *Rotavirus* – ротавирус; *Enterovirus* – энтеровирус; EBNA1 – ядерный антиген 1 EBV (Epstein-Barr virus) – вирус Эпштейн-Барр; *HHV-6* (Human herpesvirus 6) – человеческий вирус герпеса 6; *CMV* (cytomegalovirus) – цитомегаловирус; *HERV-W* (Human endogenous retrovirus type W) – человеческий эндогенный ретровирус типа W.

связанных с различными заболеваниями, такими как РА, СД1, РС, СКВ и др.

Известны два типа суперантигенов: эндогенные (вирусные) и экзогенные (бактериальные). К наиболее изученным бактериальным суперантигенам относят энтеротоксины А, В золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*), экзотоксины А-Г стрептококка (*Streptococcus pyogenes*), а к вирусным – *HERV-W*, *EBV*, *CMV* [Sur et al., 2013]. Также суперантигены могут быть классифицированы на три большие группы на основе их взаимодействия с МНС II класса. Одна группа связывается с α-цепью с контактом или без контакта с антигенным пептидом (например, пирогенный экзотоксин А *S. pyogenes* и энтеротоксин В *S. aureus*). Другая группа связывает β-цепь (например, пирогенный экзотоксин С и К/Л *S. pyogenes*). Третья группа связывается перекрестной связью с двумя цепями МНС II класса (энтеротоксин А *S. aureus*) [Fraser, Proft, 2008]. Эти данные по суперантигенам представляют интерес в связи с тем, что бактериальные или вирусные инфекции обнаруживаются у большинства больных

АИЗ, в частности РА: *P. gingivalis* [Martinez-Martinez et al., 2009; Röhner et al., 2010], *EBV* [Klatt et al., 2005; Erre et al., 2015], *CMV* [Pierer et al., 2012; Mohammad et al., 2014]. В ряде работ было показано, что иммунизация с *P. gingivalis* или энлазой *P. gingivalis* индуцировала или усугубляла артрит [Cantley et al., 2011; Kinloch et al., 2011].

Несмотря на пристальное внимание к изучению механизмов, с помощью которых суперантигены влияют на развитие АИЗ, они до сих пор остаются не до конца ясными. Предполагается, что пептидогликан грамм-положительных бактерий усиливает секрецию провоспалительного IL-6 синовиальными фибробластами через TLR2R/FAK/PI3K/Akt and AP-1 сигнальный путь [Chiu et al., 2009]. Общеизвестно, что усиление синтеза IL-6 сопутствует воспалительным процессам и коррелирует с тяжестью аутоиммунного заболевания [Hirano, 2010]. Группой авторов было показано, что *P. gingivalis* у больных РА может вызывать неспецифическую активацию лимфоцитов [Bartold et al., 2010; Mikuls et al., 2012]. Е. Röhner с соавторами [2010] в своей

работе показали, что эта бактерия активирует ранние стадии апоптоза хондроцитов, что представляет собой еще один возможный путь разрушения хряща при РА. Интересные результаты были получены Islander с соавт. [2010], которые в своем исследовании продемонстрировали, что суперантигены *S. aureus* стимулируют секрецию IL-17 CD4⁺ Т-клетками памяти у взрослых доноров. В другом исследовании было показано, что МОГ-специфичные Т-хелперы 1 были способны секретировать IL-17 под влиянием стимуляции эндотоксина В *S. aureus*. Эти данные привели к предположению, что аутореактивные МОГ Th1 при встрече с суперантигеном и в результате стимуляции могут секретировать IL-17, чтобы вызвать воспаление и демиелинизацию в центральной нервной системе больных РС [Yomogida et al., 2013].

В исследовании на моделях животных был оценен иммунный ответ у MRL/lpr мышей (Murphy Roths Large), зараженных гельминтами, в частности *Heligmosomoides polygyrus*, *Nippostrongylus brasiliensis*, и бактериями, в частности *Nocardia brasiliensis*, *S. aureus* [Salinas-Carmona et al., 2009]. В ходе исследования было показано, что все эти инфекции влияют на развитие спонтанного артрита. Причем у животных, инфицированных *S. aureus*, развивался артрит с более высоким уровнем костной деструкции и хряща по сравнению с мышами, зараженными гельминтами и *N. brasiliensis*. Эти результаты коррелировали с увеличением числа Th1 доминирующих цитокинов. В другом исследовании показано, что хроническое воздействие суперантигена В *S. aureus* у HLA-DQ8 трансгенных мышей вызывает системное воспалительное заболевание, с признаками, аналогичными системной красной волчанке. Воспалительные инфильтраты в различных органах состояли преимущественно из CD4⁺ Т-клеток, несущих TCR VB8. Степень иммунопатологии была значительно меньше у HLA-DQ8. CD4⁰ и HLA-DQ8. CD28⁰ мышей, и отсутствие заболевания было отмечено у HLA-DQ8. STAT4⁰ и HLA-DQ8. IFN- γ ⁰ мышей. По полученным результатам авторы пришли к выводу, что это заболевание, вызванное влиянием суперантигена В *S. aureus*, является CD4⁺ Т-клеточно-зависимым, и высказано предположение о патогенной роли цитокинов Th1-типа IL-12 и IFN- γ [Chowdhary et al., 2012].

Предполагается, что поликлональную активацию В- и Т-лимфоцитов также могут вызывать самые различные вирусы. В ранних исследованиях было показано, что EBV может способствовать поликлональной В-клеточной активации у больных РА [Klatt et al., 2005],

клональной экспансии EBNA-1 специфических Т-клеток, которые распознают антигены миелина у больных РС [Lunemann et al., 2008]. Ряд исследований свидетельствуют о иммунопатогенной связи вирионов *HERV-W* с РС, поскольку белок его оболочки (ENV) может способствовать не только массовой неспецифической активации Т-лимфоцитов [Tai et al., 2008; Antony et al., 2011], но также вызывать спонтанную активацию врожденного иммунитета через Toll-like Receptor-4 (TLR4) и CD14 [Rolland et al., 2005, 2006].

Перечень вирусов, как возможных триггерных факторов в развитии аутоиммунных болезней, может быть продолжен. Несомненно, полученные результаты многочисленных исследований указывают на то, что вирусы могут участвовать в поддержании аутоиммунного процесса. Однако до настоящего времени нет прямых доказательств непосредственного участия отдельных вирусов в запуске аутоиммунизации.

Заключение

Главной функцией иммунной системы является обеспечение молекулярно-клеточного гомеостаза, необходимого для нормального функционирования организма. Нарушение иммунологического баланса приводит к срыву иммунологической толерантности и, как следствие, к развитию патологической аутоиммунной реакции. Следует отметить, что обзор современных взглядов на причины возникновения аутоиммунных процессов показал сложность данной проблемы. Показано влияние генетических факторов, выявлены аллельные сочетания HLA, которые могут быть ассоциированы с риском развития АИЗ либо обладать протективным действием. По мере развития молекулярной биологии механизмы взаимодействия вирусов и бактерий с иммунной системой будут уточняться. Большое влияние на развитие АИЗ оказывают Трег-клетки, неадекватное функционирование которых приводит к нарушению супрессии иммунных реакций. Есть необходимость в дальнейших исследованиях с использованием современных достижений науки и биотехнологии для поиска механизмов возникновения АИЗ, которые в последующем расширят понимание аутоиммунитета.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания № 0221-2014-0011.

Литература

Зайчик А. Ш., Полетаев А. Б., Чурилов Л. П. Распознавание «своего» и взаимодействие со «своим» как основная форма активности адаптивной иммунной системы // Вестн. С.-Петерб. ун-та. Сер. 11. Медицина. 2013. № 1. С. 6–27.

Рыжков П. А., Рыжкова Н. С., Коновалова Р. В. Генетика сахарного диабета 1 типа // Живые и биокосные системы. 2013. № 4. URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-4/article-14> (дата обращения: 27.07.2015).

Храмова Т. В., Бедулева Л. В., Толстолицкая Т. О. и др. Продукция аутоантител к CD4 у негуманизированных крыс в ответ на иммунизацию GP120 белком ВИЧ // Современная медицина: актуальные вопросы. 2014. № 35–36. С. 71–76.

Alonso N., Martinez-Arconada M. J., Granada M. L. et al. Regulatory T cells in type 1 diabetic patients with autoimmune chronic atrophic gastritis // *Endocrine*. 2009. Vol. 35, No 3. P. 420–428. doi: 10.1007/s12020-009-9166-2.

Alvarez-Quiroga C., Abud-Mendoza C., Donuz-Pardilla L. et al. CTLA-4-Ig therapy diminishes the frequency but enhances the function of Treg cells in patients with rheumatoid arthritis // *J. Clin. Immunol.* 2011. Vol. 31, No 4. P. 588–595. doi: 10.1007/s10875-011-9527-5.

Amedei A., Bergman M. P., Appelmelk B. J. et al. Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* antigens and h+, k+ – adenosine triphosphatase in human gastric autoimmunity // *J. Exp Med.* 2003. Vol. 198, No 8. P. 1147–1156.

Antiga E., Quaglini P., Bellandi S. et al. Regulatory T cells in the skin lesions and blood of patients with systemic sclerosis and morphea // *Br. J. Dermatol.* 2010. Vol. 162, No 5. P. 1056–1063. doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.09633.x.

Antony J. M., Deslauriers A. M., Bhat R. K. et al. Human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: innocent bystanders or disease determinants? // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. Vol. 1812, No 2. P. 162–176. doi: 10.1016/j.bbadis.2010.07.016.

Arkema E. V., Karlson E. W., Costenbader K. H. A prospective study of periodontal disease and risk of rheumatoid arthritis // *J. Rheumatol.* 2010. Vol. 37, No 9. P. 1800–1804. doi: 10.3899/jrheum.091398.

Bailey-Bucktrout S. L., Bluestone J. A. Regulatory T cells: stability revisited // *Trends Immunol.* 2011. Vol. 32, No 7. P. 301–306. doi: 10.1016/j.it.2011.04.002.

Barrett J. C., Clayton D. G., Concannon P. et al. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes // *Nat Genet.* 2009. Vol. 41, No 6. P. 703–707. doi: 10.1038/ng.381.

Bartold P. M., Marino V., Cantley M., Haynes D. R. Effect of *Porphyromonas gingivalis*-induced inflammation on the development of rheumatoid arthritis // *J. Clin. Periodontol.* 2010. Vol. 37, No 5. P. 405–411. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01552.x.

Beduleva L., Menshikov I. Role of idiotypic-anti-idiotypic interactions in the induction of collagen-induced arthritis in rats // *Immunobiology.* 2010. Vol. 215, No 12. P. 963–970. doi: 10.1016/j.imbio.2009.12.001.

Bettini M., Vignali D. A. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity // *Curr. Opin. Immunol.* 2009. Vol. 21, No 6. P. 612–618. doi: 10.1016/j.coi.2009.09.011.

Bouzid D., Amouri A., Fourati H. et al. Polymorphisms in the IL2RA and IL2RB genes in inflammatory bowel disease risk // *Genet Test Mol Biomarkers.* 2013. Vol. 17, No 11. P. 833–839. doi: 10.1089/gtmb.2013.0291.

Bovenschen H. J., van de Kerkhof P. C., van Erp P. E. et al. Foxp3+ regulatory T cells of psoriasis patients easily differentiate into IL-17A-producing cells and are found in lesional skin // *J. Invest. Dermatol.* 2011. Vol. 131, No 9. P. 1853–1860. doi: 10.1038/jid.2011.139.

Brok H. P., Boven L., van Meurs M. et al. The human CMV-UL86 peptide 981–1003 shares a crossreactive T-cell epitope with the encephalitogenic MOG peptide 34–56, but lacks the capacity to induce EAE in rhesus monkeys // *J. Neuroimmunol.* 2007. Vol. 182, No 1–2. P. 135–152.

Buckner J. H. Mechanisms of impaired regulation by CD4+CD25+ FoxP3+ regulatory T cells in human autoimmune diseases // *Nat. Rev. Immunol.* 2010. Vol. 10, No 12. P. 849–859. doi: 10.1038/nri2889.

Cantley M. D., Haynes D. R., Marino V., Bartold P. M. Pre-existing periodontitis exacerbates experimental arthritis in a mouse model // *J. Clin. Periodontol.* 2011. Vol. 38, No 6. P. 532–541. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01714.x.

Chang H. H., Tai T. S., Lu B. et al. PTPN 22, a dominant negative isoform of PTPN22 and potential biomarkers of rheumatoid arthritis // *PLoS One.* 2012. Vol. 7, No 3. P. e33067. doi: 10.1371/journal.pone.0033067.

Chen Z., Brant S. R., Li C. et al. CTLA4 –1661A/G and 3'UTR long repeat polymorphisms are associated with ulcerative colitis and influence CTLA4 mRNA and protein expression // *Genes. Immun.* 2010. Vol. 11, No 7. P. 573–583. doi: 10.1038/gene.2010.16.

Cheng W., Ma Y., Gong F. et al. Cross-reactivity of autoreactive T cells with MBP and viral antigens in patients with MS // *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012. Vol. 17. P. 1648–1658.

Chiu Y. C., Lin C. Y., Chen C. P. et al. Peptidoglycan enhances IL-6 production in human synovial fibroblasts via TLR2 receptor, focal adhesion kinase, Akt, and AP-1-dependent pathway // *J. Immunol.* 2009. Vol. 183, No 4. P. 2785–2792. doi: 10.4049/jimmunol.0802826.

Chowdhary V. R., Tilahun A. Y., Clark C. R. et al. Chronic Exposure to Staphylococcal Superantigen Elicits a Systemic Inflammatory Disease Mimicking Lupus // *J. Immunol.* 2012. Vol. 189, No 4. P. 2054–2062. doi: 10.4049/jimmunol.1201097.

Davidson T. S., DiPaolo R. J., Andersson J., Shevach E. M. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells // *J. Immunol.* 2007. Vol. 178, No 7. P. 4022–4026.

de Smit M., Westra J., Vissink A. et al. Periodontitis in established rheumatoid arthritis patients: a cross-sectional clinical, microbiological and serological study // *Arthritis Res. Ther.* 2012. Vol. 14, No 5. P. R222. doi: 10.1186/ar4061.

do Olival G. S., Faria T. S., Nali L. H. et al. Genomic analysis of ERWE2 locus in patients with multiple sclerosis: absence of genetic association but potential role

of human endogenous retrovirus type W elements in molecular mimicry with myelin antigen // *Front Microbiol.* 2013. 4:172. doi: 10.3389/fmicb.2013.00172.

Dominguez-Villar M., Baecher-Allan C. M., Hafler D. A. Identification of T helper type 1-like, Foxp3+ regulatory T cells in human autoimmune disease // *Nat. Med.* 2011. Vol. 17, No 6. P. 673–675. doi: 10.1038/nm.2389.

Draborg A. H., Jørgensen J. M., Müller H. et al. Epstein-Barr virus early antigen diffuse (EBV-EA/D)-directed immunoglobulin A antibodies in systemic lupus erythematosus patients // *Scand. J. Rheumatol.* 2012. Vol. 41, No 4. P. 280–289. doi: 10.3109/03009742.2012.665944.

Dreyfus D. H., Nagasawa M., Kelleher C. A., Gelfand E. W. Stable expression of Epstein-Barr virus BZLF-1-encoded ZEBRA protein activates p53-dependent transcription in human Jurkat T-lymphoblastoid cells // *Blood.* 2000. Vol. 96, No 2. P. 625–634.

Dreyfus D. H., Nagasawa M., Pratt J. C. et al. Inactivation of NF-kappaB by EBV BZLF-1-encoded ZEBRA protein in human T-cells // *J. Immunol.* 1999. Vol. 163, No 11. P. 6261–6268.

Ei Wafai R. J., Chmisse H. N., Makki R. F., Fakhoury H. Association of HLA class II alleles and CTLA-4 polymorphism with type 1 diabetes // *Saudi. J. Kidney Dis. Transpl.* 2011. Vol. 22, No 2. P. 273–281.

Erre G. L., Mameli G., Cossu D. et al. Increased Epstein-Barr Virus DNA load and antibodies against EBNA1 and EA in Sardinian patients with rheumatoid arthritis // *Viral Immunol.* 2015. P. 1–6. doi: 10.1089/vim.2015.0035.

Esen B. A., Yilmaz G., Uzun S. et al. Serologic response to Epstein-Barr virus antigens in patients with systemic lupus erythematosus: a controlled study // *Rheumatol. Int.* 2012. Vol. 32, No 1. P. 79–83. doi: 10.1007/s00296-010-1573-4.

Flores-Borja F., Jury E. C., Mauri C., Ehrenstein M. R. Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. Vol. 105, No 49. P.19396–19401. doi: 10.1073/pnas.0806855105.

Fraser J. D., Proft T. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins // *Immunol. Rev.* 2008. Vol. 225. P. 226–243. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00681.x.

Fritzching B., Haas J., König F. et al. Intracerebral human regulatory T cells: analysis of CD4+CD25+FOXP3+ T cells in brain lesions and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients // *PLoS ONE.* 2011. Vol. 6, No 3. e17988. doi:10.1371/journal.pone.0017988.

Frulloni L., Lunardi C., Simone R. Identification of a novel antibody associated with autoimmune pancreatitis // *N. Engl. J. Med.* 2009. Vol. 361, No 22. P. 2135–2142. doi: 10.1056/NEJMoa0903068.

Fujinami R. S., Oldstone M. B. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity // *Science.* 1985. Vol. 230. P. 1043–1045.

Furukawa H., Oka S., Shimada K. et al. Association of Human Leukocyte Antigen with Interstitial Lung Disease in Rheumatoid Arthritis: A Protective Role for Shared Epitope // *PLoS ONE.* 2012. Vol. 7, No 5. P. e33133. doi: 10.1371/journal.pone.0033133.

Garg G., Tyler J. R., Yang J. H. et al. Type 1 diabetes-associated IL2RA variation lowers IL-2 signaling and contributes to diminished CD4+CD25+ regulatory T cell function // *J. Immunol.* 2012. Vol. 188, No 9. P. 4644–4653. doi: 10.4049/jimmunol.1100272.

Goodman W. A., Levine A. D., Massari J. V. et al. IL-6 signaling in psoriasis prevents immune suppression by regulatory T cells // *J. Immunol.* 2009. Vol. 183, No 5. P. 3170–3176. doi: 10.4049/jimmunol.0803721.

Guarneri F., Guarneri C., Benvenega S. Helicobacter pylori and autoimmune pancreatitis: role of carbonic anhydrase via molecular mimicry? // *J. Cell. Mo. I Med.* 2005. Vol. 9, No 3. P. 741–744.

Habibagahi M., Habibagahi Z., Jaberipour M., Aghdashi A. Quantification of regulatory T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus // *Rheumatol. Int.* 2011. Vol. 31, No 9. P. 1219–1225. doi: 10.1007/s00296-010-1427-0.

Halenius A., Hengel H. Human cytomegalovirus and autoimmune disease // *Biomed. Res. Int.* 2014. P. 1–15. doi: 10.1155/2014/472978.

Han G. M., O'Neil-Andersen N. J., Zurier R. B., Lawrence D. A. CD4+CD25^{high} T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis // *Cell. Immunol.* 2008. Vol. 253, No 1–2. P. 92–101. doi: 10.1016/j.cellimm.2008.05.007.

Hasham A., Tomer Y. Genetic and epigenetic mechanisms in thyroid autoimmunity // *Immunol. Res.* 2012. Vol. 4, No 1–3. P. 204–213. doi: 10.1007/s12026-012-8302-x.

Härkönen T., Lankinen H., Davydova B. et al. Enterovirus infection can induce immune responses that cross-react with beta-cell autoantigen tyrosine phosphatase IA-2/IAR // *J. Med. Virol.* 2002. Vol. 66, No 3. P. 340–350.

Hiemstra H. S., Schloot N. C., van Veelen P. A. et al. Cytomegalovirus in autoimmunity: T cell crossreactivity to viral antigen and autoantigen glutamic acid decarboxylase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. Vol. 98, No 7. P. 3988–3991.

Hirano T. Interleukin 6 in autoimmune and inflammatory diseases: a personal memoir // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 2010. Vol. 86, No 7. P. 717–730.

Honeyman M. C., Stone N. L., Falk B. A. et al. Evidence for molecular mimicry between human T cell epitopes in rotavirus and pancreatic islet autoantigens // *J. Immunol.* 2010. Vol. 184, No 4. P. 2204–2210. doi: 10.4049/jimmunol.0900709.

Islander U., Andersson A., Lindberg E. et al. Superantigenic Staphylococcus aureus stimulates production of interleukin-17 from memory but not naive T cells // *Infect. Immun.* 2010. Vol. 78, No 1. P. 381–386. doi: 10.1128/IAI.00724–09.

Jacobsen J. T., Lunde E., Sundvold-Gjerstad V. et al. The cellular mechanism by which complementary Id+ and anti-Id antibodies communicate: T cells integrated into idiotypic regulation // *Immunol. Cell. Biol.* 2010. Vol. 88, No 5. P. 515–522. doi: 10.1038/icb.2009.118.

Jailwala P., Waukau J., Glisic S. et al. Apoptosis of CD4+ CD25^(high) T cells in type 1 diabetes may be partially mediated by IL-2 deprivation // *PLoS ONE.* 2009. Vol. 4, No 8. e6527. doi: 10.1371/journal.pone.0006527.

- James J. A., Harley J. B. Linear epitope mapping of an Sm B/B' polypeptide // *J. Immunol.* 1992. Vol. 148, No 7. P. 2074–2079.
- James E. A., Moustakas A. K., Bui J. et al. HLA-DR1001 presents «altered-self» peptides derived from joint associated proteins by accepting citrulline in three of its binding pockets // *Arthritis Rheum.* 2010. Vol. 62, No 10. P. 2909–2918. doi: 10.1002/art.27594.
- Jerne N. K. Idiotypic Networks and Other Preconceived Ideas // *Immunol. Rev.* 1984. No 79. P. 5–24.
- Johnson K., Wong R., Barriga K. J. et al. rs11203203 is associated with type 1 diabetes risk in population pre-screened for high-risk HLA-DR, DQ genotypes // *Pediatric Diabetes.* 2012. Vol. 13, No 8. P. 611–615. doi: 10.1111/j.1399-5448.2012.00888.x.
- Kawashighri S. Y., Kawakami A., Okada A. et al. CD4+CD25highCD127low/-Treg cell frequency from peripheral blood correlates with disease activity in patients with rheumatoid arthritis // *J. Rheumatol.* 2011. Vol. 38, No 12. P. 2517–2521. doi: http://dx.doi.org/10.3899/jrheum.110283.
- Kim J. R., Chae J. N., Kim S. H., Ha J. S. Subpopulations of regulatory T cells in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and Behcet's disease // *J. Korean. Med. Sci.* 2012. Vol. 27, No 9. P. 1009–1013. doi: 10.3346/jkms.2012.27.9.1009.
- Kinloch A. J., Alzabin S., Brintnell W. et al. Immunization with *Porphyromonas gingivalis* enolase induces autoimmunity to mammalian α -enolase and arthritis in DR4-IE-transgenic mice // *Arthritis Rheum.* 2011. Vol. 63, No 12. P. 3818–3823. doi: 10.1002/art.30639.
- Klatt T., Ouyang Q., Flad T. et al. Expansion of peripheral CD8+ CD28- T cells in response to Epstein-Barr virus in patients with rheumatoid arthritis // *J. Rheumatol.* 2005. Vol. 32, No 2. P. 239–251.
- Knevel R., de Rooy D. P., Zhernakova A. et al. Association of variants in IL2RA with progression of joint destruction in rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* 2013. Vol. 65, No 7. P. 1684–1693. doi: 10.1002/art.37938.
- Komatsu N., Mariotti-Ferrandiz M. E., Wang Y. et al. Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. Vol. 106, No 6. P. 1903–1908. doi: 10.1073/pnas.0811556106.
- Komatsu N., Okamoto K., Sawa S. et al. Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis // *Nat. Med.* 2014. Vol. 20, No 1. P. 62–68. doi: 10.1038/nm.3432.
- Krzyształowska-Wawrzyniak M., Ostanek M., Clark J. et al. The distribution of human endogenous retrovirus K-113 in health and autoimmune diseases in Poland // *Rheumatology (Oxford).* 2011. Vol. 50, No 7. P. 1310–1314. doi: 10.1093/rheumatology/ker022.
- Lang H. L., Jacobsen H., Ikemizu S. et al. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis // *Nat. Immunol.*, 2002. Vol. 3, No 10. P. 940–943.
- Larsson H. E., Jönsson I., Lernmark A. et al. Decline in titers of anti-idiotypic antibodies specific to autoantibodies to GAD65 (GAD65Ab) precedes development of GAD65Ab and type 1 diabetes // *PLOS ONE.* 2013. Vol. 8, No 6. P. e65173. doi: 10.1371/journal.pone.0065173.
- Lee Y. H., Bae S. C., Choi S. J. et al. The association between the PTPN22 C1858T polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis update // *Mol. Biol. Rep.* 2012. Vol. 39, No 4. P. 3453–3460. doi: 10.1007/s11033-011-1117-3.
- Lee Y. H., Kim J. H., Seo Y. H. et al. CTLA-4 polymorphisms and susceptibility to inflammatory bowel disease: a meta-analysis // *Hum. Immunol.* 2014. Vol. 75, No 5. P. 414–421. doi: 10.1016/j.humimm.2014.02.020.
- Lee Y. H., Choi S. J., Ji J. D., Song G. G. The association between the PTPN22 C1858T polymorphism and systemic sclerosis: a meta-analysis // *Mol. Biol. Rep.* 2012. Vol. 39, No 3. P. 3103–3108. doi: 10.1007/s11033-011-1074-x.
- Li N., Ma T., Han J. et al. Increased apoptosis induction in CD4+CD25+ Foxp3+ T cells contributes to enhanced disease activity in patients with rheumatoid arthritis through IL-10 regulation // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2014. Vol. 18, No 1. P. 78–85.
- Li S., Yu Y., Yue Y. et al. Microbial Infection and Rheumatoid Arthritis // *J. Clin. Cell. Immunol.* 2013. Vol. 4, No 6. P. 174.
- Liang B., Gardner D., Griswold D. E. et al. Anti-interleukin-6 monoclonal antibody inhibits autoimmune responses in a murine model of systemic lupus erythematosus // *Immunology.* 2006. Vol. 119, No 3. P. 296–305.
- Liberal R., Grant C. R., Mieli-Vergani G., Vergani D. Autoimmune hepatitis: A comprehensive review // *J. Autoimmun.* 2013. Vol. 4. P. 126–139. doi: 10.1016/j.jaut.2012.11.002.
- Long S. A., Cerosaletti K., Bollyky P. L. et al. Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in CD4+CD25+ regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects // *Diabetes.* 2010. Vol. 59, No 2. P. 407–415. doi: 10.2337/db09-0694.
- Lucas R. M., Ponsonby A. L., Dear K. et al. Current and past Epstein-Barr virus infection in risk of initial CNS demyelination // *Neurology.* 2011. Vol. 77, No 4. P. 371–379. doi: 10.1212/WNL.0b013e318227062a.
- Luczynski W., Stasiak-Barmuta A., Urban R. et al. Lower percentages of T regulatory cells in children with type 1 diabetes – preliminary report // *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab.* 2009. Vol. 15, No 1. P. 34–38.
- Lundberg K., Kinloch A., Fisher B. A. et al. Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase // *Arthritis Rheum.* 2008. Vol. 58, No 10. P. 3009–3019. doi: 10.1002/art.23936.
- Lünemann J. D., Jelčić I., Roberts S. et al. EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2 // *J. Exp. Med.* 2008. Vol. 205, No 8. P. 1763–1773. doi: 10.1084/jem.20072397.
- Maier L. M., Lowe C. E., Cooper J. et al. IL2RA genetic heterogeneity in multiple sclerosis and type 1 diabetes susceptibility and soluble interleukin-2 receptor production // *PLoS Genet.* 2009. Vol. 5, No 1. P. e1000322. doi: 10.1371/journal.pgen.1000322.
- Malek T. R., Castro I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immu-

- nity // *Immunity*. 2010. Vol. 33, No 2. P. 153–165. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.004.
- Martinez-Forero I., Garcia-Munoz R., Martinez-Pasamar S. et al. IL-10 suppressor activity and ex vivo Tr1-cell function are impaired in multiple sclerosis // *Eur. J. Immunol.* 2008. Vol. 38, No 2. P. 576–586. doi: 10.1002/eji.200737271.
- Martinez-Martinez R. E., Abud-Mendoza C., Patiño-Marin N. et al. Detection of periodontal bacterial DNA in serum and synovial fluid in refractory rheumatoid arthritis patients // *J. Clin. Periodontol.* 2009. Vol. 36, No 12. P. 1004–1010. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01496.x.
- Marwaha A. K., Crome S. Q., Panagiotopoulos C. et al. Cutting edge: increased IL-17-secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes // *J. Immunol.* 2010. Vol. 185, No 7. P. 3814–3818. doi: 10.4049/jimmunol.1001860.
- McClain M. T., Heinlen L. D., Dennis G. J. et al. Early events in lupus humoral autoimmunity suggest initiation through molecular mimicry // *Nat. Med.* 2005. Vol. 11, No 1. P. 85–89.
- McClymont S. A., Putnam A. L., Lee M. R. et al. Plasticity of human regulatory T cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes // *J. Immunol.* 2011. Vol. 186, No 7. P. 3918–3926. doi: 10.4049/jimmunol.1003099.
- Menconi F., Osman R., Monti M. C. et al. Shared molecular amino acid signature in the HLA-DR peptide binding pocket predisposes to both autoimmune diabetes and thyroiditis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. Vol. 107, No 39. P. 16899–16903. doi: 10.1073/pnas.1009511107.
- Mikulcova Z., Praksova P., Stourac P. et al. Imbalance in T-cell and cytokine profiles in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis // *J. Neurol. Sci.* 2011. Vol. 300, No 1–2. P. 135–141. doi: 10.1016/j.jns.2010.08.053.
- Mikulc T. R., Thiele G. M., Deane K. D. et al. Porphyromonas gingivalis and disease-related autoantibodies in individuals at increased risk of rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* 2012. Vol. 64, No 11. P. 3522–3530. doi: 10.1002/art.34595.
- Miyara M., Amoura Z., Parizot C. et al. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus // *J. Immunol.* 2005. Vol. 175, No 12. P. 8392–8400.
- Mohammad A. A., Rahbar A., Lui W. O. et al. Detection of circulating hcmv-miR-UL112–3p in patients with glioblastoma, rheumatoid arthritis, diabetes mellitus and healthy controls // *PLoS One.* 2014. Vol. 9, No 12. P. e113740. doi: 10.1371/journal.pone.0113740.
- Mohammad A. A., Rahbar A., Lui W. O. et al. Detection of circulating hcmv-miR-UL112–3p in patients with glioblastoma, rheumatoid arthritis, diabetes mellitus and healthy controls // *PLoS One.* 2014. Vol. 9, No 12. e113740. doi: 10.1371/journal.pone.0113740.
- Moradi B., Schnatzer P., Hagmann S. et al. CD4+CD25+/highCD127low/- regulatory T cell are enriched in rheumatoid arthritis and osteoarthritis joints – analysis of frequency and phenotype in synovial membrane, synovial fluid and peripheral blood // *Arthritis Res. Ther.* 2014. Vol. 16, No 2. R97. doi: 10.1186/ar4545.
- Moser K. L., Kelly J. A., Lessard C. J., Harley J. B. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus // *Genes. Immun.* 2009. Vol. 10, No 5. P. 373–379. doi: 10.1038/gene.2009.39.
- Nie H., Zheng Y., Li R. et al. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF-alpha in rheumatoid arthritis // *Nat. Med.* 2013. Vol. 19, No 3. P. 322–328. doi: 10.1038/nm.3085.
- Niu Q., Cai B., Huang Z. C. et al. Disturbed Th17/Treg balance in patients with rheumatoid arthritis // *Rheumatol Int.* 2012. Vol. 32, No 9. P. 2731–2736. doi: 10.1007/s00296-011-1984-x.
- Ohl K., Tenbrock K. Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus // *J. Biomed. Biotechnol.* 2011. doi: 10.1155/2011/432595.
- Ollier W. Rheumatoid arthritis and Epstein-Barr virus: a case of living with the enemy? // *Ann Rheum Dis.* 2000. Vol. 59, No 7. P. 497–499.
- O’Shea J. J., Paul W. E. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells // *Science.* 2010. Vol. 327, No 5969. P. 1098–1102. doi: 10.1126/science.1178334.
- Ou D., Mitchell L. A., Metzger D. L. et al. Cross-reactive rubella virus and glutamic acid decarboxylase (65 and 67) protein determinants recognised by T cells of patients with type I diabetes mellitus // *Diabetologia.* 2000. Vol. 43, No 6. P. 750–762.
- Ouyang P., Rakus K., van Beurden S. J. et al. IL-10 encoded by viruses: a remarkable example of independent acquisition of a cellular gene by viruses and its subsequent evolution in the viral genome // *J. Gen. Virol.* 2014. Vol. 95. Pt. 2. P. 245–262. doi: 10.1099/vir.0.058966-0.
- Pakpoor J., Disanto G., Gerber J. E. et al. The risk of developing multiple sclerosis in individuals seronegative for Epstein-Barr virus: a meta-analysis // *Mult. Scler.* 2013. Vol. 19, No 2. P. 162–166. doi: 10.1177/1352458512449682.
- Perron H., Germi R., Bernard C. et al. Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease // *Mult. Scler.* 2012. Vol. 18, No 12. P. 1721–1736. doi: 10.1177/1352458512441381.
- Pieper J., Herrath J., Raghavan S. et al. CTLA4-Ig (abatacept) therapy modulates T cell effector functions in autoantibody-positive rheumatoid arthritis patients // *BMC Immunol.* 2013. 14:34. doi: 10.1186/1471-2172-14-34.
- Pierer M., Rothe K., Quandt D. et al. Association of anticytomegalovirus seropositivity with more severe joint destruction and more frequent joint surgery in rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* 2012. Vol. 64, No 6. P. 1740–1749. doi: 10.1002/art.34346.
- Pischon N., Pischon T., Kröger J. et al. Association among rheumatoid arthritis, oral hygiene, and periodontitis // *J. Periodontol.* 2008. Vol. 79, No 6. P. 979–986. doi: 10.1902/jop.2008.070501.
- Prado C., de Paz B., López P. et al. Relationship between FOXP3 positive populations and cytokine production in systemic lupus erythematosus // *Cytokine.* 2013. Vol. 61, No 1. 90–96. doi: 10.1016/j.cyt.2012.08.033.
- Radstake T. R., van Bon L., Broen J. et al. Increased frequency and compromised function of T regulatory

- cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGFbeta expression // *PLoS One*. 2009. Vol. 4, No 6. e5981. doi: 10.1371/journal.pone.0005981.
- Reynier F., Verjat T., Turrel F. et al. Increase in human endogenous retrovirus HERV-K (HML-2) viral load in active rheumatoid arthritis // *Scand. J. Immunol*. 2009. Vol. 70, No 3. P. 295–299. doi: 10.1111/j.1365-3083.2009.02271.x.
- Röhner E., Detert J., Kolar P. et al. Induced apoptosis of chondrocytes by *Porphyromonas gingivalis* as a possible pathway for cartilage loss in rheumatoid arthritis // *Calcif Tissue Int*. 2010. Vol. 87, No 4. P. 333–340. doi: 10.1007/s00223-010-9389-5.
- Rolland A., Jouvin-Marche E., Saresella M. et al. Correlation between disease severity and in vitro cytokine production mediated by MSRv (multiple sclerosis associated retroviral element) envelope protein in patients with multiple sclerosis // *J. Neuroimmunol*. 2005. Vol. 160, No 1–2. P. 195–203.
- Rolland A., Jouvin-Marche E., Viret C. et al. The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses // *J. Immunol*. 2006. Vol. 176, No 12. P. 7636–7644.
- Routsias J. G., Kyriakidis N. C., Friedman D. M. et al. Association of the idiotype: antiidiotype antibody ratio with the efficacy of intravenous immunoglobulin treatment for the prevention of recurrent autoimmune-associated congenital heart block // *Arthritis Rheum*. 2011. Vol. 63, No 9. P. 2783–2789. doi: 10.1002/art.30464.
- Russell S. E., Moore A. C., Fallon P. G., Walsh P. T. Soluble IL-2R α (sCD25) exacerbates autoimmunity and enhances the development of Th17 responses in mice // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, No 10. e47748. doi: 10.1371/journal.pone.0047748.
- Ryba-Stanislawowska M., Skrzypkowska M., Mysliwiec M., Mysliwska J. Loss of the balance between CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells and CD4(+) IL17A(+) Th17 cells in patients with type 1 diabetes // *Hum. Immunol*. 2013. Vol. 74, No 6. P. 701–707. doi: 10.1016/j.humimm.2013.01.024.
- Sabbatini A., Bombardieri S., Migliorini P. Autoantibodies from patients with systemic lupus erythematosus bind a shared sequence of SmD and Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA 1 // *Eur. J. Immunol*. 1993. Vol. 23, No 5. P. 1146–1152.
- Sakaguchi S., Miyara M., Costantino C. M., Haffner D. A. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system // *Nat. Rev. Immunol*. 2010. Vol. 10, No 7. P. 490–500. doi: 10.1038/nri2785.
- Salinas-Carmona M. C., de la Cruz-Galicia G., Pérez-Rivera I. et al. Spontaneous arthritis in MRL/lpr mice is aggravated by *Staphylococcus aureus* and ameliorated by *Nippostrongylus brasiliensis* infections // *Autoimmunity*. 2009. Vol. 42, No 1. P. 25–32. doi: 10.1080/08916930802228290.
- Saresella M., Marventano I., Longhi R. et al. CD4+CD25+FoxP3+PD1-regulatory T-cells in acute and stable relapsing remitting multiple sclerosis and their modulation by therapy. *FASEB J*. 2008. Vol. 22, No 10. P. 3500–3508. doi: 10.1096/fj.08-110650.
- Schneider A., Rieck M., Sanda S. et al. The effector T cells of diabetic subjects are resistant to regulation via CD4+FOXP3+ regulatory T cells // *J. Immunol*. 2008. Vol. 181, No 10. P. 7350–7355.
- Schulte B. M., Bakkers J., Lanke K. H. et al. Detection of enterovirus RNA in peripheral blood mononuclear cells of type 1 diabetic patients beyond the stage of acute infection // *Viral Immunol*. 2010. Vol. 23, No 1. P. 99–104. doi: 10.1089/vim.2009.0072.
- Shapira Y., Agmon-Levin N., Shoenfeld Y. Geoepidemiology of autoimmune rheumatic diseases // *Nat. Rev. Rheumatol*. 2010. Vol. 6, No 8. P. 468–476. doi: 10.1038/nrrheum.2010.86.
- Shimane K., Kochi Y., Suzuki A. et al. An association analysis of HLA-DRB1 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in a Japanese population: effects of *09:01 allele on disease phenotypes // *Rheumatology*. 2013. Vol. 52, No 7. P. 1172–1182. doi:10.1093/rheumatology/kes427.
- Snijders A., Elferink D. G., Geluk A. et al. An HLA-DRB1-derived peptide associated with protection against rheumatoid arthritis is naturally processed by human APCs // *J. Immunol*. 2001. Vol. 166, No 8. P. 4987–4993.
- Sojka D. K., Huang Y. H., Fowell D. J. Mechanisms of regulatory T-cell suppression – a diverse arsenal for a moving target // *Immunology*. 2008. Vol. 124, No 1. P. 13–22. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02813.x.
- Song G. G., Bae S. C., Kim J. H., Lee Y. H. The PTPN22 C1858T polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis // *Rheumatol. Int*. 2013. Vol. 33, No 8. P. 1991–1999. doi: 10.1007/s00296-013-2679-2.
- Song G. G., Kim J. H., Lee Y. H. The CTLA-4 +49 A/G, CT60 A/G and PTPN22 1858 C/T polymorphisms and susceptibility to vitiligo: a meta-analysis // *Mol. Biol. Rep*. 2013. Vol. 40, No 4. P. 2985–2993. doi: 10.1007/s11033-012-2370-9.
- Stahl E. A., Raychaudhuri S., Remmers E. F. et al. Consortium et al Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci // *Nat. Genet*. 2010. Vol. 42, No 6. P. 508–514. doi: 10.1038/ng.582.
- Suen J. L., Li H. T., Jong Y. J. et al. Altered homeostasis of CD4+FoxP3+ regulatory T-cell subpopulations in systemic lupus erythematosus // *Immunology*. 2009. Vol. 127, No 2. P. 196–205. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02937.x.
- Sur G., Sporis D., Kudor-Szabadi L., Samasca G. Super-antigens and human pathology: always an interesting topic // *J. Bioequiv. Availab*. 2013. Vol. 5, No 3. P. 125–128. doi: 10.4172/jbb.1000146.
- Tai A. K., O'Reilly E. J., Alroy K. A. et al. Human endogenous retrovirus – K18 Env as a risk factor in multiple sclerosis // *Mult. Scler*. 2008. Vol. 14, No 9. P. 1175–1180. doi: 10.1177/1352458508094641.
- Tejada-Simon M. V., Zang Y. C., Hong J. et al. Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis // *Ann Neurol*. 2003. Vol. 53, No 2. P. 189–197.
- Uner A., Gavalchin J. Idiotypes // *Encyclopedia of life sciences*. 2006. P. 1–5. doi: 10.1002/9780470015902.a0000912.
- Venken K., Hellings N., Thewissen M. et al. Compromised CD4+CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells

and reduced FOXP3 expression at the single cell level // *Immunology*. 2008. Vol. 123, No 1. P. 79–89.

Wang L. M., Zhang D. M., Xu Y. M., Sun S. L. Interleukin 2 Receptor α Gene Polymorphism and Risk of Multiple Sclerosis: a meta-analysis // *J. Int. Med. Res.* 2011. Vol. 39, No 5. P. 1625–1635.

Wang T., Sun X., Zhao J. et al. Regulatory T cells in rheumatoid arthritis showed increased plasticity toward Th17 but retained suppressive function in peripheral blood // *Ann. Rheum. Dis.* 2015. Vol. 74, No 6. P. 1293–1301. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204228.

Wehrens E. J., Mijnheer G., Duurland C. L. et al. Functional human regulatory T cells fail to control autoimmune inflammation due to PKB/c-akt hyperactivation in effector cells // *Blood*. 2011. Vol. 118, No 13. P. 3538–3548. doi: 10.1182/blood-2010-12-328187.

Wing K., Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity // *Nat. Immunol.* 2010. Vol. 11, No 1. P. 7–13.

Yomogida K., Chou Y. K., Chu C. Q. Superantigens induce IL-17 production from polarized Th1 clones // *Cytokine*. 2013. Vol. 63, No 1. P. 6–9. doi: 10.1016/j.cyt.2013.04.015.

Zanelli E., Gonzalez-Gay M. A., David C. S. Could HLA-DRB1 be the protective locus in rheumatoid arthritis // *Immunol. Today*. 1995. Vol. 16, No 6. P. 274–278.

Zanone M. M., Favaro E., Quadri R. et al. Association of cytomegalovirus infections with recurrence of humoral and cellular autoimmunity to islet autoantigens and of type 1 diabetes in a pancreas transplanted patient // *Transpl Int.* 2010. Vol. 23, No 3. P. 333–337. doi: 10.1111/j.1432-2277.2009.00994.x.

Zhou L., Chong M. M., Littman D. R. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation // *Immunity*. 2009. Vol. 30, No 5. P. 646–655. doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.001.

Поступила в редакцию 18.08.2015

References

Hramova T. V., Beduleva L. V., Tolstoluckaja T. O. et al. Produkcija autoantitel k CD4 u negumanizirovannyh krysh v otvet na immunizaciju GP120 belkom VICH [Production of antibodies in non-humanized rats against CD4 in response to immunization with HIV GP120 protein]. *Sovremennaja medicina: aktual'nye voprosy* [Modern medicine: current issues]. 2014. No 35–36. P. 71–76.

Ryzhkov P. A., Ryzhkova N. S., Konovalova R. V. Genetika sahnarnogo diabeta 1 tipa [Genetics of type 1 diabetes]. *Zhivye i biokosnye sistemy* [Active and bioconservative systems]. 2013. No 4. URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-4/article-14> (accessed: 27.07.2015).

Zajchik A. Sh., Poletaev A. B., Churilov L. P. Raspoznavanie «svoego» i vzaimodejstvie so «svoim» kak osnovnaja forma aktivnosti adaptivnoj immunnoj sistemy [«Self» recognition and interaction with «self» as a main activity of adaptive immune system]. *Vestn. St.-Peterb. un-ta. Ser. 11. Medicina* [Vestnik of St. Petersburg Univ. Ser. 11. Medicine]. 2013. No 1. P. 6–27.

Alonso N., Martinez-Arconada M. J., Granada M. L. et al. Regulatory T cells in type 1 diabetic patients with autoimmune chronic atrophic gastritis. *Endocrine*. 2009. Vol. 35, No 3. P. 420–428. doi: 10.1007/s12020-009-9166-2.

Alvarez-Quiroga C., Abud-Mendoza C., Donuz-Padilla L. et al. CTLA-4-Ig therapy diminishes the frequency but enhances the function of Treg cells in patients with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Immunol.* 2011. Vol. 31, No 4. P. 588–595. doi: 10.1007/s10875-011-9527-5.

Amedei A., Bergman M. P., Appelmelk B. J. et al. Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* antigens and h+, k+ – adenosine triphosphatase in human gastric autoimmunity. *J. Exp. Med.* 2003. Vol. 198, No 8. P. 1147–1156.

Antiga E., Quaglino P., Bellandi S. et al. Regulatory T cells in the skin lesions and blood of patients with systemic sclerosis and morphea. *Br. J. Dermatol.* 2010. Vol. 162, No 5. P. 1056–1063. doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.09633.x.

Antony J. M., Deslauriers A. M., Bhat R. K., Elles-tad K. K., Power C. Human endogenous retroviruses and

multiple sclerosis: innocent bystanders or disease determinants? *Biochim. Biophys. Acta*. 2011. Vol. 1812, No 2. P. 162–176. doi: 10.1016/j.bbdis.2010.07.016.

Arkema E. V., Karlson E. W., Costenbader K. H. A prospective study of periodontal disease and risk of rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2010. Vol. 37, No 9. P. 1800–1804. doi: 10.3899/jrheum.091398.

Bailey-Bucktrout S. L., Bluestone J. A. Regulatory T cells: stability revisited. *Trends Immunol.* 2011. Vol. 32, No 7. P. 301–306. doi: 10.1016/j.it.2011.04.002.

Barrett J. C., Clayton D. G., Concannon P. et al. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat. Genet.* 2009. Vol. 41, No 6. P. 703–707. doi: 10.1038/ng.381.

Bartold P. M., Marino V., Cantley M., Haynes D. R. Effect of *Porphyromonas gingivalis*-induced inflammation on the development of rheumatoid arthritis. *J. Clin. Periodontol.* 2010. Vol. 37, No 5. P. 405–411. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01552.x.

Beduleva L., Menshikov I. Role of idiotype–anti-idiotype interactions in the induction of collagen-induced arthritis in rats. *Immunobiology*. 2010. Vol. 215, No 12. P. 963–970. doi: 10.1016/j.imbio.2009.12.001.

Bettini M., Vignali D. A. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2009. Vol. 21, No 6. P. 612–618. doi: 10.1016/j.coi.2009.09.011.

Bouzid D., Amouri A., Fourati H. et al. Polymorphisms in the IL2RA and IL2RB genes in inflammatory bowel disease risk. *Genet. Test. Mol. Biomarkers*. 2013. Vol. 17, No 11. P. 833–839. doi: 10.1089/gtmb.2013.0291.

Bovenschen H. J., van de Kerkhof P. C., van Erp P. E. et al. Foxp3+ regulatory T cells of psoriasis patients easily differentiate into IL-17A-producing cells and are found in lesional skin. *J. Invest. Dermatol.* 2011. Vol. 131, No 9. P. 1853–1860. doi: 10.1038/jid.2011.139.

Brok H. P., Boven L., van Meurs M. et al. The human CMV-UL86 peptide 981–1003 shares a crossreactive T-cell epitope with the encephalitogenic MOG peptide

34–56, but lacks the capacity to induce EAE in rhesus monkeys. *J. Neuroimmunol.* 2007. Vol. 182, No 1–2. P. 135–152.

Buckner J. H. Mechanisms of impaired regulation by CD4+CD25+ FoxP3+ regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 2010. Vol. 10, No 12. P. 849–859. doi: 10.1038/nri2889.

Cantley M. D., Haynes D. R., Marino V., Bartold P. M. Pre-existing periodontitis exacerbates experimental arthritis in a mouse model. *J. Clin. Periodontol.* 2011. Vol. 38, No 6. P. 532–541. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01714.x.

Chang H. H., Tai T. S., Lu B. et al. PTPN22, a dominant negative isoform of PTPN22 and potential biomarkers of rheumatoid arthritis. *PLoS One.* 2012. Vol. 7, No 3. P. e33067. doi: 10.1371/journal.pone.0033067.

Chen Z., Brant S. R., Li C. et al. CTLA4 -1661A/G and 3'UTR long repeat polymorphisms are associated with ulcerative colitis and influence CTLA4 mRNA and protein expression. *Genes Immun.* 2010. Vol. 11, No 7. P. 573–583. doi: 10.1038/gene.2010.16.

Cheng W., Ma Y., Gong F. et al. Cross-reactivity of autoreactive T cells with MBP and viral antigens in patients with MS. *Front. Biosci. (Landmark Ed).* 2012. Vol. 17. P. 1648–1658.

Chiu Y. C., Lin C. Y., Chen C. P. et al. Peptidoglycan enhances IL-6 production in human synovial fibroblasts via TLR2 receptor, focal adhesion kinase, Akt, and AP-1-dependent pathway. *J. Immunol.* 2009. Vol. 183, No 4. P. 2785–2792. doi: 10.4049/jimmunol.0802826.

Chowdhary V. R., Tilahun A. Y., Clark C. R. et al. Chronic Exposure to Staphylococcal Superantigen Elicits a Systemic Inflammatory Disease Mimicking Lupus. *J. Immunol.* 2012. Vol. 189, No 4. P. 2054–2062. doi: 10.4049/jimmunol.1201097.

Davidson T. S., DiPaolo R. J., Andersson J., Shevach E. M. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol.* 2007. Vol. 178, No 7. P. 4022–4026.

de Smit M., Westra J., Vissink A. et al. Periodontitis in established rheumatoid arthritis patients: a cross-sectional clinical, microbiological and serological study. *Arthritis. Res. Ther.* 2012. Vol. 14, No 5. R222. doi: 10.1186/ar4061.

do Olival G. S., Faria T. S., Nali L. H. et al. Genomic analysis of ERWE2 locus in patients with multiple sclerosis: absence of genetic association but potential role of human endogenous retrovirus type W elements in molecular mimicry with myelin antigen. *Front. Microbiol.* 2013. 4:172. doi: 10.3389/fmicb.2013.00172.

Dominguez-Villar M., Baecher-Allan C. M., Hafler D. A. Identification of T helper type 1-like, Foxp3+ regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nat. Med.* 2011. Vol. 17, No 6. P. 673–675. doi: 10.1038/nm.2389.

Draborg A. H., Jørgensen J. M., Müller H. et al. Epstein-Barr virus early antigen diffuse (EBV-EA/D)-directed immunoglobulin A antibodies in systemic lupus erythematosus patients. *Scand. J. Rheumatol.* 2012. Vol. 41, No 4. P. 280–289. doi: 10.3109/03009742.2012.665944.

Dreyfus D. H., Nagasawa M., Kelleher C. A., Gelfand E. W. Stable expression of Epstein-Barr virus BZLF-1-encoded ZEBRA protein activates p53-dependent

transcription in human Jurkat T-lymphoblastoid cells. *Blood.* 2000. Vol. 96, No 2. P. 625–634.

Dreyfus D. H., Nagasawa M., Pratt J. C. et al. Inactivation of NF-kappaB by EBV BZLF-1-encoded ZEBRA protein in human T-cells. *J. Immunol.* 1999. Vol. 163, No 11. P. 6261–6268.

Ei Wafai R. J., Chmaisse H. N., Makki R. F., Fakhoury H. Association of HLA class II alleles and CTLA-4 polymorphism with type 1 diabetes. *Saudi. J. Kidney Dis. Transpl.* 2011. Vol. 22, No 2. P. 273–281.

Erre G. L., Mameli G., Cossu D. et al. Increased Epstein-Barr Virus DNA load and antibodies against EBNA1 and EA in Sardinian patients with rheumatoid arthritis. *Viral. Immunol.* 2015. P. 1–6. doi: 10.1089/vim.2015.0035.

Esen B. A., Yilmaz G., Uzun S. et al. Serologic response to Epstein-Barr virus antigens in patients with systemic lupus erythematosus: a controlled study. *Rheumatol. Int.* 2012. Vol. 32, No 1. P. 79–83. doi: 10.1007/s00296-010-1573-4.

Flores-Borja F., Jury E. C., Mauri C., Ehrenstein M. R. Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. Vol. 105, No 49. P. 19396–19401. doi: 10.1073/pnas.0806855105.

Fraser J. D., Proft T. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunol. Rev.* 2008. Vol. 225. P. 226–243. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00681.x.

Fritzching B., Haas J., König F. et al. Intracerebral human regulatory T cells: analysis of CD4+CD25+FOXP3+ T cells in brain lesions and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *PLoS ONE.* 2011. Vol. 6, No 3. e17988. doi:10.1371/journal.pone.0017988.

Frulloni L., Lunardi C., Simone R. Identification of a novel antibody associated with autoimmune pancreatitis. *N. Engl. J. Med.* 2009. Vol. 361, No 22. P. 2135–2142. doi: 10.1056/NEJMoa0903068.

Fujinami R. S., Oldstone M. B. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science.* 1985. Vol. 230. P. 1043–1045.

Furukawa H., Oka S., Shimada K. et al. Association of Human Leukocyte Antigen with Interstitial Lung Disease in Rheumatoid Arthritis: A Protective Role for Shared Epitope. *PLoS ONE.* 2012. Vol. 7, No 5. P. e33133. doi: 10.1371/journal.pone.0033133.

Garg G., Tyler J. R., Yang J. H. et al. Type 1 diabetes-associated IL2RA variation lowers IL-2 signaling and contributes to diminished CD4+CD25+ regulatory T cell function. *J. Immunol.* 2012. Vol. 188, No 9. P. 4644–4653. doi: 10.4049/jimmunol.1100272.

Goodman W. A., Levine A. D., Massari J. V. et al. IL-6 signaling in psoriasis prevents immune suppression by regulatory T cells. *J. Immunol.* 2009. Vol. 183, No 5. P. 3170–3176. doi: 10.4049/jimmunol.0803721.

Guarneri F., Guarneri C., Benvenga S. Helicobacter pylori and autoimmune pancreatitis: role of carbonic anhydrase via molecular mimicry? *J. Cell. Mol. Med.* 2005. Vol. 9, No 3. P. 741–744.

Habibagahi M., Habibagahi Z., Jaberipour M., Aghdashi A. Quantification of regulatory T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus.

Rheumatol. Int. 2011. Vol. 31, No 9. P. 1219–1225. doi: 10.1007/s00296-010-1427-0.

Halenius A., Hengel H. Human cytomegalovirus and autoimmune disease. *Biomed. Res. Int.* 2014. P. 1–15. doi: 10.1155/2014/472978.

Han G. M., O'Neil-Andersen N. J., Zurier R. B., Lawrence D. A. CD4⁺CD25^{high} T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Cell. Immunol.* 2008. Vol. 253, No 1–2. P. 92–101. doi: 10.1016/j.cellimm.2008.05.007.

Hasham A., Tomer Y. Genetic and epigenetic mechanisms in thyroid autoimmunity. *Immunol. Res.* 2012. Vol. 4, No 1–3. P. 204–213. doi: 10.1007/s12026-012-8302-x.

Hiemstra H. S., Schloot N. C., van Veelen P. A. et al. Cytomegalovirus in autoimmunity: T cell crossreactivity to viral antigen and autoantigen glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. Vol. 98, No 7. P. 3988–3991.

Hirano T. Interleukin 6 in autoimmune and inflammatory diseases: a personal memoir. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 2010. Vol. 86, No 7. P. 717–730.

Honeyman M. C., Stone N. L., Falk B. A. et al. Evidence for molecular mimicry between human T cell epitopes in rotavirus and pancreatic islet autoantigens. *J. Immunol.* 2010. Vol. 184, No 4. P. 2204–2210. doi: 10.4049/jimmunol.0900709.

Islander U., Andersson A., Lindberg E. et al. Superantigenic *Staphylococcus aureus* stimulates production of interleukin-17 from memory but not naive T cells. *Infect. Immun.* 2010. Vol. 78, No 1. P. 381–386. doi: 10.1128/IAI.00724-09.

Jacobsen J. T., Lunde E., Sundvold-Gjerstad V. et al. The cellular mechanism by which complementary Id⁺ and anti-Id antibodies communicate: T cells integrated into idiotypic regulation. *Immunol. Cell. Biol.* 2010. Vol. 88, No 5. P. 515–522. doi: 10.1038/icb.2009.118.

Jailwala P., Waukau J., Glisic S. et al. Apoptosis of CD4⁺ CD25^(high) T cells in type 1 diabetes may be partially mediated by IL-2 deprivation. *PLoS ONE.* 2009. Vol. 4, No 8. e6527. doi: 10.1371/journal.pone.0006527.

James J. A., Harley J. B. Linear epitope mapping of an Sm B/B' polypeptide. *J. Immunol.* 1992. Vol. 148, No 7. P. 2074–2079.

James E. A., Moustakas A. K., Bui J. et al. HLA-DR1001 presents «altered-self» peptides derived from joint associated proteins by accepting citrulline in three of its binding pockets. *Arthritis. Rheum.* 2010. Vol. 62, No 10. P. 2909–2918. doi: 10.1002/art.27594.

Jerne N. K. Idiotypic Networks and Other Preconceived Ideas. *Immunol. Rev.* 1984. No 79. P. 5–24.

Johnson K., Wong R., Barriga K. J. et al. rs11203203 is associated with type 1 diabetes risk in population pre-screened for high-risk HLA-DR, DQ genotypes. *Pediatric. Diabetes.* 2012. Vol. 13, No 8. P. 611–615. doi: 10.1111/j.1399-5448.2012.00888.x.

Kawashighri S. Y., Kawakami A., Okada A. et al. CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}/-Treg cell frequency from peripheral blood correlates with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2011. Vol. 38, No 12. P. 2517–2521. doi: <http://dx.doi.org/10.3899/jrheum.110283>.

Kim J. R., Chae J. N., Kim S. H., Ha J. S. Subpopulations of regulatory T cells in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and Behcet's disease. *J. Korean. Med. Sci.* 2012. Vol. 27, No 9. P. 1009–1013. doi: 10.3346/jkms.2012.27.9.1009.

Kinloch A. J., Alzabin S., Brintnell W. et al. Immunization with *Porphyromonas gingivalis* enolase induces autoimmunity to mammalian α -enolase and arthritis in DR4-IE-transgenic mice. *Arthritis. Rheum.* 2011. Vol. 63, No 12. P. 3818–3823. doi: 10.1002/art.30639.

Klatt T., Ouyang Q., Flad T. et al. Expansion of peripheral CD8⁺ CD28⁻ T cells in response to Epstein-Barr virus in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2005. Vol. 32, No 2. P. 239–251.

Knevel R., de Rooy D. P., Zhernakova A. et al. Association of variants in IL2RA with progression of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis. Rheum.* 2013. Vol. 65, No 7. P. 1684–1693. doi: 10.1002/art.37938.

Komatsu N., Mariotti-Ferrandiz M. E., Wang Y. et al. Heterogeneity of natural Foxp3⁺ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. Vol. 106, No 6. P. 1903–1908. doi: 10.1073/pnas.0811556106.

Komatsu N., Okamoto K., Sawa S. et al. Pathogenic conversion of Foxp3⁺ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat. Med.* 2014. Vol. 20, No 1. P. 62–68. doi: 10.1038/nm.3432.

Krzyształowska-Wawrzyniak M., Ostanek M., Clark J. et al. The distribution of human endogenous retrovirus K-113 in health and autoimmune diseases in Poland. *Rheumatology (Oxford).* 2011. Vol. 50, No 7. P. 1310–1314. doi: 10.1093/rheumatology/ker022.

Lang H. L., Jacobsen H., Ikemizu S. et al. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat. Immunol.* 2002. Vol. 3, No 10. P. 940–943.

Larsson H. E., Jönsson I., Lernmark A. et al. Decline in titers of anti-idiotypic antibodies specific to autoantibodies to GAD65 (GAD65Ab) precedes development of GAD65Ab and type 1 diabetes. *PLOS ONE.* 2013. Vol. 8, No 6. P. e65173. doi: 10.1371/journal.pone.0065173.

Lee Y. H., Bae S. C., Choi S. J. et al. The association between the PTPN22 C1858T polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis update. *Mol. Biol. Rep.* 2012. Vol. 39, No 4. P. 3453–3460. doi: 10.1007/s11033-011-1117-3.

Lee Y. H., Kim J. H., Seo Y. H. et al. CTLA-4 polymorphisms and susceptibility to inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Hum. Immunol.* 2014. Vol. 75, No 5. P. 414–421. doi: 10.1016/j.humimm.2014.02.020.

Lee Y. H., Choi S. J., Ji J. D., Song G. G. The association between the PTPN22 C1858T polymorphism and systemic sclerosis: a meta-analysis. *Mol. Biol. Rep.* 2012. Vol. 39, No 3. P. 3103–3108. doi: 10.1007/s11033-011-1074-x.

Li N., Ma T., Han J. et al. Increased apoptosis induction in CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ T cells contributes to enhanced disease activity in patients with rheumatoid arthritis through IL-10 regulation. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2014. Vol. 18, No 1. P. 78–85.

- Li S., Yu Y., Yue Y. et al. Microbial Infection and Rheumatoid Arthritis. *J. Clin. Cell. Immunol.* 2013. Vol. 4, No 6. P. 174.
- Liang B., Gardner D., Griswold D. E. et al. Anti-interleukin-6 monoclonal antibody inhibits autoimmune responses in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Immunology.* 2006. Vol. 119, No 3. P. 296–305.
- Liberal R., Grant C. R., Mieli-Vergani G., Vergani D. Autoimmune hepatitis: A comprehensive review. *J. Autoimmun.* 2013. Vol. 4. P. 126–139. doi: 10.1016/j.jaut.2012.11.002.
- Long S. A., Cerosaletti K., Bollyky P. L. et al. Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in CD4+CD25+ regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects. *Diabetes.* 2010. Vol. 59, No 2. P. 407–415. doi: 10.2337/db09-0694.
- Lucas R. M., Ponsonby A. L., Dear K. et al. Current and past Epstein-Barr virus infection in risk of initial CNS demyelination. *Neurology.* 2011. Vol. 77, No 4. P. 371–379. doi: 10.1212/WNL.0b013e318227062a.
- Luczynski W., Stasiak-Barmuta A., Urban R. et al. Lower percentages of T regulatory cells in children with type 1 diabetes – preliminary report. *Pediatr. Endocrinol. Diabetes. Metab.* 2009. Vol. 15, No 1. P. 34–38.
- Lundberg K., Kinloch A., Fisher B. A. et al. Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis. Rheum.* 2008. Vol. 58, No 10. P. 3009–3019. doi: 10.1002/art.23936.
- Lünemann J. D., Jelčić I., Roberts S. et al. EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. *J. Exp. Med.* 2008. Vol. 205, No 8. P. 1763–1773. doi: 10.1084/jem.20072397.
- Maier L. M., Lowe C. E., Cooper J. et al. IL2RA genetic heterogeneity in multiple sclerosis and type 1 diabetes susceptibility and soluble interleukin-2 receptor production. *PLoS Genet.* 2009. Vol. 5, No 1. P. e1000322. doi: 10.1371/journal.pgen.1000322.
- Malek T. R., Castro I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity.* 2010. Vol. 33, No 2. P. 153–165. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.004.
- Martinez-Forero I., Garcia-Munoz R., Martinez-Pasamar S. et al. IL-10 suppressor activity and ex vivo Tr1-cell function are impaired in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* 2008. Vol. 38, No 2. P. 576–586. doi: 10.1002/eji.200737271.
- Martinez-Martinez R. E., Abud-Mendoza C., Patiño-Marin N. et al. Detection of periodontal bacterial DNA in serum and synovial fluid in refractory rheumatoid arthritis patients. *J. Clin. Periodontol.* 2009. Vol. 36, No 12. P. 1004–1010. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01496.x.
- Marwaha A. K., Crome S. Q., Panagiotopoulos C. et al. Cutting edge: increased IL-17-secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes. *J. Immunol.* 2010. Vol. 185, No 7. P. 3814–3818. doi: 10.4049/jimmunol.1001860.
- McClain M. T., Heinlen L. D., Dennis G. J. et al. Early events in lupus humoral autoimmunity suggest initiation through molecular mimicry. *Nat. Med.* 2005. Vol. 11, No 1. P. 85–89.
- McClymont S. A., Putnam A. L., Lee M. R. et al. Plasticity of human regulatory T cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes. *J. Immunol.* 2011. Vol. 186, No 7. P. 3918–3926. doi: 10.4049/jimmunol.1003099.
- Menconi F., Osman R., Monti M. C. et al. Shared molecular amino acid signature in the HLA-DR peptide binding pocket predisposes to both autoimmune diabetes and thyroiditis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. Vol. 107, No 39. P. 16899–16903. doi: 10.1073/pnas.1009511107.
- Mikulikova Z., Praksova P., Stourac P. et al. Imbalance in T-cell and cytokine profiles in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 2011. Vol. 300, No 1–2. P. 135–141. doi: 10.1016/j.jns.2010.08.053.
- Mikulik T. R., Thiele G. M., Deane K. D. et al. Porphyromonas gingivalis and disease-related autoantibodies in individuals at increased risk of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2012. Vol. 64, No 11. P. 3522–3530. doi: 10.1002/art.34595.
- Miyara M., Amoura Z., Parizot C. et al. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 2005. Vol. 175, No 12. P. 8392–8400.
- Mohammad A. A., Rahbar A., Lui W. O. et al. Detection of circulating hcmv-miR-UL112–3p in patients with glioblastoma, rheumatoid arthritis, diabetes mellitus and healthy controls. *PLoS One.* 2014. Vol. 9, No 12. P. e113740. doi: 10.1371/journal.pone.0113740.
- Mohammad A. A., Rahbar A., Lui W. O. et al. Detection of circulating hcmv-miR-UL112–3p in patients with glioblastoma, rheumatoid arthritis, diabetes mellitus and healthy controls. *PLoS One.* 2014. Vol. 9, No 12. e113740. doi: 10.1371/journal.pone.0113740.
- Moradi B., Schnatzer P., Hagmann S. et al. CD4+CD25+/highCD127low/- regulatory T cell are enriched in rheumatoid arthritis and osteoarthritis joints – analysis of frequency and phenotype in synovial membrane, synovial fluid and peripheral blood. *Arthritis. Res. Ther.* 2014. Vol. 16, No 2. R97. doi: 10.1186/ar4545.
- Moser K. L., Kelly J. A., Lessard C. J., Harley J. B. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Genes. Immun.* 2009. Vol. 10, No 5. P. 373–379. doi: 10.1038/gene.2009.39.
- Nie H., Zheng Y., Li R. et al. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF-alpha in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 2013. Vol. 19, No 3. P. 322–328. doi: 10.1038/nm.3085.
- Niu Q., Cai B., Huang Z. C. et al. Disturbed Th17/Treg balance in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 2012. Vol. 32, No 9. P. 2731–2736. doi: 10.1007/s00296-011-1984-x.
- Ohi K., Tenbrock K. Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011. doi: 10.1155/2011/432595.
- Ollier W. Rheumatoid arthritis and Epstein-Barr virus: a case of living with the enemy? *Ann. Rheum. Dis.* 2000. Vol. 59, No 7. P. 497–499.
- O'Shea J. J., Paul W. E. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science.* 2010. Vol. 327, No 5969. P. 1098–1102. doi: 10.1126/science.1178334.

- Ou D., Mitchell L. A., Metzger D. L. et al. Cross-reactive rubella virus and glutamic acid decarboxylase (65 and 67) protein determinants recognised by T cells of patients with type I diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2000. Vol. 43, No 6. P. 750–762.
- Ouyang P., Rakus K., van Beurden S. J. et al. IL-10 encoded by viruses: a remarkable example of independent acquisition of a cellular gene by viruses and its subsequent evolution in the viral genome. *J. Gen. Virol.* 2014. Vol. 95. Pt. 2. P. 245–262. doi: 10.1099/vir.0.058966-0.
- Pakpoor J., Disanto G., Gerber J. E. et al. The risk of developing multiple sclerosis in individuals seronegative for Epstein-Barr virus: a meta-analysis. *Mult. Scler.* 2013. Vol. 19, No 2. P. 162–166. doi: 10.1177/1352458512449682.
- Perron H., Germe R., Bernard C. et al. Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease. *Mult. Scler.* 2012. Vol. 18, No 12. P. 1721–1736. doi: 10.1177/1352458512441381.
- Pieper J., Herrath J., Raghavan S. et al. CTLA4-Ig (abatacept) therapy modulates T cell effector functions in autoantibody-positive rheumatoid arthritis patients. *BMC Immunol.* 2013. 14:34. doi: 10.1186/1471-2172-14-34.
- Pierer M., Rothe K., Quandt D. et al. Association of anticytomegalovirus seropositivity with more severe joint destruction and more frequent joint surgery in rheumatoid arthritis. *Arthritis. Rheum.* 2012. Vol. 64, No 6. P. 1740–1749. doi: 10.1002/art.34346.
- Pischon N., Pischon T., Kröger J. et al. Association among rheumatoid arthritis, oral hygiene, and periodontitis. *J. Periodontol.* 2008. Vol. 79, No 6. P. 979–986. doi: 10.1902/jop.2008.070501.
- Prado C., de Paz B., López P. et al. Relationship between FOXP3 positive populations and cytokine production in systemic lupus erythematosus. *Cytokine*. 2013. Vol. 61, No 1. 90–96. doi: 10.1016/j.cyto.2012.08.033.
- Radstake T. R., van Bon L., Broen J. et al. Increased frequency and compromised function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGFbeta expression. *PLoS One*. 2009. Vol. 4, No 6. e5981. doi: 10.1371/journal.pone.0005981.
- Reynier F., Verjat T., Turrel F. et al. Increase in human endogenous retrovirus HERV-K (HML-2) viral load in active rheumatoid arthritis. *Scand. J. Immunol.* 2009. Vol. 70, No 3. P. 295–299. doi: 10.1111/j.1365-3083.2009.02271.x.
- Röhner E., Detert J., Kolar P. et al. Induced apoptosis of chondrocytes by *Porphyromonas gingivalis* as a possible pathway for cartilage loss in rheumatoid arthritis. *Calcif. Tissue. Int.* 2010. Vol. 87, No 4. P. 333–340. doi: 10.1007/s00223-010-9389-5.
- Rolland A., Jouvin-Marche E., Saresella M. et al. Correlation between disease severity and in vitro cytokine production mediated by MSR (multiple sclerosis associated retroviral element) envelope protein in patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2005. Vol. 160, No 1–2. P. 195–203.
- Rolland A., Jouvin-Marche E., Viret C. et al. The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses. *J. Immunol.* 2006. Vol. 176, No 12. P. 7636–7644.
- Routsias J. G., Kyriakidis N. C., Friedman D. M. et al. Association of the idiotype: antiidiotype antibody ratio with the efficacy of intravenous immunoglobulin treatment for the prevention of recurrent autoimmune-associated congenital heart block. *Arthritis. Rheum.* 2011. Vol. 63, No 9. P. 2783–2789. doi: 10.1002/art.30464.
- Russell S. E., Moore A. C., Fallon P. G., Walsh P. T. Soluble IL-2R α (sCD25) exacerbates autoimmunity and enhances the development of Th17 responses in mice. *PLoS One*. 2012. Vol. 7, No 10. e47748. doi: 10.1371/journal.pone.0047748.
- Ryba-Stanislawowska M., Skrzypkowska M., Mysliwiec M., Mysliwska J. Loss of the balance between CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells and CD4(+) IL17A(+) Th17 cells in patients with type 1 diabetes. *Hum. Immunol.* 2013. Vol. 74, No 6. P. 701–707. doi: 10.1016/j.humimm.2013.01.024.
- Sabbatini A., Bombardieri S., Migliorini P. Autoantibodies from patients with systemic lupus erythematosus bind a shared sequence of SmD and Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA1. *Eur. J. Immunol.* 1993. Vol. 23, No 5. P. 1146–1152.
- Sakaguchi S., Miyara M., Costantino C. M., Hahler D. A. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2010. Vol. 10, No 7. P. 490–500. doi: 10.1038/nri2785.
- Salinas-Carmona M. C., de la Cruz-Galicia G., Pérez-Rivera I. et al. Spontaneous arthritis in MRL/lpr mice is aggravated by *Staphylococcus aureus* and ameliorated by *Nippostrongylus brasiliensis* infections. *Autoimmunity*. 2009. Vol. 42, No 1. P. 25–32. doi: 10.1080/08916930802228290.
- Saresella M., Marventano I., Longhi R. et al. CD4+CD25+FoxP3+PD1-regulatory T-cells in acute and stable relapsing remitting multiple sclerosis and their modulation by therapy. *FASEB J.* 2008. Vol. 22, No 10. P. 3500–3508. doi: 10.1096/fj.08-110650.
- Schneider A., Rieck M., Sanda S. et al. The effector T cells of diabetic subjects are resistant to regulation via CD4+FOXP3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2008. Vol. 181, No 10. P. 7350–7355.
- Schulte B. M., Bakkers J., Lanke K. H. et al. Detection of enterovirus RNA in peripheral blood mononuclear cells of type 1 diabetic patients beyond the stage of acute infection. *Viral Immunol.* 2010. Vol. 23, No 1. P. 99–104. doi: 10.1089/vim.2009.0072.
- Shapira Y., Agmon-Levin N., Shoenfeld Y. Geoepidemiology of autoimmune rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2010. Vol. 6, No 8. P. 468–476. doi: 10.1038/nrrheum.2010.86.
- Shimane K., Kochi Y., Suzuki A. et al. An association analysis of HLA-DRB1 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in a Japanese population: effects of *09:01 allele on disease phenotypes. *Rheumatology*. 2013. Vol. 52, No 7. P. 1172–1182. doi:10.1093/rheumatology/kes427.
- Snijders A., Elferink D. G., Geluk A. et al. An HLA-DRB1-derived peptide associated with protection against rheumatoid arthritis is naturally processed by human APCs. *J. Immunol.* 2001. Vol. 166, No 8. P. 4987–4993.

Sojka D. K., Huang Y. H., Fowell D. J. Mechanisms of regulatory T-cell suppression – a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*. 2008. Vol. 124, No 1. P. 13–22. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02813.x.

Song G. G., Bae S. C., Kim J. H., Lee Y. H. The PTPN22 C1858T polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatol. Int.* 2013. Vol. 33, No 8. P. 1991–1999. doi: 10.1007/s00296-013-2679-2.

Song G. G., Kim J. H., Lee Y. H. The CTLA-4 +49 A/G, CT60 A/G and PTPN22 1858 C/T polymorphisms and susceptibility to vitiligo: a meta-analysis. *Mol. Biol. Rep.* 2013. Vol. 40, No 4. P. 2985–2993. doi: 10.1007/s11033-012-2370-9.

Stahl E. A., Raychaudhuri S., Remmers E. F. et al. Consortium et al Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat. Genet.* 2010. Vol. 42, No 6. P. 508–514. doi: 10.1038/ng.582.

Suen J. L., Li H. T., Jong Y. J. et al. Altered homeostasis of CD4+FoxP3+ regulatory T-cell subpopulations in systemic lupus erythematosus. *Immunology*. 2009. Vol. 127, No 2. P. 196–205. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02937.x.

Sur G., Sporis D., Kudor-Szabadi L., Samasca G. Super-antigens and human pathology: always an interesting topic. *J. Bioequiv. Availab.* 2013. Vol. 5, No 3. P. 125–128. doi: 10.4172/jbb.1000146.

Tai A. K., O'Reilly E. J., Alroy K. A. et al. Human endogenous retrovirus – K18 Env as a risk factor in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 2008. Vol. 14, No 9. P. 1175–1180. doi: 10.1177/1352458508094641.

Tejada-Simon M. V., Zang Y. C., Hong J. et al. Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 2003. Vol. 53, No 2. P. 189–197.

Uner A., Gavalchin J. Idiotypes. *Encyclopedia of life sciences*. 2006. P. 1–5. doi: 10.1002/9780470015902.a0000912.

Venken K., Hellings N., Thewissen M. et al. Compromised CD4+CD25(high) regulatory T-cell function

in patients with relapsing remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single cell level. *Immunology*. 2008. Vol. 123, No 1. P. 79–89.

Wang L. M., Zhang D. M., Xu Y. M., Sun S. L. Interleukin 2 Receptor α Gene Polymorphism and Risk of Multiple Sclerosis: a meta-analysis. *J. Int. Med. Res.* 2011. Vol. 39, No 5. P. 1625–1635.

Wang T., Sun X., Zhao J. et al. Regulatory T cells in rheumatoid arthritis showed increased plasticity toward Th17 but retained suppressive function in peripheral blood. *Ann. Rheum. Dis.* 2015. Vol. 74, No 6. P. 1293–1301. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204228.

Wehrens E. J., Mijnheer G., Duurland C. L. et al. Functional human regulatory T cells fail to control autoimmune inflammation due to PKB/c-akt hyperactivation in effector cells. *Blood*. 2011. Vol. 118, No 13. P. 3538–3548. doi: 10.1182/blood-2010-12-328187.

Wing K., Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat. Immunol.* 2010. Vol. 11, No 1. P. 7–13.

Yomogida K., Chou Y. K., Chu C. Q. Superantigens induce IL-17 production from polarized Th1 clones. *Cytokine*. 2013. Vol. 63, No 1. P. 6–9. doi: 10.1016/j.cyto.2013.04.015.

Zanelli E., Gonzalez-Gay M. A., David C. S. Could HLA-DRB1 be the protective locus in rheumatoid arthritis. *Immunol. Today*. 1995. Vol. 16, No 6. P. 274–278.

Zanone M. M., Favaro E., Quadri R. et al. Association of cytomegalovirus infections with recurrence of humoral and cellular autoimmunity to islet autoantigens and of type 1 diabetes in a pancreas transplanted patient. *Transpl. Int.* 2010. Vol. 23, No 3. P. 333–337. doi: 10.1111/j.1432-2277.2009.00994.x.

Zhou L., Chong M. M., Littman D. R. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*. 2009. Vol. 30, No 5. P. 646–655. doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.001.

Received August 18, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кравченко Полина Николаевна

аспирант группы иммунологии
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: k-polina13@mail.ru
тел.: (8142) 769810

Олейник Евгения Константиновна

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

CONTRIBUTORS:

Kravchenko, Polina

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

Oleinik, Evgenia

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

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 58.036.5:546.48

РАЗДЕЛЬНОЕ И СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И КАДМИЯ НА НЕКОТОРЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПШЕНИЦЫ

Ю. В. Венжик, А. Ф. Титов, Е. С. Холопцева, В. В. Таланова

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Изучалась динамика ряда показателей водного обмена, фотосинтетической активности и холодоустойчивости у пшеницы (*Triticum aestivum* L.) при **раздельном и совместном действии** низкой закаливающей температуры 4 °С и кадмия (100 мкМ). Установлено, что под влиянием указанных стресс-факторов в клетках и тканях пшеницы происходит комплекс физиологических изменений, динамика которых зависит от стрессора. В частности, низкая температура вызывает у пшеницы ряд адаптивных изменений, способствующих формированию повышенной холодоустойчивости, а именно: увеличение размеров клеток мезофилла, числа хлоропластов в них и содержания хлорофиллов в светособирающем комплексе, стабилизацию скорости фотосинтеза, транспирации и устьичной проводимости листьев, снижение оводненности тканей. В присутствии кадмия по мере увеличения продолжительности его действия снижается холодоустойчивость листьев и развиваются токсические эффекты на растения: прекращается рост клеток мезофилла, в них уменьшается число хлоропластов, в листьях уменьшается содержание фотосинтетических пигментов, появляются признаки хлороза. При совместном действии этих стресс-факторов кадмий препятствует развитию некоторых адаптивных реакций, вызываемых действием холода (увеличение размеров клеток, числа хлоропластов в них), а низкая температура частично нивелирует токсическое влияние кадмия на пигментный аппарат растений и предотвращает развитие хлороза. Таким образом, результаты проведенных исследований показывают, что реакция растений пшеницы на совместное действие низкой температуры и кадмия существенно отличается от их реакции на действие тех же стресс-факторов по отдельности.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L.; низкая температура; кадмий; водный обмен; фотосинтетический аппарат; холодоустойчивость.

Yu. V. Venzhik, A. F. Titov, E. S. Kholoptseva, V. V. Talanova. SEPARATE AND COMBINED EFFECTS OF LOW TEMPERATURE AND CADMIUM ON SOME PHYSIOLOGICAL INDICATORS IN WHEAT

The effects of separate and combined impact of low temperature (4 °C) and cadmium (100 μM) on the dynamics of a number of indicators of the water metabolism, photo-

synthetic activity and cold tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) were investigated. It was found that these stress factors induce a complex of physiological changes in wheat cells and tissues, but their dynamics depends on the type of the stress factor. Thus, low temperature caused a number of protective and adaptive changes in wheat cells, such as enlargement of mesophyll cells, increase in the number of chloroplasts in them and chlorophyll content in the light-harvesting complex, stabilization of the rate of photosynthesis, transpiration and stomatal conductance of leaves, reduction of the water content of tissues. Probably these changes enhance the cold tolerance of plants. In the presence of cadmium the cold tolerance of leaves decreased and the toxic effects of cadmium developed as the impact continued: the growth of mesophyll cells stopped, the number of chloroplasts in them decreased, the content of photosynthetic pigments in the leaves declined, there appeared signs of chlorosis. In a combined treatment, cadmium prevented the development of some adaptive responses to low temperature (enlargement of cells and increase in the number of chloroplasts in them), whereas the cold partially dampened the toxic effects of cadmium on the pigment apparatus of the plants and prevented the development of chlorosis. Our results thus show that the response of wheat plants to the combined effect of low temperature and cadmium is significantly different from their reaction to these stressors acting individually.

Key words: *Triticum aestivum* L.; low temperature; cadmium; water metabolism; photosynthetic apparatus; cold tolerance.

Введение

Низкая температура и тяжелые металлы, в частности кадмий, относятся к факторам, негативно влияющим на растения и ограничивающим их рост и распространение [Ruelland, Zachovski, 2010; Theocharis et al., 2012; Hoseni, Zargari, 2013; Титов и др., 2014]. Каждый из этих факторов способен оказывать существенное влияние и на другие основные физиологические процессы растений, включая водный обмен и фотосинтез [Ruelland, Zachovski, 2010; Theocharis et al., 2012; Казнина, Титов, 2013; Tran, Popova, 2013]. В природных условиях они достаточно часто воздействуют на растения одновременно, например, в северных районах на территориях, прилежащих к крупным промышленным предприятиям, автострадам и т. д. Тем не менее сведения о совместном действии указанных стресс-факторов на основные физиологические процессы в известной нам литературе немногочисленны [Гармаш, Головки, 2009; Репкина и др., 2014], хотя они могли бы расширить существующие представления о защитно-приспособительных реакциях растений, обеспечивающих их устойчивость в условиях одновременного действия двух и более стрессоров разной природы. Учитывая это, мы провели сравнительное изучение динамики показателей водного обмена, активности фотосинтетического аппарата (ФСА) и холодоустойчивости у проростков озимой пшеницы при отдельном и совместном действии низкой температуры и кадмия.

Материалы и методы

Исследования выполнены на приборно-аналитической базе Центра коллективного пользования научным оборудованием Института биологии КарНЦ РАН «Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера».

Опыты проводили с проростками озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39, выращенными в рулонах фильтровальной бумаги на питательном растворе с добавлением микроэлементов в камере искусственного климата при температуре воздуха 22 °С, его относительной влажности 60–70 %, освещенности 10 клк, фотопериоде 14 ч. По достижении недельного возраста проростки в течение 7 сут подвергали действию низкой закалывающей температуры 4 °С или сульфата кадмия (100 мкМ), а также их совместному действию, сохраняя прочие условия неизменными.

Интенсивность транспирации, устьичную проводимость и скорость фотосинтеза листьев изучали с помощью портативной фотосинтетической системы HCM-1000 (Walz, Германия). Оводненность тканей рассчитывали по общепринятой формуле [Рогожин, Рогожина, 2013]. Содержание хлорофиллов измеряли на спектрофотометре СФ-2000 (Спектр, Россия) в спиртовой вытяжке [Lichtenthaler, Wellburn, 1983]. Долю хлорофиллов в светособирающем комплексе (ССК) от их суммы рассчитывали с учетом того, что весь хлорофилл *b* находится в ССК, а отношение хлорофиллов *a/b* в ССК

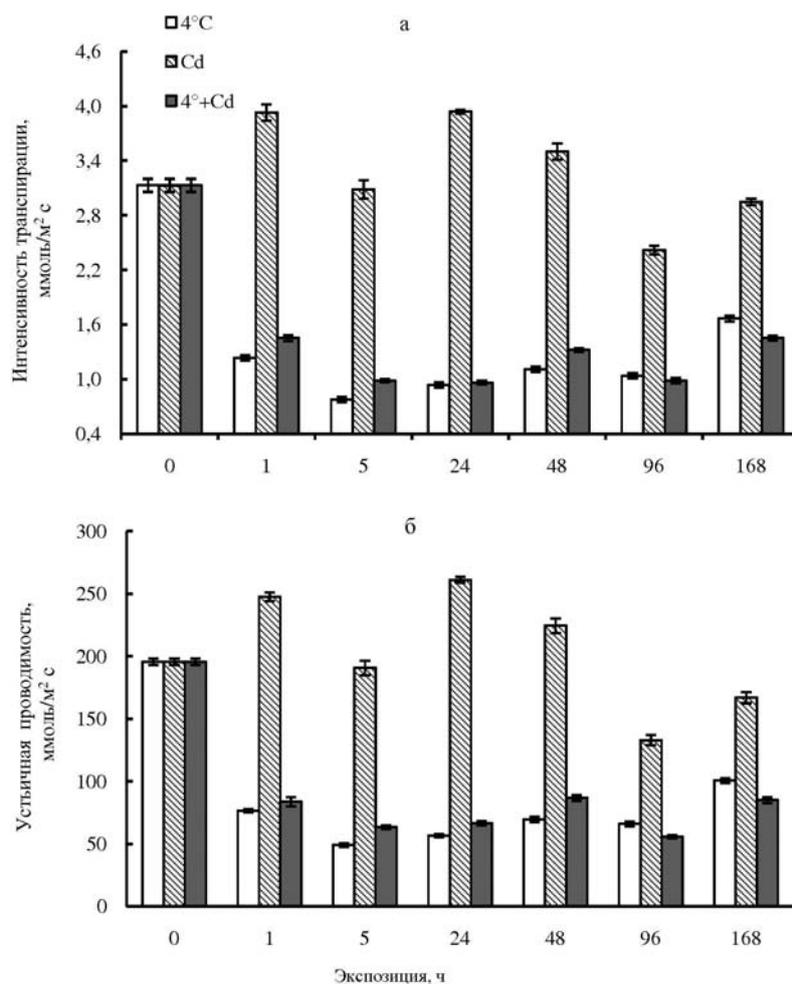


Рис. 1. Раздельное и совместное влияние температуры (4 °С) и кадмия (100 мкМ) на интенсивность транспирации (а) и устьичную проводимость (б) листьев пшеницы

равно 1,2 [Lichtenthaler, 1987]. Измерение клеток мезофилла и подсчет числа хлоропластов в них производили в мацерированной суспензии листьев [Гавриленко, Жигалова, 2003].

О холодоустойчивости листьев судили по температуре (LT_{50}), вызывающей гибель 50 % палисадных клеток паренхимы листовых высеков после их 5-минутного промораживания в термоэлектрическом микрохолодильнике ТЖР-02/-20 («Интерм», Россия) при последовательном изменении температуры с интервалом 0,4 °С [Балагурова и др., 1982]. Жизнеспособность клеток определяли с помощью светового микроскопа Микмед-2 (ЛОМО, Россия) с объективом 40× по деструкции хлоропластов и коагуляции цитоплазмы.

Повторность в пределах отдельного опыта при оценке устойчивости и указанных выше физиологических показателей составляла 3–6 раз. Каждый опыт повторяли не менее 3 раз. Для определения размеров клеток и подсчета количества хлоропластов в них в каждом варианте опыта анализировали 80–100 клеток

мезофилла. В таблицах и на графиках приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. В статье обсуждаются величины, достоверные при $p \leq 0,05$.

Результаты

Интенсивность транспирации, устьичная проводимость и оводненность тканей. Исследования показали, что под влиянием температуры 4 °С транспирация и устьичная проводимость листьев пшеницы значительно (на 60 %) снижаются уже в первые часы опыта, но в дальнейшем (на 2–4-е сут) остаются примерно на том же уровне, а к 7-м сут даже немного возрастают (рис. 1). Кадмий (при 22 °С), напротив, вызывал небольшое увеличение показателей в течение первых суток опыта, а затем они снижались до 80–90 % от исходных значений (см. рис. 1). При совместном действии низкой температуры и кадмия изменения транспирации и устьичной проводимости листьев были схожи с их изменениями при 4 °С: существенное

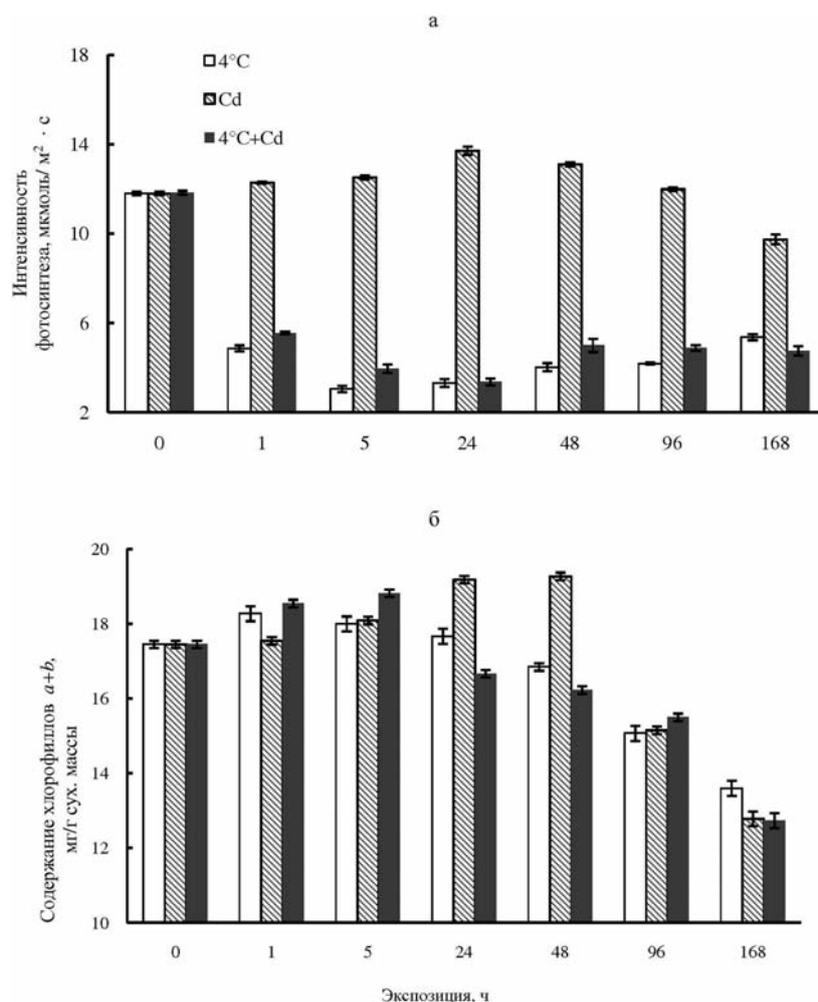


Рис. 2. Раздельное и совместное влияние температуры (4 °С) и кадмия (100 мкМ) на интенсивность фотосинтеза (а) и суммарное содержание хлорофиллов (б) в листьях пшеницы

снижение показателей происходило в первые часы опыта, а к 7-м сут наблюдалась их стабилизация (см. рис. 1). Оводненность тканей побегов достоверно снижалась под влиянием низкой температуры и при совместном действии стресс-факторов (к 4–7-м сут опыта), а в присутствии кадмия при 22 °С этот показатель оставался на уровне исходных значений (табл. 1).

Таблица 1. Раздельное и совместное влияние температуры (4 °С) и кадмия (100 мкМ) на оводненность тканей побега пшеницы

Экспозиция, ч	Оводненность побега, %		
	4 °С	Cd	4 °С+Cd
0	89,3 ± 0,4	89,3 ± 0,4	89,3 ± 0,4
24	88,1 ± 0,6	88,7 ± 0,1	88,2 ± 0,7
96	86,3 ± 0,3*	87,1 ± 0,1	85,9 ± 0,4*
168	85,1 ± 0,3*	86,8 ± 0,1	85,1 ± 0,5*

Интенсивность фотосинтеза и содержание фотосинтетических пигментов. Интенсивность фотосинтеза листьев пшеницы под влиянием

температуры 4 °С и при ее совместном действии с кадмием снижалась в течение первых суток опыта, а затем постепенно возрастала, составляя к концу эксперимента 40 % от исходной (рис. 2, а). Под влиянием кадмия (при 22 °С), наоборот, интенсивность фотосинтеза уменьшалась (на 20 %) только к 7-м сут опыта (см. рис. 2, а).

Установлено, что суммарное содержание хлорофиллов в листьях пшеницы возрастало в течение первых нескольких суток при всех видах стрессового воздействия (рис. 2, б). В дальнейшем (на 2–7-е сут) зафиксировано снижение этого показателя, которое было наиболее выражено при 4 °С (см. рис. 2, б). Важно, что увеличение доли хлорофилла в ССК отмечено как при раздельном, так и при совместном действии стрессоров (табл. 2). Отметим также, что в присутствии кадмия (при 22 °С) на 4–5-е сут опыта у проростков пшеницы зафиксированы визуальные признаки хлороза, которые отсутствовали при 4 °С и совместном действии стресс-факторов.

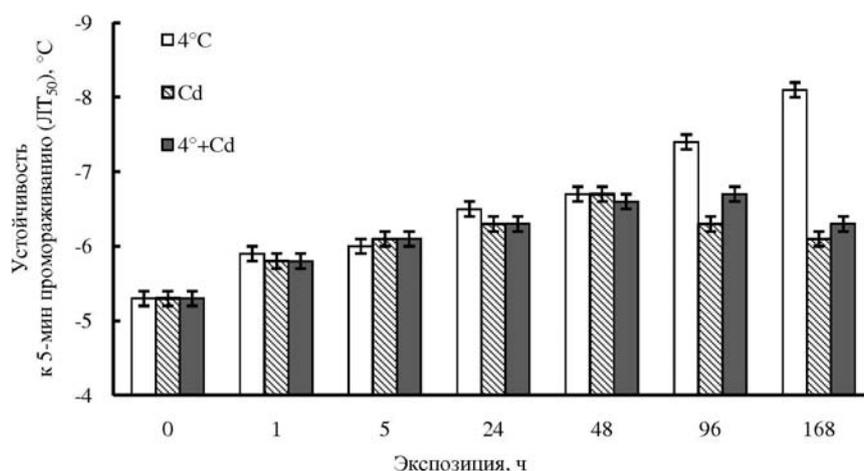


Рис. 3. Раздельное и совместное влияние температуры (4 °С) и кадмия (100 мкМ) на холодоустойчивость (ЛТ₅₀) клеток листьев пшеницы

Таблица 2. Раздельное и совместное влияние температуры (4 °С) и кадмия (100 мкМ) на содержание хлорофилла в светособирающем комплексе (ССК) пшеницы

Экспозиция, ч	Содержание хлорофилла в ССК, % от общего содержания хлорофилла		
	4 °С	Cd	4 °С + Cd
0	52	52	52
1	50	53	55
5	57	55	57
24	54	56	57
48	57	55	57
96	55	55	58
168	56	56	57

Мезоструктура клеток. Установлено, что на 4–7-е сут низкотемпературного воздействия в листьях пшеницы существенно увеличиваются размеры клеток мезофилла, а отношение длинной оси клетки к короткой при этом снижается (табл. 3), что свидетельствует о смене формы клеток на более округлую. Почти одновременно значительно увеличивалось количество хлоропластов в клетках мезофилла (см. табл. 3). Кадмий, независимо от сопутствующей температуры, не вызывал изменений в размерах и форме клеток листьев, а к концу опыта (на 7-е сут) в них уменьшалось число хлоропластов (см. табл. 3).

Устойчивость. Исследования показали, что в течение первых двух суток опыта холодоустойчивость пшеницы увеличивалась сходным образом во всех вариантах опыта (рис. 3). Но в дальнейшем (на 3–7-е сут) динамика устойчивости зависела от вида стрессового воздействия. Так, при 4 °С устойчивость росла в течение всего опыта, в присутствии кадмия (при 22 °С) снижалась к 4-м сут, а при совместном действии стресс-факторов – снижалась к 7-м сут воздействия (см. рис. 3).

Таблица 3. Раздельное и совместное влияние температуры (4 °С) и кадмия (100 мкМ) на размеры клеток мезофилла и число хлоропластов в них в листьях пшеницы

Экспозиция, ч	Площадь клеток, мкм ²	L/W	Количество хлоропластов в клетке, шт.
4 °С			
0	324,6 ± 9,7	1,9	10 ± 0,1
24	367,3 ± 21,7	1,7	10 ± 0,3
96	505,9 ± 11,4*	1,5	13 ± 0,3*
168	462,1 ± 9,7*	1,5	13 ± 0,2*
Cd			
0	324,6 ± 9,7	1,9	10 ± 0,1
24	314,6 ± 9,7	1,9	10 ± 0,1
96	301,7 ± 8,5	1,9	10 ± 0,1
168	326,7 ± 7,9	1,8	9 ± 0,2*
4 °С + Cd			
0	324,6 ± 9,7	1,9	10 ± 0,1
24	345,2 ± 11,8	1,7	10 ± 0,2
96	342,3 ± 7,7	1,8	10 ± 0,1
168	342,4 ± 12,2	1,7	9 ± 0,2*

Примечание. L/W – отношение длинной оси клетки к короткой; *отличия от исходного уровня достоверны при $p \leq 0,05$.

Обсуждение

В результате исследования установлено, что как при раздельном, так и при совместном действии низкой закалывающей температуры (4 °С) и кадмия в субповреждающей концентрации (100 мкМ) у растений пшеницы происходит целый ряд изменений, касающихся водного обмена, активности ФСА и холодоустойчивости.

Например, резкое снижение транспирации и устьичной проводимости листьев пшеницы в первые часы действия низкой температуры (см. рис. 1), скорее всего, связано с быстрым закрытием устьиц – одной из первых реакций

растений на охлаждение [Flexas, Medrano, 2002; Mahadjan, Tuteja, 2005; Aghaee et al., 2011]. У многих теплолюбивых культур, таких как фасоль [Martzner, Comstock, 2001], перец [Dodd et al., 2000], некоторые сорта оливы [Péres-López et al., 2010], кукуруза [Melkonian et al., 2004], огурец [Lee et al., 2004] и рис [Yu et al., 2006], этот процесс сопровождается снижением градиента водного потенциала, т. е. возникновением дисбаланса между поглощением воды и транспирацией, вследствие чего нарушаются минеральное питание, фотосинтез и рост. В отличие от этого большинство холодостойких растений способны поддерживать градиент водного потенциала и при закрытых устьицах [Wilkinson et al., 2001; Reynolds et al., 2005], а снижение транспирации и устьичной проводимости их листьев позволяют избежать обезвоживания при понижении температуры [Mahadjan, Tuteja, 2005; Reynolds et al., 2005]. Стабилизация этих процессов при охлаждении растений обычно сопровождается изменениями проницаемости клеточных мембран для воды [Beck et al., 2007] и ее перераспределением в клетке, в частности, уменьшением объема вакуоли и «разрастанием» цитоплазмы [Трунова, 2007], в которой накапливаются сахара и другие осмолитики [Jammhaidi et al., 2012; Klíma et al., 2012], обладающие криопротекторными свойствами, а также дегидрины и другие белки, защищающие клеточные структуры от излишних потерь воды [Verslues et al., 2006], которые происходят при охлаждении (см. табл. 1).

Исследования показали, что интенсивность фотосинтеза также снижалась только в первые часы охлаждения пшеницы, а в дальнейшем оставалась на постоянном уровне (см. рис. 2, а). Скорее всего, подобная стабилизация скорости фотосинтеза обусловлена комплексом адаптивных физиолого-биохимических и структурно-функциональных изменений ФСА [Мирославов, 1994; Лось, 2005; Трунова, 2007; Ruelland, Zachowski, 2010; Венжик и др., 2011, 2012; Theocharis et al., 2012], характерных для холодостойких растений в условиях охлаждения. Отдельно подчеркнем, что под влиянием низкой температуры происходит существенное увеличение холодоустойчивости листьев пшеницы, которое начинается в первые часы опыта и продолжается до его конца (рис. 4; табл. 4). Логично полагать, что этому процессу способствуют и те защитно-приспособительные реакции (снижение оводненности тканей, стабилизация транспирации, устьичной проводимости, интенсивности фотосинтеза, увеличение содержания хлорофиллов в ССК, урупнение

клеток мезофилла и увеличение числа хлоропластов в них), которые отмечены нами в клетках и тканях пшеницы при охлаждении.

В присутствии кадмия динамика изученных физиологических показателей существенным образом отличалась от таковой при 4 °С (см. табл. 4). Попутно отметим, что в наших экспериментах кадмий был использован в форме сульфата, однако влияние аниона на физиологические процессы нами не учитывалось, поскольку при внесении соли в используемой концентрации он не оказывает на растения токсического действия [Kowalska, 2005].

Таблица 4. Количественная оценка изменений некоторых физиологических показателей у пшеницы в зависимости от вида стрессового воздействия*

Показатель	Виды стрессового воздействия		
	4 °С	Cd	4 °С + Cd
Транспирация	53	94	46
Устьичная проводимость	51	85	44
Интенсивность фотосинтеза	43	78	38
Хлорофиллы <i>a+b</i>	78	73	73
Количество хлоропластов	130	90	90
Площадь клеток мезофилла	142	100	105
Холодоустойчивость	153	115	119

Примечание. *Значения показателей приведены на 7-е сут в % от исходного уровня, который принят за 100 %.

Влияние кадмия на устьичную проводимость, транспирацию листьев и оводненность побегов пшеницы оказалось слабо выраженным. Скорее всего, кадмий в данной концентрации не вызывает серьезных нарушений в водном обмене пшеницы. Способность поддерживать достаточно высокий уровень показателей водного обмена в условиях действия различных концентраций кадмия отмечена для пшеницы [Bichnoi et al., 1993] и других злаков, например, тимофеевки [Батова и др., 2013], ячменя [Vassilev et al., 1998; Казнина и др., 2011] и риса [Uraguchi et al., 2009].

В наших опытах установлено, что под влиянием кадмия снижается интенсивность фотосинтеза пшеницы (см. рис. 2, а), прекращается рост клеток мезофилла (см. табл. 3), существенно уменьшается число хлоропластов в них (см. табл. 3) и содержание хлорофиллов в листьях (см. рис. 2, б; табл. 4), появляются признаки хлороза. Эти результаты хорошо согласуются с литературными данными, по которым снижение интенсивности фотосинтеза в присутствии кадмия является основным проявлением его токсического действия на растения [Hasan et al., 2009; Hoseini, Zargari, 2013; Титов и др., 2014], и связано оно, в частности,

с негативным влиянием кадмия на пигментный аппарат, ультраструктуру хлоропластов и др. [Казнина, Титов, 2013; Tran, Popova, 2013; Wang et al., 2014]. **Нами также показано, что проявление токсических эффектов кадмия в использованной концентрации происходит лишь на 3–7-е сут опыта, совпадая по времени со снижением холодоустойчивости листьев.** Вероятно, это связано с тем, что у пшеницы, как и у всех злаков, большая часть кадмия задерживается в корневой системе, которая становится первым барьером на пути поступления кадмия в лист [Казнина, Титов, 2013]. Очевидно, только на 3–7-е сут воздействия содержание кадмия в листьях достигает уровня, при котором проявляются его основные токсические эффекты [Репкина и др., 2012].

Особый интерес представляют данные о совместном влиянии низкой температуры и кадмия на водный обмен и ФСА пшеницы. Нами установлено, что характер изменения транспирации, устьичной проводимости, оводненности тканей и интенсивности фотосинтеза пшеницы при совместном действии изученных стресс-факторов был в целом таким же, как при 4 °С, то есть определялся действием на основные физиологические процессы растений главным образом температуры (см. табл. 4). Однако некоторые из изученных показателей при совместном действии стресс-факторов изменялись так же, как и под влиянием кадмия, а именно прекращался рост клеток мезофилла, снижалось число хлоропластов в них и содержание хлорофиллов в листьях (см. рис. 2, б; табл. 3, 4). Важно, что признаки хлороза, вызываемые кадмием, не наблюдались при совместном его действии с температурой. С одной стороны, такая реакция растений может быть связана с тем, что в условиях охлаждения интенсивность всасывания воды и веществ клетками корня снижается [Reynolds et al., 2005], поэтому при 4 °С кадмий попадает в листья в меньшей концентрации, чем при 22 °С [Репкина, 2014], и его негативное влияние на пигментный аппарат ослабевает. С другой стороны, известно, что под влиянием холода в клетках и тканях пшеницы реализуется комплекс адаптивных реакций, направленных на поддержание активности ФСА [Трунова, 2007; Ruelland, Zachowski, 2010; Венжик и др., 2011, 2012; Theocharis et al., 2012], **которые могут препятствовать развитию хлороза.** Увеличение холодоустойчивости пшеницы, происходящее при этом, также свидетельствует в пользу высказанного предположения о развитии некоторых температурозависимых адаптивных реакций при совместном действии стресс-факторов на растения.

Полученные результаты хорошо корреспондируются с известными из литературы данными о том, что при совместном действии стресс-факторов действие одного из них может частично сглаживать негативные эффекты другого. Показано, например, что засоление увеличивает устойчивость фотосистем к тепловому шоку [Lu et al., 2003] и охлаждению [Cheng et al., 2014], а также препятствует развитию негативных эффектов облучения на ФСА и вызывает усиленное накопление пролина [Çacirlar et al., 2008]. **Облучение растений, в свою очередь, снижает негативные эффекты засоления, вызывая усиленное накопление низкомолекулярных антиоксидантов** [Радюкина и др., 2012]. Совместное действие низкой температуры и кадмия вызывает меньшее увеличение проницаемости мембран, чем их действие по отдельности [Лукаткин и др., 2003]. Кроме того, изменение температуры выращивания растений уменьшает негативное влияние кадмия на дыхание [Гармаш, Головки, 2009] и увеличивает устойчивость растений к фотоингибированию, вызванному действием тяжелых металлов [Streb et al., 2008].

Как показывает анализ литературы, при совместном действии нескольких стресс-факторов на растительный организм их негативные эффекты могут не только нивелироваться, но и суммироваться. Например, совместное действие **UV-B облучения и кадмия вызывает более сильное ингибирование фотосистем, чем их раздельное действие** [Prasad et al., 2004]. Сходные результаты получены при изучении засоления и тяжелых металлов [Ma et al., 2012]. Суммирование эффектов низкой температуры и кадмия установлено в исследованиях их влияния на рост растений [Гармаш, Головки, 2009; Репкина и др., 2014]. В целом наши результаты и литературные данные говорят о том, что реакция растений на совместное (одновременное или последовательное) действие стрессоров может быть различной. Она зависит от природы стрессоров, их дозы, сопутствующих условий и во многих случаях отличается от реакции на действие тех же стрессоров по отдельности.

Заключение

Проведенные исследования показали, что как при раздельном, так и при совместном действии низкой температуры и кадмия у растений пшеницы развивается комплекс изменений, затрагивающих основные физиологические процессы, в частности, водный обмен, фотосинтез и формирование холодоустойчивости. Характер происходящих при этом изменений

определяется видом стрессового воздействия, и если под влиянием низкой закалывающей температуры происходит адаптация растений к холоду, то в присутствии кадмия (100 мкМ) по мере увеличения продолжительности его действия развиваются токсические эффекты, связанные в основном с его влиянием на фотосинтетический аппарат растений. При совместном действии указанных факторов кадмий препятствует развитию некоторых температурозависимых адаптивных реакций (увеличение размеров клеток мезофилла и числа хлоропластов в них), а низкая температура, в свою очередь, частично нивелирует токсическое влияние кадмия на пигментный аппарат растений.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания по теме № 0221-2014-0002.

Литература

- Балагурова Н. И., Дроздов С. Н., Хилков Н. И. Метод определения устойчивости растительных тканей к промораживанию. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР, 1982. 6 с.
- Батова Ю. В., Казнина Н. М., Лайдинен Г. Ф., Титов А. Ф. Влияние кадмия на некоторые физиологические процессы у растений тимофеевки луговой (*Phleum pratense* L.) // Труды КарНЦ РАН. 2013. № 3. С. 52–58.
- Венжик Ю. В., Титов А. Ф., Таланова В. В. и др. Влияние пониженной температуры на устойчивость и функциональную активность фотосинтетического аппарата пшеницы // Известия РАН. Сер. биол. 2011. № 2. С. 171–177.
- Венжик Ю. В., Титов А. Ф., Таланова В. В. и др. Структурно-функциональная реорганизация фотосинтетического аппарата растений пшеницы при холодной адаптации // Цитология. 2012. Т. 54, № 12. С. 916–924.
- Гавриленко В. Ф., Жигалова Т. В. Большой практикум по фотосинтезу. М.: Академия, 2003. 241 с.
- Гармаш Е. В., Головки Т. К. Влияние кадмия на рост и дыхание ячменя при двух температурных режимах выращивания // Физиология растений. 2009. Т. 56, № 3. С. 382–387.
- Казнина Н. М., Титов А. Ф. Влияние кадмия на физиологические процессы и продуктивность растений семейства *Poaceae* // Успехи совр. биол. 2013. Т. 133, № 6. С. 588–603.
- Казнина Н. М., Титов А. Ф., Лайдинен Г. Ф., Батова Ю. В. Влияние кадмия на водный обмен растений ячменя // Труды КарНЦ РАН. 2011. № 3. С. 57–61.
- Лось Д. А. Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений // Вестник РАН. 2005. Т. 75, № 4. С. 338–345.
- Лукаткин А. С., Башмаков Д. И., Кипайкина Н. В. Протекторная роль обработки тидиазуроном проростков огурца при действии тяжелых металлов и охлаждения // Физиология растений. 2003. Т. 50, № 3. С. 340–348.
- Мирославов Е. А. Структурная адаптация растений к холодному климату // Бот. журн. 1994. Т. 79, № 2. С. 20–26.
- Радюкина Н. Л., Тоайма В. И., Зарипова Н. Р. Участие низкомолекулярных антиоксидантов в кросс-адаптации лекарственных растений к последовательному действию UV-B облучения и засоления // Физиология растений. 2012. Т. 59, № 1. С. 80–88.
- Репкина Н. С. Эколого-физиологическое исследование механизмов адаптации растений пшеницы к раздельному и совместному действию низкой температуры и кадмия: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 2014. 24 с.
- Репкина Н. С., Таланова В. В., Топчиева Л. В. и др. Влияние кадмия на экспрессию генов транскрипционных факторов *CBF1* и *DREB1* в листьях проростков пшеницы // Труды КарНЦ РАН. 2012. № 2. С. 113–118.
- Репкина Н. С., Таланова В. В., Титов А. Ф., Букарева И. В. Реакция растений пшеницы (*Triticum aestivum* L.) на раздельное и совместное действие низкой температуры и кадмия // Труды КарНЦ РАН. 2014. № 5. С. 133–139.
- Рогожин В. В., Рогожина Т. В. Практикум по физиологии и биохимии растений. СПб.: ГИОРД, 2013. 352 с.
- Титов А. Ф., Казнина Н. М., Таланова В. В. Тяжелые металлы и растения. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2014. 194 с.
- Трунова Т. И. Растение и низкотемпературный стресс // Тимирязевские чтения. Т. 64. М.: Наука, 2007. 54 с.
- Aghaee A., Moradi F., Zare-Maivan H. et al. Physiological responses of two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to chilling stress at seedling stage // Afr. J. Biotechnol. 2011. Vol. 10, No 39. P. 7317–7621.
- Beck E. H., Fettig S., Knake C. et al. Specific and non-specific responses of plants to cold and drought stress // J. Biosci. 2007. Vol. 32, No 3. P. 501–510.
- Bichnoi N. R., Sheoran I. S., Singh R. Influence of cadmium and nickel on photosynthesis and water relations in wheat leaves of different insertion level // Photosynthetica. 1993. Vol. 28, No 3. P. 473–479.
- Çakirlar H., Cicek N., Georgieva K. et al. NaCl induced cross-acclimation to UV-B radiation in four Barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars // Acta Physiol. Plant. 2008. Vol. 30, No 4. P. 561–567.
- Cheng S., Yang Z., Wang M. et al. Salinity improves chilling resistance in *Suaeda salsa* // Acta Physiol. Plant. 2014. Vol. 36, No 7. P. 1823–1830.
- Dodd I. C., He J., Turnbull C. G. N. et al. The influence of supra-optimal root-zone temperatures on growth and stomatal conductance in *Capsicum annuum* L. // J. Exp. Bot. 2000. Vol. 51, No 343. P. 239–248.
- Flexas J., Medrano H. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited // Ann. Botany. 2002. Vol. 89, No 2. P. 183–189.
- Hasan S. A., Fariduddin Q., Ali B. et al. Cadmium: toxicity and tolerance in plants // J. Environ. Biol. 2009. Vol. 30, No 2. P. 165–174.

Hoseini S. M., Zargari F. Cadmium in plants: a review // IJFAS. 2013. Vol. 2, No 17. P. 579–581.

Janmohammadi M., Enayati V., Sabaghnia N. Impact of cold acclimation, de-acclimation and re-acclimation on carbohydrate content and antioxidant enzyme activities in spring and winter wheat // Icel. Agric. Sci. 2012. Vol. 25, No 1. P. 3–11.

Klíma M., Vítámvás P., Selenková S. et al. Dehydrin and proline content in *Brassica napus* and *B. carinata* under cold stress at two irradiances // Biol. Plant. 2012. Vol. 56, No 1. P. 57–61.

Kowalska I. Effect of sulphate level in the nutrient solution on plant growth and sulphur content in tomato plant // Folia Hort. 2005. Vol. 17, No 1. P. 91–100.

Lee S. H., Singh A. D., Chung G. C. et al. Exposure of roots of cucumber (*Cucumis sativus*) to low temperature severely reduced root pressure, hydraulic conductivity and active transport of nutrients // Physiol. Plant. 2004. Vol. 120, No 3. P. 413–422.

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

Lichtenthaler H. K., Wellburn A. L. Determination of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents // Biochem. Soc. Trans. 1983. Vol. 11, No 5. P. 591–593.

Lu C. M., Qiu N. W., Wang B. C., Zhang J. H. Salinity treatment shows no effects on photosystem II photochemistry, but increases the resistance of photosystem II to heat stress in halophyte *Suaeda salsa* // J. Exp. Bot. 2003. Vol. 54, No 383. P. 851–860.

Ma L. J., Yu C. M., Li X. M. et al. Pretreatment with NaCl induced tolerance of rice seedlings to subsequent Cd or Cd+NaCl stress // Biol. plantarum. 2012. Vol. 57, No 3. P. 567–570.

Mahadjan S., Tuteja N. Cold, salinity and drought stresses // Arch. Biochem. Biophys. 2005. Vol. 444, No 2. P. 139–158.

Martner S., Comstock J. The temperature dependence of shoot hydraulic resistance: implications for stomatal behavior and hydraulic limitation // Plant Cell. Environ. 2001. Vol. 24, No 12. P. 1299–1307.

Melkonian J., Yu L.-X., Setter T. L. Chilling responses of maize (*Zea mays* L.) seedlings: root hydraulic conductance, abscisic acid, and stomatal conductance // J. Exp. Bot. 2004. Vol. 55, No 403. P. 1751–1760.

Péres-López D., Gijón M. C., Martino J., Moriana A. Water relation response to soil chilling of six olive (*Olea europaea* L.) cultivars with different frost resistance // SJAR. 2010. Vol. 8, No 3. P. 780–789.

Prasad S. M., Dwivedi R., Zeeshan M., Singh R. UV-B and cadmium induced changes in pigments,

photosynthetic electron transfer activity, antioxidant levels and antioxidative enzyme of *Riccia* sp. // Acta Physiol. Plant. 2004. Vol. 26, No 4. P. 423–430.

Reynolds M. P., Mujeeb-Kasi A., Sawkins M. Prospects for utilizing plante-adaptive mechanisms to improve wheat and other crops in drought- and salinity-prone environment // Ann Appl Biol. 2005. Vol. 146, No 2. P. 239–259.

Ruelland E., Zachowski A. How plants sense temperature // Environ. Exp. Bot. 2010. Vol. 69, No 3. P. 225–232.

Streb P., Aubert S., Gout El. et al. Cross tolerance to heavy-metal and cold-induced photoinhibition in leaves of *Pisum sativum* acclimated to low temperature // Physiol. Mol. Biol. Plants. 2008. Vol. 14, No 3. P. 185–193.

Theocharis A., Clément Ch., Barka E. A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperature // Planta. 2012. Vol. 235, No 6. P. 1091–1105.

Tran T. A., Popova L. P. Function and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects // Turk. J. Bot. 2013. Vol. 37, No 1. P. 1–13.

Uraguchi S., Mori S., Kuramata M. et al. Root-to-shoot Cd translocation via the xylem is the major process determining shoot and grain cadmium accumulation in rice // J. Exp. Bot. 2009. Vol. 60, No 9. P. 2677–2688.

Vassilev A., Berova M., Zlatev Z. Influence of Cd²⁺ on growth, chlorophyll content, and water relations in young barley plants // Biol. Plant. 1998. Vol. 41, No 4. P. 601–606.

Verslues P. E., Agarwal M., Katiyar-Agarwal S. et al. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that effects plant water status // Plant J. 2006. Vol. 45, No 4. P. 523–539.

Wang Y., Jiang X., Li K. et al. Photosynthetic responses of *Oryza sativa* L., seedlings to cadmium stress: physiological, biochemical and ultrastructural analyses // Biometals. 2014. Vol. 27, No 2. P. 389–401.

Wilkinson S., Clephan A. L., Davies W. J. Rapid low temperature-induced stomatal closure occurs in cold-tolerant *Commelina communis* leaves but not in cold sensitive tobacco leaves, via a mechanism that involves apoplastic calcium but not abscisic acid // Plant Physiol. 2001. Vol. 126, No 4. P. 1566–1578.

Yu X., Peng Y. H., Zhang M. H. et al. Water relations and an expression analysis of plasma membrane intrinsic proteins in sensitive and tolerant rice during chilling and recovery // Cell. Research. 2006. Vol. 16, No 6. P. 599–608.

Поступила в редакцию 15.09.2015

References

Balagurova N. I., Drozdov S. N., Khilkov N. I. Metod opredeleniya ustoichivosti rastitel'nykh tkanei k promrazhivaniyu [Method of determination of tolerance of plant tissues to freezing]. Petrozavodsk: Karel'skii filial AN SSSR, 1982. 6 p.

Batova Yu. V., Kaznina N. M., Laidinen G. F., Titov A. F. Vliyaniye kadmia na nekotorye fiziologicheskie

protsessy u rastenii timofeevki lugovoi (*Phleum pretense* L.) [Effect of cadmium on some physiological processes in timothy (*Phleum pretense* L.)]. Trudy KarNTs RAN [Transactions of KarRC RAS]. 2013. No 3. P. 52–58.

Gavrilenko V. F., Zhigalova T. V. Bol'shoi praktikum po fotosintezu. [Large practicum in photosynthesis]. Moscow: Akademiya, 2003. 241 p.

Garmash E. V., Golovko T. K. Effect of cadmium on growth and respiration of barley plants grown under two temperature regimes. *Russ. J. Plant Physiol.* 2009. Vol. 56, No 3. P. 343–347.

Kaznina N. M., Titov A. F. Vliyanie kadmiya na fiziologicheskie protsessy i produktivnost' rastenii semeistva *Poaceae* [The influence of cadmium on physiological processes and productivity of *Poaceae* Plants]. *Uspekhi sovr. biol. [Advances in Current Biol.]*. 2013. Vol. 133, No 6. P. 588–603.

Kaznina N. M., Titov A. F., Laidinen G. F., Batova Yu. V. Vliyanie kadmiya na vodnyi obmen rastenii yachmenya [Effect of cadmium on water relations in barley plants]. *Trudy KarNTs RAN [Transactions of KarRC RAS]*. 2011. No 3. P. 57–61.

Los' D. A. Molekulyarnye mekhanizmy kholodoustoichivosti rastenii [Molecular mechanisms of cold tolerance in plants]. *Vestnik RAN [Herald of RAS]*. 2005. Vol. 75, No 4. P. 338–345.

Lukatkin A. S., Bashmakov D. I., Kipaikina N. V. Protective role of thidiazuron treatment on cucumber seedlings exposed to heavy metals and chilling. *Russ. J. Plant. Physiol.* 2003. Vol. 50, No 3. P. 305–307.

Miroslavov E. A. Strukturnaya adaptatsiya rastenii k kholodnomu klimatu [Structural adaptation of plants to cold climate]. *Bot. zhurn. [Bot. J.]*. 1994. Vol. 79, No 2. P. 20–26.

Radyukina N. L., Zaripova N. R., Toaima V. I. M. The involvement of low-molecular antioxidants in cross-adaptation of medicine plants to successive action of UV-B radiation and salinity. *Russ. J. Plant Physiol.* 2012. Vol. 59, No 1. P. 71–78.

Repkina N. S. Ekologo-fiziologicheskoe issledovanie mekhanizmov adaptatsii rastenii pshenitsy k razdel'nomu i sovместnomu deistviyu nizkoi temperatury i kadmiya [Ecological and physiological study of adaptation mechanisms to separate and combined effects of low temperature and cadmium in wheat]: PhD Diss. (Biol.). Petrozavodsk, 2014. 24 p.

Repkina N. S., Talanova V. V., Topchieva L. V., Batova Yu. V., Titov A. F. Vliyanie kadmiya na ekspressiyu genov transkriptsionnykh faktorov *CBF1* i *DREB1* v list'yakh prorostkov pshenitsy [Effect of cadmium on gene expression of the transcription factors *CBF1* and *DREB1* in wheat seedling leaves]. *Trudy KarNTs RAN [Transactions of KarRC RAS]*. 2012. No 2. P. 113–118.

Repkina N. S., Talanova V. V., Titov A. F., Bukareva I. V. Reaktsiya rastenii pshenitsy (*Triticum aestivum* L.) na razdel'noe i sovместnoe deistvie nizkoi temperatury i kadmiya [Wheat response to separate and combined impact of low temperature and cadmium]. *Trudy KarNTs RAN [Transactions of KarRC RAS]*. 2014. No 5. P. 133–139.

Rogozhin V. V., Rogozhina T. V. Praktikum po fiziologii i biokhimii rastenii [Practical course on plant physiology and biochemistry]. St. Petersburg: GIOR, 2013. 352 p.

Titov A. F., Kaznina N. M., Talanova V. V. Tyazhelye metally i rasteniya [Heavy metals and plants]. Petrozavodsk: KarRC of RAS, 2014. 194 p.

Trunova T. I. Rastenie i nizkotemperaturnyi stress [Plants and low-temperature stress]. Timiryazevskie chteniya [Timiryazev Lecture]. Vol. 64. Moscow: Nauka, 2007. 54 p.

Venzhik Yu. V., Titov A. F., Talanova V. V., Frolova S. A., Talanov A. V., Nazarkina Ye. A. Influence of lowered temperature on the resistance and functional activity of the photosynthetic apparatus of wheat plants. *Biol. Bul.* 2011. Vol. 38, No 2. P. 132–137.

Venzhik Yu. V., Titov A. F., Talanova V. V., Miroslavov E. A., Koteeva N. K. Structural and functional reorganization of photosynthetic apparatus in cold adaptation of wheat plants. *Cell Tissue Biol.* 2013. Vol. 7, No 2. P. 168–176.

Aghaee A., Moradi F., Zare-Maivan H., Zarinkamar F., Pour Iradoost H., Sharifi P. Physiological responses of two rice (*Oriza sativa* L.) genotypes to chilling stress at seedling stage. *Afr. J. Biotechnol.* 2011. Vol. 10, No 39. P. 7317–7621.

Beck E. H., Fettig S., Knake C., Hartig K., Bhattaray T. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *J. Biosci.* 2007. Vol. 32, No 3. P. 501–510.

Bichnoi N. R., Sheoran I. S., Singh R. Influence of cadmium and nickel on photosynthesis and water relations in wheat leaves of different insertion level. *Photosynthetica.* 1993. Vol. 28, No 3. P. 473–479.

Çakirlar H., Cicek N., Georgieva K., Dogru A., Velichkova M. NaCl induced cross-acclimation to UV-B radiation in four Barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Acta Physiol. Plant.* 2008. Vol. 30, No 4. P. 561–567.

Cheng S., Yang Z., Wang M., Song J., Sui N., Fan H. Salinity improves chilling resistance in *Suaeda salsa*. *Acta Physiol. Plant.* 2014. Vol. 36, No 7. P. 1823–1830.

Dodd I. C., He J., Turnbull C. G. N., Lee S. K., Critchley C. The influence of supra-optimal root-zone temperatures on growth and stomatal conductance in *Cap-sicum annuum* L. *J. Exp. Bot.* 2000. Vol. 51, No 343. P. 239–248.

Flexas J., Medrano H. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Ann Botany.* 2002. Vol. 89, No 2. P. 183–189.

Hasan S. A., Fariduddin Q., Ali B., Hayat B. A., Ahmad A. Cadmium: toxicity and tolerance in plants. *J. Environ. Biol.* 2009. Vol. 30, No 2. P. 165–174.

Hoseini S. M., Zargari F. Cadmium in plants: a review. *IJFAS.* 2013. Vol. 2, No 17. P. 579–581.

Janmohammadi M., Enayati V., Sabaghnia N. Impact of cold acclimation, de-acclimation and re-acclimation on carbohydrate content and antioxidant enzyme activities in spring and winter wheat. *Icel. Agric. Sci.* 2012. Vol. 25, No 1. P. 3–11.

Klíma M., Vítámvás P., Selenková S., Vyvadilová M., Prášil I. T. Dehydrin and proline content in *Brassica napus* and *B. carinata* under cold stress at two irradiances. *Biol. Plant.* 2012. Vol. 56, No 1. P. 57–61.

Kowalska I. Effect of sulphate level in the nutrient solution on plant growth and sulphur content in tomato plant. *Folia Hort.* 2005. Vol. 17, No 1. P. 91–100.

Lee S. H., Singh A. D., Chung G. C., Ahn S. J., Noh E. K., Stendie E. Exposure of roots of cucumber (*Cucumis sativus*) to low temperature severely reduced root pressure, hydraulic conductivity and active transport of nutrients. *Physiol. Plant.* 2004. Vol. 120, No 3. P. 413–422.

Lichenthaler H. K. Chlorophylls and carotenoids – pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods enzymol.* 1987. Vol. 148. P. 350–382.

Lichtenthaler H. K., Wellburn A. L. Determination of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 1983. Vol. 11, No 5. P. 591–593.

Lu C. M., Qiu N. W., Wang B. C., Zhang J. H. Salinity treatment shows no effects on photosystem II photochemistry, but increases the resistance of photosystem II to heat stress in halophyte *Suaeda salsa*. *J. Exp. Bot.* 2003. Vol. 54, No 383. P. 851–860.

Ma L. J., Yu C. M., Li X. M., Li Y. Y., Wang L. L., Ma C. Y., Tao S. Y., Bu N. Pretreatment with NaCl induced tolerance of rice seedlings to subsequent Cd or Cd+NaCl stress. *Biol. plantarum.* 2012. Vol. 57, No 3. P. 567–570.

Mahadjan S., Tuteja N. Cold, salinity and drought stresses. *Arch. Biochem. Biophys.* 2005. Vol. 444, No 2. P. 139–158.

Martzner S., Comstock J. The temperature dependence of shoot hydraulic resistance: implications for stomatal behavior and hydraulic limitation. *Plant. Cell. Environ.* 2001. Vol. 24, No 12. P. 1299–1307.

Melkonian J., Yu L. -X., Setter T. L. Chilling responses of maize (*Zea mays* L.) seedlings: root hydraulic conductance, abscisic acid, and stomatal conductance. *J. Exp. Bot.* 2004. Vol. 55, No 403. P. 1751–1760.

Péres-López D., Gijón M. C., Martino J., Moriana A. Water relation response to soil chilling of six olive (*Olea europaea* L.) cultivars with different frost resistance. *SJAR.* 2010. Vol. 8, No 3. P. 780–789.

Prasad S. M., Dwivedi R., Zeeshan M., Singh R. UV-B and cadmium induced changes in pigments, photosynthetic electron transfer activity, antioxidant levels and antioxidative enzyme of *Riccia* sp. *Acta Physiol. Plant.* 2004. Vol. 26, No 4. P. 423–430.

Reynolds M. P., Mujeeb-Kasi A., Sawkins M. Prospects for utilizing plant-adaptive mechanisms to improve wheat and other crops in drought- and salinity-prone environment. *Ann. Appl. Biol.* 2005. Vol. 146, No 2. P. 239–259.

Ruelland E., Zachowski A. How plants sense temperature. *Environ. Exp. Bot.* 2010. Vol. 69, No 3. P. 225–232.

Streb P., Aubert S., Gout El., Feierabend J., Bligny R. Cross tolerance to heavy-metal and cold-induced

photoinhibition in leaves of *Pisum sativum* acclimated to low temperature. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2008. Vol. 14, No 3. P. 185–193.

Theocharis A., Clément Ch., Barka E. A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperature. *Planta.* 2012. Vol. 235, No 6. P. 1091–110.

Tran T. A., Popova L. P. Function and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. *Turk. J. Bot.* 2013. Vol. 37, No 1. P. 1–13.

Uraguchi S., Mori S., Kuramata M., Kawasaki A., Arai T., Ishikawa S. Root-to-shoot Cd translocation via the xylem is the major process determining shoot and grain cadmium accumulation in rice. *J. Exp. Bot.* 2009. Vol. 60, No 9. P. 2677–2688.

Vassilev A., Berova M., Zlatev Z. Influence of Cd²⁺ on growth, chlorophyll content, and water relations in young barley plants. *Biol. Plant.* 1998. Vol. 41, No 4. P. 601–606.

Verslues P. E., Agarwal M., Katiyar-Agarwal S., Zhu J., Zhu J.-K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that effects plant water status. *Plant J.* 2006. Vol. 45, No 4. P. 523–539.

Wang Y., Jiang X., Li K., Wu M., Zhang R., Zhang L., Chen G. Photosynthetic responses of *Oryza sativa* L., seedlings to cadmium stress: physiological, biochemical and ultrastructural analyses. *Biometals.* 2014. Vol. 27, No 2. P. 389–401.

Wilkinson S., Clephan A. L., Davies W. J. Rapid low temperature-induced stomatal closure occurs in cold-tolerant *Commelina communis* leaves but not in cold sensitive tobacco leaves, via a mechanism that involves apoplastic calcium but not abscisic acid. *Plant Physiol.* 2001. Vol. 126, No 4. P. 1566–1578.

Yu X., Peng Y. H., Zhang M. H., Shao Y. J., Su W. A., Tang Z. C. Water relations and an expression analysis of plasma membrane intrinsic proteins in sensitive and tolerant rice during chilling and recovery. *Cell Research.* 2006. Vol. 16, No 6. P. 599–608.

Received September 15, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Венжик Юлия Валерьевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии
Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: Jul. Venzhik@gmail.com
тел.: (8142) 762712, +79114021131

Титов Александр Федорович

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

CONTRIBUTORS:

Venzhik, Yulia

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910
Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: Jul. Venzhik@gmail.com
tel.: (8142) 762712, +79114021131

Titov, Alexandr

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

Холопцева Екатерина Станиславовна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии
Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
тел.: (8142) 762712

Таланова Вера Викторовна

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

Kholoptseva, Ekaterina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
tel.: (8142) 762712

Talanova, Vera

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

УДК 582.475:630*322.4:630*160.22

СОДЕРЖАНИЕ АЗОТА, БОРА И АМИНОКИСЛОТ В ХВОЕ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ ПРИ РЕГУЛЯЦИИ АЗОТНОГО И БОРНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ

Н. П. Чернобровкина, Е. В. Робонен

Институт леса Карельского научного центра РАН

Исследовано содержание азота, бора и свободных аминокислот в хвое сеянцев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в связи с различным обеспечением азотом и бором. Выявлены особенности взаимного влияния азота и бора на аминокислотный состав хвои. Содержание бора в хвое сеянцев повышалось в соответствии с дозами борной кислоты, внесение азота снижало уровень бора в хвое. Высокая доза азота и оптимальная бора повышали содержание общего, белкового азота и суммы свободных аминокислот в хвое. При внесении азота на трех фонах борного обеспечения повышался уровень преимущественно аргинина, а также орнитина и лизина, в условиях дефицита бора содержание в хвое ОН-лизина, глутаминовой и аспарагиновой кислот, аланина, серина, треонина, пролина и метионина увеличивалось, а в условиях оптимального борного обеспечения – сокращалось. Оптимизация борного питания сеянцев приводила к повышению суммы свободных аминокислот в хвое в условиях низкого фона азота за счет глутамата, аспартата, аланина и ОН-лизина, а в условиях высокого фона азота – преимущественно за счет аргинина. Уровень фенилаланина и тирозина в последнем варианте также повышался, а всех остальных аминокислот – снижался. При высокой дозе борной кислоты на двух фонах азотного питания отмечались снижение или тенденция к снижению содержания всех форм азота и большинства свободных аминокислот в хвое за исключением цистеина на низком и пролина на высоком фоне азотного обеспечения.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris*; сеянцы; азот; бор; аминокислоты.

N. P. Chernobrovkina, E. V. Robonen. NITROGEN, BORON AND AMINO ACID LEVELS IN THE NEEDLES OF SCOTS PINE SEEDLINGS WITH CONTROLLED NITROGEN AND BORON SUPPLY

The content of nitrogen, boron and free amino acids were studied in needles of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings as related to variations in nitrogen and boron availability. Interrelated effects of nitrogen and boron on the amino acid composition in needles were identified. Boron content in needles rose in line with boric acid dosage, and application of nitrogen reduced boron levels in needles. The high nitrogen and the optimal boron doses enlarged the content of total and protein nitrogen and total free amino acids in needles. Nitrogen applications in combination with three different levels of boron availability mainly raised arginine levels, but also promoted the content of ornithine and lysine. The content of OH-lysine, glutamic and aspartic acids, alanine, serine, threonine, proline and methionine in needles increased when boron was deficient, and rose when boron supply was optimal. Optimization of boron nutrition in low nitrogen settings raised total free amino acid content in needles owing to a rise in glutamic and aspartic acids, alanine and OH-lysine,

whereas in high nitrogen settings the rise was mainly owing to arginine. Phenylalanine and tyrosine levels in the latter case also rose, but the levels of the rest of amino acids declined. Application of the high dose of boric acid against two nitrogen backgrounds induced a reduction or a downward trend in the content of all forms of nitrogen and a majority of free amino acids in needles, except for cysteine in a simultaneous low- and proline in a high nitrogen treatment.

Key words: *Pinus sylvestris*; seedlings; nitrogen; boron; amino acids.

Введение

Исследование путей биосинтеза биологически активных веществ в растениях и воздействия на них регулированием различных факторов позволяет модифицировать их состав и количество в растительном сырье. Увеличивая содержание отдельных аминокислот в растениях, можно получить растительный материал с новыми свойствами, повысить питательную ценность полученных из него продуктов, улучшить защиту растений от вредителей [Dudareva et al., 2013]. Древесная зелень, обогащенная аргинином путем регуляции минерального питания хвойных растений, предложена для получения фармацевтических и питательных субстанций [Патент ..., 2014а, б]. Было показано, что высокая доза азота и оптимальная – бора могут в десятки раз повышать содержание аргинина у хвойных растений [Чернобровкина и др., 2010, 2013]. При этом изменяется и количественный состав других аминокислот в хвое. Представляло интерес выявление взаимного влияния азота и бора на аминокислотный состав хвои. Целью данной работы было сравнительное исследование влияния оптимальной и высокой дозы бора на аминокислотный состав хвои сосны обыкновенной в условиях двух фонов азотного питания – низкого и высокого. Исследования в данном направлении необходимы как в целях выявления ответной реакции хвойного растения на воздействие элементов питания, которые являются дефицитными в условиях Фенноскандии, так и для разработки биотехнологии повышения содержания аргинина и других аминокислот

у хвойных растений путем регуляции азотного и борного обеспечения.

Объекты и методы исследований

Объектом исследования были двухлетние сеянцы сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) (450 шт./м²), которые выращивали в лесном питомнике «Вилга», расположенном в южной части Карелии. Супесчаные почвы питомника характеризовались оптимальной для роста хвойных растений кислотностью (рН 5,1). Содержание макро- и микроэлементов составляло: общего азота – 0,12 % от массы сухой почвы, фосфора – 0,45, калия – 0,31, кальция – 0,42, бора – 0,0008, меди – 0,009, марганца – 0,027, цинка – 0,005, кобальта – 44×10^{-4} и молибдена – 4×10^{-5} % от массы сухой почвы.

В мае 2006 года было заложено шесть вариантов опыта (табл. 1). Для каждого варианта выбраны изолированные участки площадью 1,5 м² в трех повторностях. Азот в виде нитрата аммония в дозе 6 г*м⁻² вносили в почву согласно плану эксперимента (см. табл. 1) трижды за период вегетации, за неделю до подкормки сеянцев бором. Бор в виде борной кислоты в дозах 0,1 г*м⁻², 0,3 г*м⁻² и 10 г*м⁻² вносили в первую, вторую декаду июня и во вторую декаду июля. За контроль был принят вариант, в котором азот и бор в почву не вносили.

В течение вегетационного периода проводили рыхление и полив почвы. Спустя неделю после проведения последней подкормки сеянцы отбирали для определения биомассы органов и анализа содержания азота, бора и свободных аминокислот в хвое. Данные по

Таблица 1. Варианты внесения в почву азота и бора

Вариант	NH ₄ NO ₃ , г м ⁻² д. в.	H ₃ BO ₃ , г м ⁻²
Контроль, B0N0	0	0
B0.1N0	0	0,1 *
B10N0	0	10 ***
B0N6	6	0
B0.3N6	6	0,3 **
B10N6	6	10

Примечание. *Оптимальная для роста сеянцев сосны доза борной кислоты на низком фоне азота, **оптимальная доза борной кислоты на высоком фоне азота, ***высокая доза борной кислоты на двух фонах азота.

биомассе сеянцев, на основании которых были выявлены низкие, оптимальные и высокие для роста дозы азота и бора, опубликованы ранее [Чернобровкина и др., 2007]. Хвою фиксировали методом лиофилизации. Анализ элементов минерального питания в почве проводили спектрофотометрическим и пламенно-фотометрическим методами. Общий и белковый азот в хвое определяли методом Кьельдаля, модифицированным для тканей хвойных растений [Новицкая, Чикина, 1980]. Извлечение аминокислот из хвои осуществляли по методу Плешкова [1976]. Очистку экстракта от сахаров проводили на колонке с катионитом (смола КУ-2). Аминокислотный состав хвои определяли с помощью автоматического аминокислотного анализатора ААА-339. В таблице и на рисунках, характеризующих содержание азота, бора и аминокислот в хвое, приведены средние значения из трех биологических повторностей и их стандартные ошибки.

Исследования выполнены с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Аналитическая лаборатория» Института леса КарНЦ РАН.

Результаты

Содержание азота и бора в хвое сеянцев сосны

Содержание общего и белкового азота в хвое сеянцев в расчете на сухой вес в условиях высокого обеспечения азотом было достоверно выше, чем у сеянцев при недостатке азота (табл. 2). На двух фонах азотного питания уровень общего и белкового азота повышался при оптимизации борного обеспечения и снижался или имел тенденцию к снижению при использовании высокой дозы бора. Внесение в почву борной кислоты повышало содержание бора в хвое в соответствии с величинами

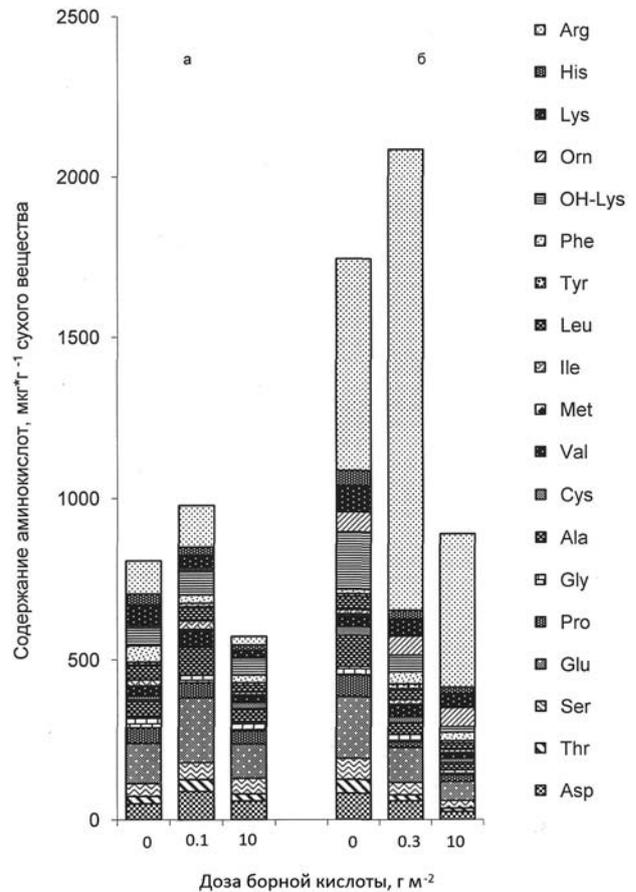


Рис. 1. Содержание свободных аминокислот в хвое сеянцев сосны обыкновенной при различном обеспечении азотом и бором:

а – низкий фон азотного питания, б – высокий

доз. Дополнительное обеспечение азотом снижало уровень бора в хвое, особенно заметно при высокой дозе бора.

Обеспеченность азотом сеянцев и аминокислотный состав хвои

В условиях низкого фона азотного и борного питания (контроль, B0N0) сумма свободных

Таблица 2. Содержание азота и бора в хвое сеянцев сосны обыкновенной в зависимости от азотного и борного обеспечения

Низкий фон азота (0 г м ⁻²)	Доза борной кислоты, г*м ⁻²	0	0,1	10	
	Содержание бора в хвое, мкг*г ⁻¹ сухого вещества		18,3 ± 1,6	36,4 ± 2,8	152,1 ± 12,7
Содержание общего азота в хвое, % от сухого вещества		1,8 ± 0,1	2,2 ± 0,2	1,6 ± 0,1	
Содержание белкового азота в хвое, % от сухого вещества		1,7 ± 0,1	2,0 ± 0,2	1,5 ± 0,1	
Высокий фон азота (6 г м ⁻²)	Доза борной кислоты, г*м ⁻²	0	0,3	10	
	Содержание бора в хвое, мкг*г ⁻¹ сухого вещества		12,3 ± 0,9	29,9 ± 2,3	96,5 ± 8,7
	Содержание общего азота в хвое, % от сухого вещества		2,5 ± 0,2	2,8 ± 0,2	2,3 ± 0,2
	Содержание белкового азота в хвое, % от сухого вещества		2,2 ± 0,2	2,5 ± 0,2	2,1 ± 0,2

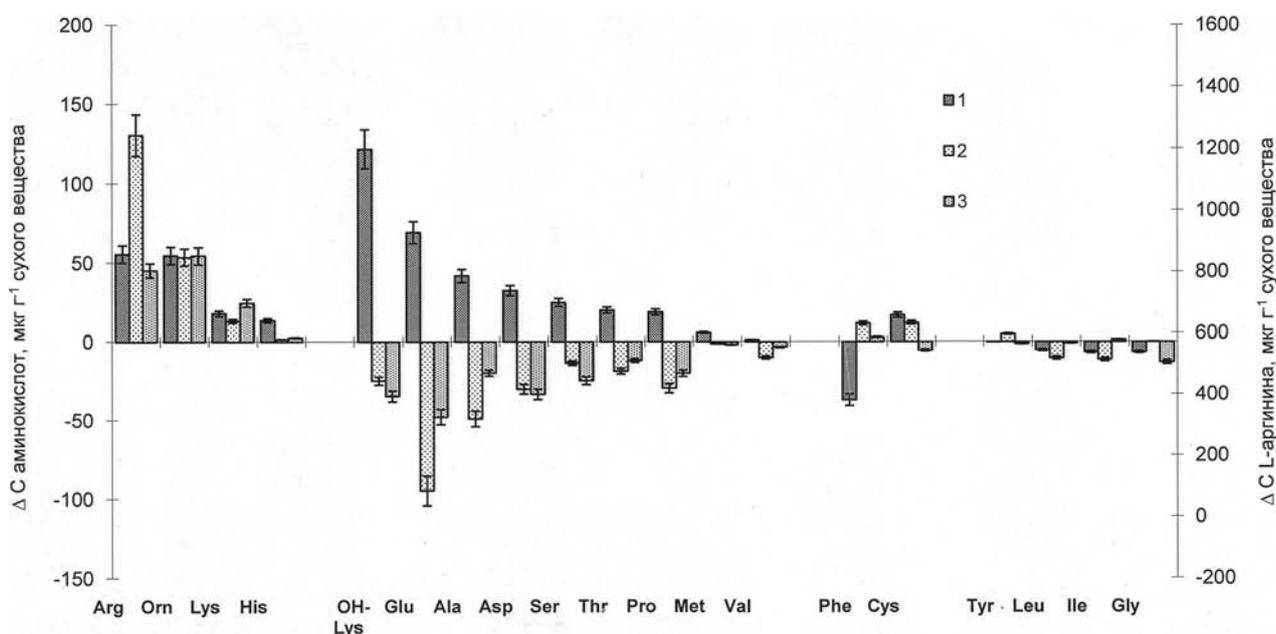


Рис. 2. Разность содержания (ΔC) свободных аминокислот в хвое сеянцев сосны обыкновенной в условиях высокого и низкого фона азотного питания при низком (1), оптимальном (2) и высоком (3) обеспечении бором растений, $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ сухого вещества ($\Delta C = C_{\text{hN}} - C_{\text{IN}}$; где C_{hN} – содержание свободных аминокислот в хвое сеянцев сосны обыкновенной в условиях высокого фона азота; C_{IN} – то же в условиях низкого фона азота)

аминокислот в хвое составила незначительную величину (рис. 1, а). Из 19 свободных аминокислот хвои в наибольшем количестве содержалась глутаминовая кислота. Дополнительное обеспечение сеянцев сосны азотом во всех вариантах борного питания привело к значительному увеличению содержания суммы свободных аминокислот в хвое, преимущественно за счет аргинина. Значительно меньше, но также повышался уровень орнитина и лизина. Уровень аргинина повысился в 6,4; 11,2 и 18,0 раза соответственно в условиях дефицита, оптимума и избытка бора для растений (B0N6/B0N0; B0.3N6/B0.1N0; B10N6/B10N0) (рис. 1, 2). Отмечалась тенденция повышения содержания гистидина.

Характер изменения содержания других аминокислот в хвое под влиянием азотного питания существенно зависел от обеспеченности растений бором. В условиях дефицита бора содержание OH-лизина, глутамата, аспартата, аланина, серина, треонина, пролина, цистеина при высокой обеспеченности азотом (B0N6) было значительно выше, чем при низкой (B0N0) (см. рис. 2). В вариантах с оптимальной и высокой дозами бора содержание этих аминокислот в хвое при внесении азота (B0.3N6; B10N6) снижалось, за исключением цистеина, уровень которого на фоне оптимального борного обеспечения незначительно повышался. Характер зависимости накопления фенилаланина в хвое при внесении в почву азота от уровня

борного питания принципиально отличался от наблюдавшегося для всех других аминокислот. В условиях оптимального и высокого уровней борного питания его содержание при внесении в почву азота (B0.3N6; B10N6) имело тенденцию к увеличению, тогда как при дефиците бора (B0N6) существенно уменьшалось (см. рис. 2). Количество других аминокислот – метионина, валина, тирозина, лейцина, изолейцина и глицина изменялось незначительно или не изменялось под влиянием изменения обеспеченности сеянцев азотом при трех уровнях борного питания.

Обеспеченность бором сеянцев и аминокислотный состав хвои

При оптимизации борного обеспечения сеянцев сосны происходило повышение суммы свободных аминокислот в хвое в условиях низкого (B0N0 → B0.1N0) и высокого (B0N6 → B0.3N6) фонов азотного питания соответственно в 1,21 и 1,19 раза (см. рис. 1). В условиях низкого фона азота (B0N0 → B0.1N0) отмечалась тенденция повышения содержания большей части аминокислот, но уровень лизина, гистидина, фенилаланина, цистеина и глицина снижались (рис. 3, а). В условиях высокого фона азота при оптимизации борного обеспечения (B0N6 → B0.3N6) повышался уровень аргинина (в 1,7 раза), его содержание составило 68 % от суммы свободных аминокислот хвои (рис. 3, б).

Повышался также уровень тирозина и фенилаланина. Содержание большинства свободных аминокислот в хвое понижалось, их сумма за исключением отмеченных трех снижалась в 1,5 раза.

Под воздействием высокой дозы борной кислоты сумма свободных аминокислот в хвое сеянцев в условиях низкого и высокого фона азотного питания снижалась соответственно в 1,4 и 1,7 раза по сравнению с вариантами низкого обеспечения растений бором (B10N0/B0N0 и B10N6/B0N6) и в 1,6 и 1,8 раза по сравнению с вариантами оптимального борного обеспечения (B10N0/B0.1N0 и B10N6/B0.3N6) (см. рис. 1). Учитывая снижение содержания белкового азота в хвое сеянцев этих вариантов (B10N0 и B10N6) по сравнению с вариантами оптимального (B0.1N6 и B0.3N6) и дефицитного (B0N0 и B0N6) обеспечения бором, можно предположить, что происходил распад аминокислот. При высокой дозе борной кислоты по сравнению с вариантом оптимального обеспечения бором сеянцев на двух фонах азота (B0.1N0→B10N0 и B0.3N6→B10N6) отмечались снижение или тенденция к снижению уровня большинства аминокислот в хвое за исключением цистеина и пролина (см. рис. 3). Содержание цистеина в хвое сеянцев низкого фона азотного питания и пролина в хвое сеянцев высокого азотного обеспечения при высокой дозе бора увеличивалось.

Обсуждение результатов

Результаты показали, что влияние азота и бора на аминокислотный состав хвои сеянцев сосны обыкновенной при раздельном или совместном их внесении и в зависимости от доз может существенно отличаться. Сумма свободных аминокислот хвои под воздействием азота возросла преимущественно за счет увеличения содержания аргинина. Известно, что у хвойных растений происходит накопление и запасание аргинина, если количество внесенного в почву азота превышает потребность в нем при дефиците других элементов минерального питания [Чернобровкина и др., 2010, 2013]. Аргинин выполняет запасную функцию азота в хвойных растениях, является подвижной формой этого элемента, позволяющей регулировать содержание его минеральных форм. В зимний период аргинин и пролин выполняют функцию не только запасания азота, но также защищают клеточные мембраны от повреждения морозом [Чернобровкина, 2001; Алаудинова, 2011]. Аргинин может ингибировать гидролиз белков и таким образом

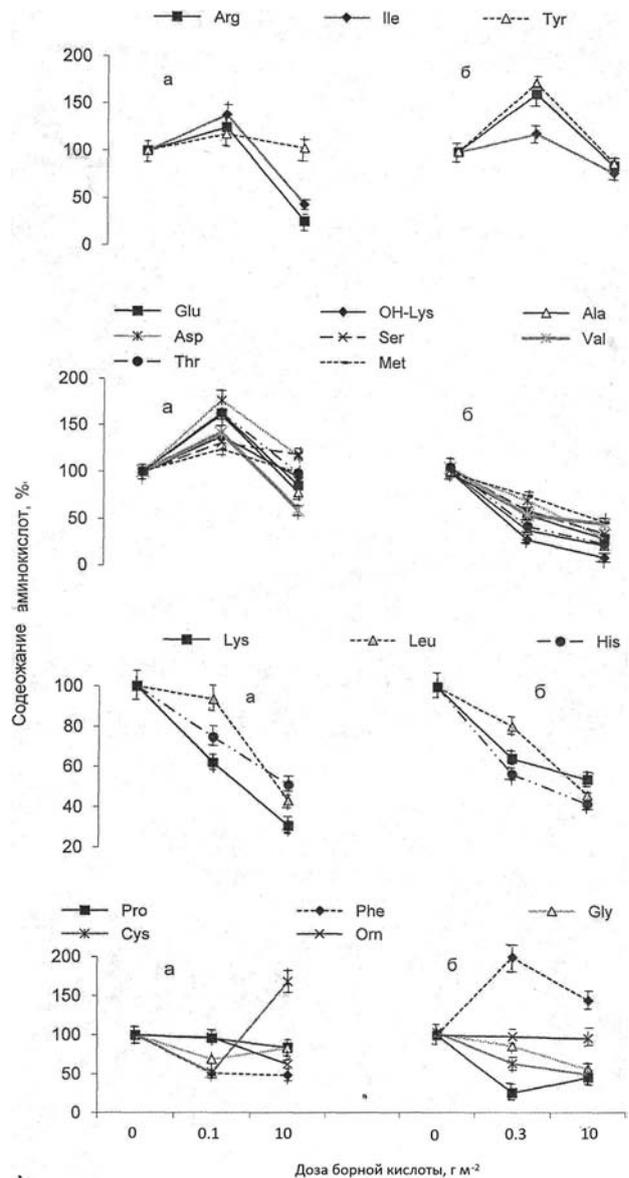


Рис. 3. Содержание свободных аминокислот в хвое сеянцев сосны обыкновенной при различном обеспечении азотом и бором, % от варианта без внесения бора на соответствующем фоне азотного питания:

а – низкий фон азота, б – высокий

способствовать их стабилизации, повышая морозостойкость растений и сохраняя меристемы почек в период глубокого покоя. Запасание аргинина в органах хвойных растений обеспечивает азотом процессы раннего весеннего роста и сезонное развитие дерева. Было показано, что у лиственных древесных растений, в частности у березы повислой (*Betula pendula* var. *pendula*) и карельской березы (*B. pendula* var. *carelica* (Merclin) Hamet Ahti), накопления аргинина в органах под воздействием высоких доз азота не наблюдалось [Шуляковская и др., 2010]. При этом возрастало содержание цитруллина (до 68 % от суммы аминокислот).

Под воздействием высокой дозы азота повышается также содержание аминокислот с высоким уровнем азота в молекуле – орнитина и лизина. Известно, что превращения аргинина и орнитина тесно связаны в орнотиновом цикле [Durzan, 1968]. **Уровень гистидина при воздействии азота** изменяется незначительно, но тенденция изменения аналогична отмеченным выше трем аминокислотам, особенно в условиях дефицита бора.

Повышение содержания большинства свободных аминокислот в хвое сеянцев сосны при внесении азота в условиях дефицита бора можно объяснить накоплением их в процессе биосинтеза, а не гидролиза белков хвои, поскольку при дополнительном обеспечении азотом сеянцев содержание белкового азота в хвое растений всех вариантов обеспеченности бором повышалось. Это может свидетельствовать о том, что снижение уровня отмеченных выше аминокислот в хвое при оптимизации азотного питания в условиях дополнительного обеспечения сеянцев бором происходило в результате стимуляции бором включения их в синтез белков.

Поскольку при оптимизации борного питания сеянцев в условиях двух фонов азота повышалась сумма свободных аминокислот хвои, и при этом происходило повышение содержания белкового азота, можно предположить, что уровень свободных аминокислот в хвое увеличивался в результате их биосинтеза. По-видимому, дополнительное обеспечение бором хвойных растений стимулировало синтез аминокислот и белков в хвое. При оптимизации борного питания сахарной свеклы отмечались активация использования аминокислот в процессе синтеза белков и других органических соединений в листьях, а также усиление оттока аминокислот в корни [Школьник, 1974]. При недостатке бора у растений отмечается снижение содержания белка, повышение количества небелкового азота, накопление аммиачного азота [Борщенко, 1970; Школьник, 1974].

Учитывая то, что в условиях высокого азотного обеспечения оптимизация борного питания сеянцев сосны повышала содержание фенилаланина в хвое, можно предположить, что бор стимулировал накопление этой аминокислоты и включение ее, возможно, в фенольные соединения. Известно, что у растений фенилаланин является предшественником в биосинтезе фенольных соединений – коричневой и кумаровой кислот [Neish, 1964]. Оптимизация борного питания сеянцев сосны повышала содержание фенолов в хвое и устойчивость растений к фацидиозу [Ялынская, Чернобровкина,

2008]. Происходило повышение также уровня тирозина. Было установлено, что у растений аминокислотная группа тирозина используется при биосинтезе фенилаланина из фенилпирувата по альтернативному пути [Yoo et al., 2013].

Повышение уровня цистеина и пролина, возможно, является ответной защитной реакцией растений на воздействие высокой дозы бора. Известно, что цистеин входит в состав лигандов – фитохелатинов и металлотионеинов, участвующих в детоксикации тяжелых металлов в результате образования с ними хелатов [Clements, Palmgren, 2002; Haydon, Cobbett, 2007]. Цистеин составляет 30 % от входящих в состав металлотионеинов аминокислот [Hamer, 1986; Robinson et al., 1993]. **Механизм действия** отмеченных лигандов заключается в связывании тяжелых металлов сульфгидрильными группами цистеина [Grill et al., 1985; Zenk, 1996]. Цистеин входит в состав пептида глутатиона, который способен образовывать стабильные комплексы с металлами и является предшественником при биосинтезе фитохелатинов [Zhu et al., 1999; Cobbett, 2000]. **Наряду с различными способами детоксикации** тяжелых металлов растениями [Титов и др., 2007] связывание металлов фитохелатинами является наиболее важным неспецифическим механизмом их детоксикации [Серегин, 2001; Clements, Simm, 2003]. Наши данные позволяют предположить, что накопление цистеина в хвое при высокой концентрации бора в сеянцах сосны является адаптационной реакцией хвойного растения на токсичное влияние бора. Возможно, механизмы детоксикации высокого содержания бора и тяжелых металлов у растений имеют определенную аналогию.

Пролин может накапливаться и выполнять защитные функции у растений в стрессовых ситуациях [Бритиков, 1975; Бирюкова, 1986; Судачкова, 1998]. Считается, что содержание свободного пролина у сосны является хорошим биохимическим маркером состояния растения, информируя о его реакции на засуху, готовность к зимнему периоду, предрасположенность к заселению насекомыми-фитофагами, а в целом – о степени отклонения условий существования растений от оптимума. Содержание свободного пролина предложено в качестве критерия устойчивости организма к стрессовым условиям для использования при биомониторинге. Однако не всегда уровень пролина бывает повышенным в органах древесных растений при неблагоприятных и стрессовых условиях существования. Так, повышенное содержание пролина в органах сосны в определенные фенофазы объясняется

полифункциональностью этой аминокислоты [Судачкова, 1998]. Известно, что большие количества свободного пролина накапливаются в локальных участках на узком отрезке онтогенеза накануне ростовых или метаболически активных процессов, например, в точках роста, где он быстро расходуется [Бритиков, 1975]. В почках березы карельской в октябре, при подготовке к зимнему периоду, отмечается относительно высокое содержание свободного пролина, а в январе, в самый неблагоприятный по климатическим условиям период года, уровень аминокислоты понижается и вновь повышается в апреле, перед распусканием почек [Чернобровкина, 2001]. В почках березы карельской наблюдается аналогичная динамика фитогормонов, в том числе ингибитора терпеноидной природы – АБК. Предполагается, что в механизме накопления свободного пролина в клетках растений участвует АБК [Таланова и др., 1999]. Считается при этом, что аккумуляция свободного пролина в ответ на воздействие стрессовых факторов связана с активизацией неспецифических адаптивных механизмов в клетках и тканях. Накопления пролина в хвое сеянцев низкого азотного обеспечения при высокой дозе бора не происходило, возможно, в связи с тем, что избыток бора был значительным. При этом накопилась серосодержащая аминокислота – цистеин.

Заключение

Содержание общего, белкового азота и суммы свободных аминокислот в хвое в июле, в период активного роста растений, увеличивалось при высоком уровне азотного питания сеянцев в условиях трех фонов борного обеспечения, а также при оптимизации борного питания сеянцев в условиях двух фонов азота. Содержание бора в хвое сеянцев сосны обыкновенной повышалось в соответствии с дозами борной кислоты, внесение азота снижало уровень бора в хвое.

Влияние азота и бора на аминокислотный состав хвои сеянцев сосны обыкновенной при отдельном или совместном их внесении и в зависимости от доз может существенно отличаться. Сумма свободных аминокислот хвои под воздействием азота возросла преимущественно за счет увеличения содержания аргинина. Дополнительное обеспечение сеянцев азотом оказало противоположное влияние на содержание в хвое отдельных аминокислот в зависимости от обеспеченности бором. При внесении азота в условиях дефицита бора содержание в хвое ОН-лизина, глутамата,

аспартата, аланина, серина, треонина, пролина и метионина увеличивалось, а при оптимальном борном обеспечении – сокращалось.

При оптимизации борного питания сеянцев повышение суммы свободных аминокислот в хвое произошло в условиях низкого фона азота в результате повышения уровня преимущественно глутаминовой и аспарагиновой кислот, аланина и ОН-лизина, а в условиях высокого азотного питания – за счет аргинина, в то время как содержание большинства аминокислот при этом снижалось. В связи с тем, что при оптимизации борного питания сеянцев фенилаланин накапливался в хвое в условиях высокого фона азота и снижался в условиях низкого азотного обеспечения, предполагается, что бор стимулировал его синтез и включение в органические соединения, возможно фенольные. При высокой дозе борной кислоты в условиях двух фонов азотного питания отмечалось снижение или тенденция к снижению содержания всех форм азота и большинства свободных аминокислот в хвое, за исключением цистеина на низком и пролина на высоком фонах азота. Накопление этих аминокислот в хвое при высокой дозе бора, очевидно, связано с неспецифической защитной реакцией хвойных растений в ответ на токсичное влияние борной кислоты.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований ОБН РАН «Биологические ресурсы России: динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий» в рамках проекта № 01201257867 и бюджетной темы № гос. регистр. 01201353234.

Литература

Алаудинова Е. В. Экологические особенности низкотемпературной адаптации лесообразующих хвойных видов Сибири: структурно-химические изменения меристем почек: дис. ... докт. биол. наук. Красноярск, 2011. С. 160–171.

Бирюкова З. П. Свободный пролин как показатель физиологического состояния сосны обыкновенной // Физиология растений. 1986. Т. 33, вып. 5. С. 1027–1030.

Борщенко Г. П. Белоксинтезирующая система корней гороха при борной недостаточности // В кн.: Физиологическая роль микроэлементов у растений. Л.: Наука, 1970. С. 61–71.

Бритиков Е. А. Биологическая роль пролина. М.: Наука, 1975. 88 с.

Новицкая Ю. Е., Чикина П. Ф. Азотный обмен у сосны на Севере. Л.: Наука, 1980. 166 с.

Патент РФ № 2515015/12.03.2014а.
 Патент РФ № 2540354/18.12.2014б.
 Плешков Б. П. Практикум по биохимии растений. М.: Колос, 1976. 256 с.
 Серегин И. В. Фитохелатины и их роль в детоксикации кадмия у высших растений // Успехи биол. химии. 2001. Т. 41. С. 283–300.
 Судачкова Н. Е. Состояние и перспективы изучения влияния стрессов на древесные растения // Лесоведение. 1998. № 2. С. 3–9.
 Таланова В. В., Титов А. Ф., Боева Н. П. Влияние ионов кадмия и свинца на рост и содержание пролина и АБК в проростках огурца // Физиология растений. 1999. Т. 46, № 1. С. 164–167.
 Титов А. Ф., Таланова В. В., Казнина Н. М., Лайдинен Г. Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам / Ред. Н. Н. Немова. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. 172 с.
 Чернобровкина Н. П. Экофизиологическая характеристика использования азота сосной обыкновенной. СПб.: Наука, 2001. 175 с.
 Чернобровкина Н. П., Робонен Е. В., Иготти С. А. и др. Влияние обеспеченности бором на рост семян сосны обыкновенной // Лесоведение. 2007. № 5. С. 69–76.
 Чернобровкина Н. П., Робонен Е. В., Зайцева М. И. Накопление L-аргинина в хвое сосны обыкновенной при регуляции азотного и борного обеспечения // Химия растительного сырья. 2010. № 3. С. 71–75.
 Чернобровкина Н. П., Робонен Е. В., Морозов А. К., Макарова Т. Н. Накопление L-аргинина в хвое ели европейской при регуляции азотного и борного обеспечения // Труды КарНЦ РАН. 2013. № 3. С. 159–165.
 Школьник М. Я. Микроэлементы в жизни растений. Л.: Наука, 1974. 324 с.
 Шуляковская Т. А., Репин А. В., Шредерс С. М. Влияние подкормок азотом на развитие саженцев березы повислой и карельской березы // Вестник МГУЛ – Лесной вестник. 2010. № 1. С. 9–13.
 Ялынская Е. Е., Чернобровкина Н. П. Устойчивость семян сосны обыкновенной к снежному шютте как интегральный показатель функциональной диагностики обеспеченности бором // Вестник МГУЛ – Лесной вестник. 2008. № 6 (63). С. 16–21.

References

Alaudinova E. V. Ekologicheskie osobennosti nizkotemperaturnoi adaptatsii lesoobrazuyushchikh khvoinykh vidov Sibiri: strukturno-khimicheskie izmeneniya meristem pochek [Ecological features of low-temperature adaptation of forest-forming coniferous species in Siberia: structural and chemical changes in bud meristems]: PhD. Diss. (Biol.). Krasnoyarsk, 2011. P. 160–171.
 Biryukova Z. P. Svobodnyi prolin kak pokazatel' fiziologicheskogo sostoyaniya sosny obyknovnoy [Free proline as an indicator of physiological status of Scots

Clements S., Palmgren M. G. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation // Trends Plant Sci. 2002. Vol. 7, No. 7. P. 309–315.
 Clements S., Simm C. Schizosaccharomyces pombe as model for metal homeostasis in plant cells: the phytochelatin-dependent pathway is the main cadmium detoxification mechanism // New Phytol. 2003. Vol. 159. P. 244–276.
 Cobbett C. S. Phytocyclatins and their roles in heavy metal detoxification // Plant Physiol. 2000. Vol. 123. P. 825–832.
 Dudareva N., Klempien A., Muhlemann J. K., Kaplan I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds // New Phytologist. 2013. Vol. 198 P. 16–32. doi: 10.1111/nph.12145.
 Durzan D. I. Nitrogen metabolism of Picea glauca. I. Seasonal changes of free amino acids in buds, shoots, apices and leaves and the metabolism of uniformly labeled C-1-arginine by buds during the onset of dormancy // Canad. J. Bot. 1968. Vol. 46, No 7. P. 909–919.
 Grill E., Winnacker E. L., Zenk M. Phytocyclatins: The principal heavy metal complexing peptides of higher plants // Science. 1985. Vol. 230. P. 674–676.
 Hamer D. N. Metallothioneins // Annu. Rev. Biochem. 1986. Vol. 55. P. 913–951.
 Haydon M. J., Cobbett C. S. Transporters of ligands for essential metal ions in plants // New Phytol. 2007. Vol. 174. P. 499–506.
 Neish A. C. Biochemistry of Phenolic Compounds. New York: Academic Press, 1964. 234 p.
 Robinson B. H., Evans I. M., Cheeks C., Jackson P. J. Plant metallothioneins // Biochem. J. 1993. Vol. 295. P. 1–10.
 Yoo H., Widhalm J. R., Qian Y. et al. An alternative pathway contributes to phenylalanine biosynthesis in plants via a cytosolic tyrosine: phenylpyruvate aminotransferase. Nat. Commun. 2013. 4: 2833 doi: 10.1038/ncomms3833.
 Zenk M. H. Heavy metal detoxication in higher plants – a review // Gene. 1996. Vol. 179. P. 21–30.
 Zhu Y. L., Pilon-Smits E. A. H., Tarun A. S. et al. Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance // Plant Physiol. 1999. Vol. 119. P. 73–79.

Поступила в редакцию 26.06.2015

pine]. Fiziologiya rastenii [Russ. J. Plant Physiol.]. 1986. Vol. 33, iss. 5. P. 1027–1030.
 Borshchenko G. P. Belok sinteziruyushchaya sistema kornei gorokha pri bornoi nedostatocnosti [A protein-synthesizing system derived from roots of boron-deficient pea plants]. Fiziologicheskaya rol' mikroelementov u rastenii [Physiological role of microelements in plants]. Leningrad: Nauka, 1970. P. 61–71.
 Britikov E. A. Biologicheskaya rol' prolina [Biological role of proline]. Moscow: Nauka, 1975. 88 p.
 Chernobrovkina N. P. Ekofiziologicheskaya kharakteristika ispol'zovaniya azota sosnoi obyknovnoy

[Ecophysiological characteristics of nitrogen utilization by Scots pine]. St. Petersburg: Nauka, 2001. 175 p.

Chernobrovkina N. P., Robonen E. V., Igotti S. A., Dorofeeva O. S., Shengelia I. D. Vliyanie obespechenosti borom na rost seyantsev sosny obyknovnoy [Effect of boron supply on growth of Scots pine seedlings]. *Lesovedenie [Russ. J. Forest Sci.]*. 2007. No 5. P. 69–76.

Chernobrovkina N. P., Robonen E. V., Zaitseva M. I. Nakoplenie L-arginina v khvoe sosny obyknovnoy pri regulyatsii azotnogo i bornogo obespecheniya [Accumulation of L-arginine in needles of Norway spruce with regulated nitrogen and boron availability]. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya [Chemistry of plant raw material]*. 2010. No 3. P. 71–75.

Chernobrovkina N. P., Robonen E. V., Morozov A. K., Makarova T. N. Nakoplenie L-arginina v khvoe eli evropeiskoi pri regulyatsii azotnogo i bornogo obespecheniya [Accumulation of L-arginine in needles of Norway spruce with regulated nitrogen and boron availability]. *Trudy KarNTs RAN [Transactions of KarRC RAS]*. 2013. No 3. P. 159–165.

Novitskaya Yu. E., Chikina P. F. Azotnyi obmen u sosny na Severe [Nitrogen metabolism in pine in the North]. Leningrad: Nauka, 1980. 166 p.

Patent RF No 2515015/12.03.2014a [Russian patent No 2515015/12.03.2014a].

Patent RF No 2540354/18.12.2014b [Russian patent No 2540354/18.12.2014b].

Pleshkov B. P. Praktikum po biokhimmii rastenii [Practicum in plant biochemistry]. Moscow: Kolos, 1976. 256 p.

Seregin I. V. Fitokhelatiny i ikh rol' v detoksikatsii kadmiya u vysshikh rastenii [Phytochelatin and their role in cadmium detoxification in higher plants]. *Uspekhi biol. khimii [Biochem. (MOW.). Spec. Iss. Biol. Chem. Reviews]*. 2001. Vol. 41. P. 283–300.

Shkol'nik M. Ya. Mikroelementy v zhizni rastenii [Microelements in plant life]. Leningrad: Nauka, 1974. 324 p.

Shulyakovskaya T. A., Repin A. V., Shreders S. M. Vliyanie podkormok azotom na razvitie sazhentsev berezy povislnoi i karel'skoi berezy [Effect of nitrogen fertilization on the development of silver birch and curly birch saplings]. *Vestnik MGUL – Lesnoi vestnik [Moscow State Forest University Bulletin]*. 2010. No 1. P. 9–13.

Sudachkova N. E. Sostoyanie i perspektivy izucheniya vliyaniya stressov na drevesnye rasteniya [Status and prospects of studying the effects of stress on woody plants]. *Lesovedenie [Russ. J. Forest Sci.]*. 1998. No 2. P. 3–9.

Talanova V. V., Titov A. F., Boeva N. P. Vliyanie ionov kadmiya i svintsya na rost i sodержanie prolina i ABK v prorstkakh ogurtsa [The effect of cadmium and lead ions on growth and proline and abscisic acid contents in cucumber seedlings]. *Fiziologiya rastenii [Russ. J. Plant Physiol.]*. 1999. Vol. 46, No 1. P. 164–167.

Titov A. F., Talanova V. V., Kaznina N. M., Laidinen G. F. Ustoichivost' rastenii k tyazhelym metallam

[Resistance of plants to heavy metals]. Ed. N. N. Nemovala. Petrozavodsk: KarRC of RAS, 2007. 172 p.

Yalynskaya E. E., Chernobrovkina N. P. Ustoichivost' seyantsev sosny obyknovnoy k snezhnomu shyutte kak integral'nyi pokazatel' funktsional'noi diagnostiki obespechenosti borom [Snow blight resistance of Scots pine seedlings as an integral indicator for functional diagnostics of boron sufficiency]. *Vestnik MGUL – Lesnoi vestnik [Moscow State Forest University Bulletin]*. 2008. No 6 (63). P. 16–21.

Clements S., Palmgren M. G. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci.* 2002. Vol. 7, No 7. P. 309–315.

Clements S., Simm C. Schizosaccharomyces pombe as model for metal homeostasis in plant cells: the phytochelatin-dependent pathway is the main cadmium detoxification mechanism. *New Phytol.* 2003. Vol. 159. P. 244–276.

Cobbett C. S. Phitochelatin and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* 2000. Vol. 123. P. 825–832.

Dudareva N., Klempien A., Muhlemann J. K., Kaplan I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist.* 2013. Vol. 198. P. 16–32. doi: 10.1111/nph.12145.

Durzan D. I. Nitrogen metabolism of Picea glauca. I. Seasonal changes of free amino acids in buds, shoots, apices and leaves and the metabolism of uniformly labeled C-1-arginine by buds during the onset of dormancy. *Canad. J. Bot.* 1968. Vol. 46, No 7. P. 909–919.

Grill E., Winnacker E. L., Zenk M. Phytochelatin: The principal heavy metal complexing peptides of higher plants. *Science.* 1985. Vol. 230. P. 674–676.

Hamer D. N. Metallothioneins. *Annu. Rev. Biochem.* 1986. Vol. 55. P. 913–951.

Haydon M. J., Cobbett C. S. Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytol.* 2007. Vol. 174. P. 499–506.

Neish A. C. Biochemistry of Phenolic Compounds. New York: Academic Press, 1964. 234 p.

Robinson B. H., Evans I. M., Cheeks C., Jackson P. J. Plant metallothioneins. *Biochem. J.* 1993. Vol. 295. P. 1–10.

Yoo H., Widhalm J. R., Qian Y., Maeda H., Cooper B. R., Jannasch A. S., Gonda I., Lewinsohn E., Rhodes D., Dudareva N. An alternative pathway contributes to phenylalanine biosynthesis in plants via a cytosolic tyrosine: phenylpyruvate aminotransferase. *Nat. Commun.* 2013. 4: 2833 doi: 10.1038/ncomms3833.

Zenk M. H. Heavy metal detoxication in higher plants – a review. *Gene.* 1996. Vol. 179. P. 21–30.

Zhu Y. L., Pilon-Smits E. A. H., Tarun A. S., Jouanin L., Terry N. Over-expression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol.* 1999. Vol. 119. P. 73–79.

Received June 26, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Чернобровкина Надежда Петровна

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

Робонен Елена Вильямовна

ведущий физик
Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: er51@bk.ru
тел.: (8142) 768160

CONTRIBUTORS:

Chernobrovkina, Nadezhda

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

Robonen, Elena

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk
Karelia, Russia
e-mail: er51@bk.ru
tel.: (8142) 768160

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ И ВЫСОКИХ ЗАКАЛИВАЮЩИХ И ПОВРЕЖДАЮЩИХ ТЕМПЕРАТУР НА УРОВЕНЬ ТРАНСКРИПТОВ ГЕНА *BI-1* У ПШЕНИЦЫ

Л. В. Топчиева, В. В. Таланова, А. Ф. Титов, И. А. Нилова,
Н. С. Репкина, Ю. В. Венжик

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Изучена динамика содержания транскриптов антиапоптотического гена *BI-1* у растений озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39 при воздействии низких (4 и -2 °C) и высоких (37 и 43 °C) закаливающих и повреждающих температур. Показано, что под влиянием низкой закаливающей температуры (4 °C) происходит постепенное повышение холодоустойчивости листьев проростков, сопровождающееся в начальный период накоплением транскриптов гена *BI-1*. При повреждающей температуре (-2 °C) холодоустойчивость клеток и уровень мРНК гена *BI-1*, напротив, снижаются. Воздействие высокой закаливающей температуры (37 °C) приводило к повышению теплоустойчивости проростков вплоть до окончания эксперимента (третьи сутки). Содержание транскриптов гена *BI-1* в листьях при этом значительно возрастало уже в начальный период теплового воздействия, а в дальнейшем сохранялось практически неизменным. При действии на проростки высокой повреждающей температуры (43 °C) первоначально происходил быстрый рост их теплоустойчивости и многократное повышение содержания транскриптов гена *BI-1* в листьях, которые затем сменялись резким снижением этих показателей. На основании анализа холодо- и теплоустойчивости, а также уровня транскриптов гена *BI-1* в клетках листьев пшеницы сделан вывод, что разные по интенсивности и характеру воздействия на растения (закаливающее и повреждающее) низкие и высокие температуры вызывают неодинаковые как в количественном, так и в качественном отношении изменения не только в их устойчивости, но и сопровождаются различными изменениями в экспрессии гена антиапоптотического белка *BI-1*.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L.; низкие и высокие температуры; устойчивость; экспрессия гена *BI-1*; программируемая клеточная смерть.

L. V. Topchieva, V. V. Talanova, A. F. Titov, I. A. Nilova, N. S. Repkina, Yu. V. Venzhik. EFFECT OF LOW AND HIGH HARDENING AND DAMAGING TEMPERATURES ON THE TRANSCRIPTION LEVEL OF *BI-1* GENE IN WHEAT

The dynamics of transcripts of anti-apoptotic *BI-1* gene in wheat plants (*Triticum aestivum* L.) of cv. Moscovskaya 39 subjected to low (4 and -2 °C) and high (37 and 43 °C) hardening and damaging temperatures was studied. It was shown that cold tolerance in plants was raised under the impact of low hardening temperature (4 °C), accompanied in the initial stage by the accumulation of transcripts of *BI-1* gene. In contrast, cold tolerance and *BI-1* mRNA level decreased under the impact of low damaging temperature

(-2 °C). The impact of high hardening temperature resulted in an increase of thermal stability of plants until the end of the experiment (the 3rd day). The content of *BI-1* transcripts rose significantly under the same conditions in the initial period of exposure and then remained unchanged. The influence of high damaging temperature (43 °C) led to a rapid increase in plant thermotolerance and the expression level of *BI-1* gene in the initial period of exposure, followed by a sharp decline of these indicators. The data obtained suggest that thermotolerance in plants can vary not only quantitatively and qualitatively, but the expression of anti-apoptotic *BI-1* gene changes differently as well, depending on the nature (low or high) and intensity (hardening or damaging) of temperatures.

Key words: *Triticum aestivum* L.; low and high temperatures; tolerance; expression of *BI-1* gene; programmed cell death.

Введение

В процессе эволюции у растений сформировалось большое количество разнообразных механизмов защиты от воздействия неблагоприятных факторов среды; один из них связан с системой клеточного контроля качества белка. Считается, что эта система играет важную роль в способности клеток и растения в целом адаптироваться в стрессовых условиях, и поэтому в последнее время ей уделяется особое внимание [Liu, Howell, 2010]. Система контроля качества белка очень чувствительна к действию таких биотических и абиотических факторов среды, как патогены, тепловое воздействие, засоление. При стрессовых воздействиях в клетках растений могут накапливаться неправильно синтезированные, несвернутые или неправильно свернутые белки. При этом эндоплазматический ретикулум (ЭР) может испытывать значительную перегрузку, которая усугубляется еще и тем, что в неблагоприятных условиях усиливается синтез стрессовых белков, значительная часть которых являются секреторными. Указанные процессы способствуют снижению эффективности работы системы контроля качества белка в ЭР и развитию так называемого стресса эндоплазматического ретикулума (ЭР-стресс) [Liu, Howell, 2010]. В клетках животных и растений существует механизм защиты от ЭР-стресса, названный «ответ на неупакованные белки» (UPR – unfolded protein response). Он заключается в ограничении поступления новых белков в полость ЭР, перемещении из ЭР в цитоплазму дефектных белков и последующей их деградации. Однако если этот механизм оказывается недостаточным для преодоления ЭР-стресса, в клетке могут развиваться последовательно идущие реакции, приводящие к программируемой клеточной смерти (ПКС). Установлено, что под влиянием неблагоприятных факторов среды в растениях активизируются процессы, которые могут привести к гибели клеток. Как и у животных, этот процесс может

носить организованный характер (ПКС) или осуществляться хаотично, приводя к некрозу. ПКС растений по некоторым морфологическим и биохимическим признакам напоминает апоптоз клеток животного происхождения, в связи с чем в последнее время принято обозначать этот вид разрушения растительных клеток как апоптозоподобная гибель [Ванюшин, 2001]. ПКС в растениях можно наблюдать при ксилогенезе, дифференциации ситовидных элементов флоэмы, деградации алейроновых зерен и старении [Ванюшин, 2001]. Развитие реакции сверхчувствительности (СВЧ) клеток в ответ на заражение патогенными микроорганизмами также сопровождается отмиранием клеток в очаге повреждения. Появляется все больше работ, в которых показано, что ПКС является неотъемлемым элементом при формировании ответа растений на действие различных абиотических факторов, в том числе низких положительных и отрицательных температур [Любушкина и др., 2010], высоких температур [Balk et al., 1999].

В регуляции ЭР-зависимой ПКС, наряду с другими белками, такими как BiP, GRP94, участвует белок Вах ингибитор (BI-1) [Liu, Howell, 2010], локализованный в мембране ЭР клеток млекопитающих и растений. Название данного белка основывается на его способности ингибировать гибель клеток, вызванную повышением активности апоптотического белка Вах при развитии окислительного стресса в клетках животных и трансгенных по этому гену растений [Watanabe, Lam, 2009]. Экспрессия гена *BI-1* в растениях, в частности у *Arabidopsis thaliana*, может индуцироваться различными факторами через UPR сигнальный путь до появления видимых признаков гибели клеток [Watanabe, Lam, 2008]. Данные литературы свидетельствуют о защитной роли белка BI-1 в устойчивости растений к ЭР-стрессу, возникающему в растениях в ответ на неблагоприятные воздействия [Watanabe, Lam, 2009]. Например, в экспериментах с трансгенными

Характеристика праймеров и их последовательность

Ген	Прямой и обратный праймеры	Нуклеотидная последовательность праймера 5'...3'	Номер доступа в базе данных NCBI
<i>BI-1</i>	прямой	CCAGCGGATGGGGCTACGACT	GU564292.1
	обратный	GCGAGCATTGTCAGCATCCCG	
<i>Actin</i>	прямой	GGGACCTCACGGATAATCTAATG	AB181991
	обратный	AACCTCCACTGAGAACAACATTAC	

растениями показано, что сверхэкспрессия в клетках гена *BI-1* этого белка способствует супрессии ПКС при их обработке элиситорами и салициловой кислотой, действию высоких и низких температур [Chae et al., 2003; Matsumura et al., 2003; Kawai-Yamada et al., 2004].

Следует отметить, что роль этого белка в предотвращении повреждения клеток подтверждена главным образом в экспериментах с трансгенными растениями и на дрожжах со сверхэкспрессией гена *BI-1* животного или растительного происхождения. Однако данные по экспрессии гена *BI-1* при действии на растения неблагоприятных факторов среды с одновременным контролем устойчивости в литературе пока единичны [Isbat et al., 2009; Chen et al., 2013; Zhao et al., 2014]. Вместе с тем именно одновременное изучение уровня экспрессии генов и характера изменений устойчивости представляет собой один из наиболее эффективных подходов при оценке вклада конкретных генов и кодируемых ими белков в ответные реакции растений на те или иные неблагоприятные воздействия. Учитывая это, нами проведено сравнительное исследование динамики уровня транскриптов гена *BI-1* и устойчивости растений пшеницы при воздействии на них низких и высоких температур, вызывающих закаливающий (адаптационный) или повреждающий эффект.

Материалы и методы

Исследования проводили с проростками озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39, которые выращивали в рулонах фильтровальной бумаги на питательном растворе Кнопа (pH 6,2–6,4) в климатической камере при температуре воздуха 22 °С, его относительной влажности 60–70 %, освещенности 10 клк и фотопериоде 14 ч. По достижении недельного возраста проростки подвергали воздействию низких (4 и –2 °С) или высоких (37 и 43 °С) температур. Продолжительность воздействия составляла от 15 мин до 7 сут. Прочие условия сохраняли неизменными в течение всего эксперимента.

О холодо- и теплоустойчивости проростков судили по температуре (LT_{50}), вызывающей

гибель 50 % палисадных клеток листа после 5-минутного тестирующего промораживания в микрохолодильнике ТЖР-02/-20 («Интерм», Россия) [Балагурова и др., 1982] или прогрева в водном термостате [Александров, 1963]. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью светового микроскопа Микмед-2 («ЛОМО», Россия) по деструкции хлоропластов и коагуляции цитоплазмы.

Для изучения экспрессии генов навеску из листьев (50 мг) фиксировали в жидком азоте. Тотальную РНК выделяли с помощью набора Extract RNA (Евроген, Россия). Количество и качество тотальной РНК определяли методом капиллярного электрофореза на системе Experion (Bio-Rad, США). Тотальную РНК обрабатывали ДНКазой (1 е.а.). кДНК синтезировали, используя набор для обратной транскрипции с M-MLV обратной транскриптазой и случайными гексапраймерами (Евроген, Россия). Количество и качество выделенной кДНК определяли спектрофотометрически на приборе SmartSpec Plus (Bio-Rad, США). Уровень экспрессии генов растений оценивали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 (Bio-Rad, США), используя набор для амплификации с интеркалирующим красителем SYBR Green (Евроген, Россия). Праймеры (Евроген, Россия) для проведения ПЦР представлены в табл. 1. Смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала 100 нг кДНК, по 1 пкМ прямого и обратного праймеров, 5 мкл реакционной смеси и 16 мкл деионизованной воды, свободной от нуклеаз. Протокол ПЦР: денатурация кДНК 5 мин при 95 °С; 40 циклов: денатурация при 95 °С 30 с; отжиг при 56 °С 30 с; элонгация при 72° 30 с. Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР фрагментов. Эффективность ПЦР (98 %) оценивали по стандартной кривой. Уровень транскриптов генов вычисляли по формуле:

$$\text{Уровень транскриптов} = \Delta Ct,$$

где ΔCt – разница значений пороговых циклов контрольного и тестового образцов.

В качестве контрольных образцов были выбраны кДНК, выделенные из растений, не подвергнутых воздействию стресс-факторов.

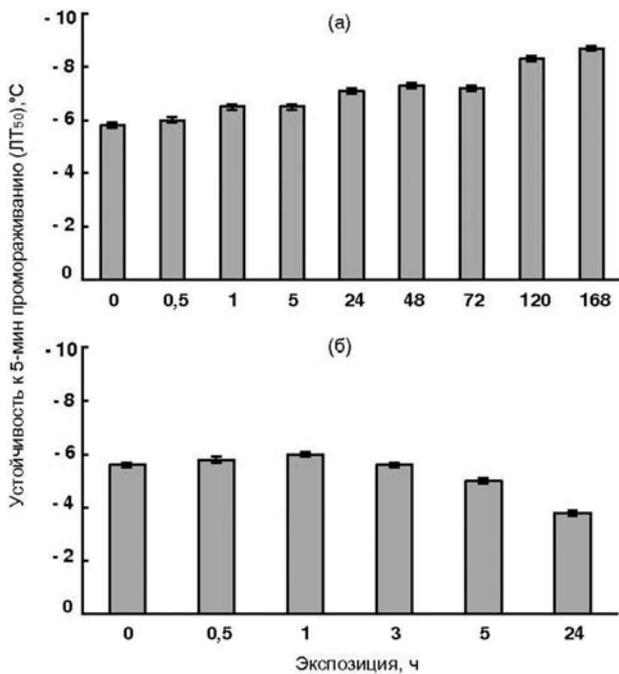


Рис. 1. Динамика устойчивости к промораживанию клеток листьев проростков пшеницы при воздействии температуры 4 °С (а) и –2 °С (б)

В качестве референсного гена использовали актин.

Повторность в пределах каждого варианта отдельного опыта при анализе устойчивости – 6-кратная, при анализе экспрессии генов – 3-кратная. Каждый опыт повторяли не менее 2–3 раз. О достоверности различий судили с помощью критерия Стьюдента при $p < 0,05$. На рисунках приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

Исследования выполнены на научном оборудовании ЦКП НО Института биологии КарНЦ РАН «Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера».

Результаты

*Влияние низких температур на морозоустойчивость проростков пшеницы и уровень транскриптов гена *BI-1* в их листьях*

Воздействие на проростки пшеницы температуры 4 °С вызывало постепенное повышение устойчивости листьев к краткосрочному промораживанию: с –5,8 (исходное значение) до –8,7 °С (на 7-е сутки воздействия) (рис. 1, а).

В начальный период действия (0,5–1 ч) на проростки температуры –2 °С также наблюдали небольшое, но достоверное повышение

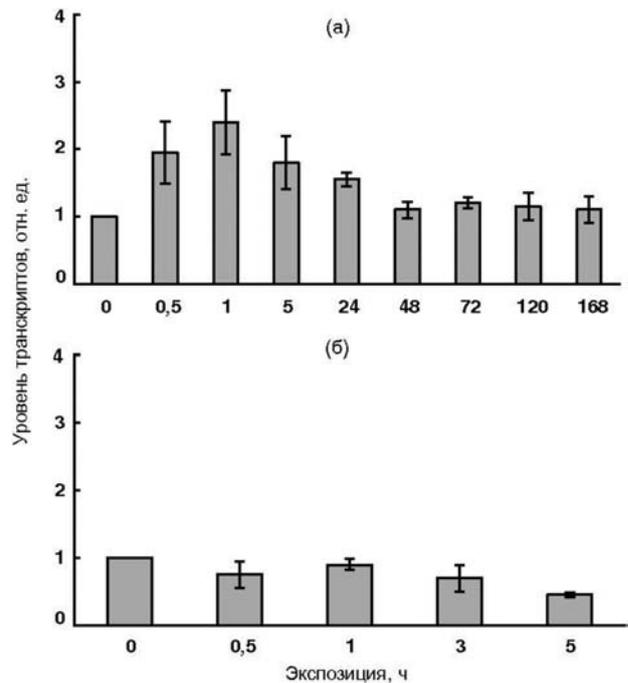


Рис. 2. Динамика уровня транскриптов гена *BI-1* в клетках листьев проростков пшеницы при воздействии температуры 4 °С (а) и –2 °С (б). Здесь и на рис. 4 содержание транскриптов гена *BI-1* при 22 °С принято за единицу

устойчивости клеток листьев к промораживанию (рис. 1, б). Однако с увеличением экспозиции растений в этих условиях устойчивость начинала снижаться, и уже через 1 сут она была заметно ниже исходного уровня. Следовательно, действие на проростки пшеницы температуры –2 °С носило повреждающий характер.

Наряду с ростом морозоустойчивости в ответ на действие температуры 4 °С в клетках листьев пшеницы происходило быстрое (уже через 30 мин) повышение уровня транскриптов гена *BI-1* (рис. 2, а). Максимальный уровень транскриптов этого гена (почти двухкратное его повышение по сравнению с исходным уровнем) зарегистрирован через 1 ч от начала холодного закаливания. К концу первых суток действия температуры 4 °С содержание транскриптов гена *BI-1* несколько уменьшалось, при более длительном воздействии оно продолжало снижаться и через 3–7 сут было близким к исходному значению.

В отличие от этого при действии температуры –2 °С в листьях пшеницы отмечено снижение содержания мРНК гена *BI-1* по сравнению с исходным уровнем (рис. 2, б). Таким образом, кратковременное повышение устойчивости листьев проростков пшеницы в начальный период действия отрицательной температуры не сопровождалось увеличением в их клетках уровня транскриптов гена *BI-1*.

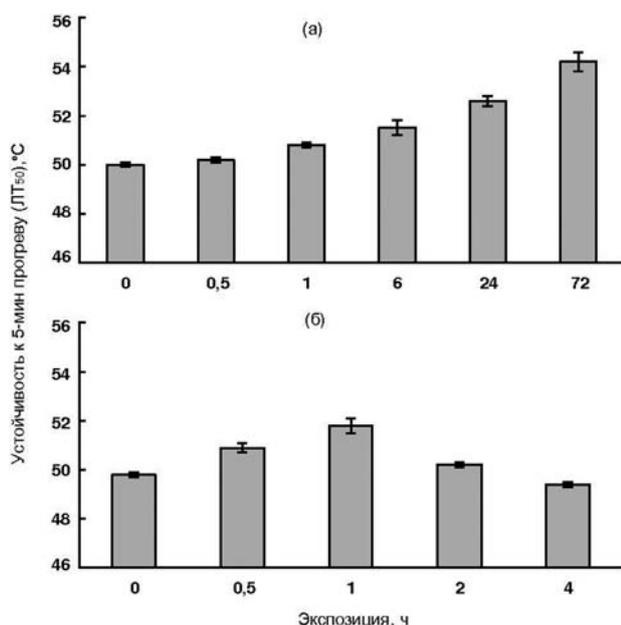


Рис. 3. Динамика теплоустойчивости проростков пшеницы при воздействии температуры 37 °С (а) и 43 °С (б)

*Влияние высоких температур на теплоустойчивость проростков пшеницы и уровень транскриптов гена *BI-1* в их листьях*

Под влиянием температуры 37 °С теплоустойчивость клеток листьев пшеницы заметно возрастала уже через 1 ч, затем она продолжала быстро повышаться. На третьи сутки теплоустойчивость листьев превосходила исходное значение более чем на 4 градуса (рис. 3, а).

Температура 43 °С оказывала иное воздействие на теплоустойчивость пшеницы. В этом случае отмечен быстрый (уже через 30 мин) рост устойчивости к прогреву, продолжающийся в течение 1 ч. Однако через 2 ч наблюдали резкое снижение теплоустойчивости, в результате чего спустя 4 ч она была ниже исходного уровня (рис. 3, б).

Воздействие высоких температур на проростки пшеницы приводило к значительному увеличению содержания транскриптов *BI-1* в клетках листьев. При температуре 37 °С уже через 0,5 ч происходило повышение содержания транскриптов гена *BI-1* до максимального уровня (примерно в 3 раза), который в дальнейшем сохранялся практически неизменным в течение всего периода теплового воздействия (рис. 4, а).

Под влиянием температуры 43 °С через 0,5 ч происходило десятикратное повышение уровня транскриптов гена *BI-1* (рис. 4, б).

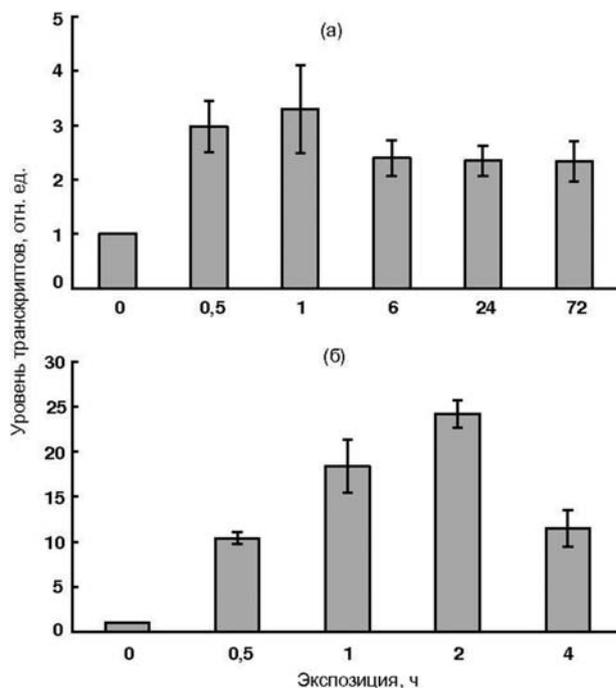


Рис. 4. Уровень транскриптов гена *BI-1* в листьях проростков пшеницы при воздействии температуры 37 °С (а) и 43 °С (б)

В последующие 2 ч высокотемпературного воздействия содержание транскриптов этого гена увеличивалось почти в 25 раз, затем оно резко снижалось относительно максимума, но все равно было выше исходного уровня.

Обсуждение

Результаты проведенных исследований показали, что характер реакции растений пшеницы зависит от интенсивности низких и высоких температур, точнее, от того, является ли действующая на растения температура закалывающей или повреждающей. Так, под влиянием температуры 4 °С происходило постепенное повышение холодоустойчивости, а при –2 °С сначала небольшое ее повышение, а затем снижение. При температуре 37 °С теплоустойчивость увеличивалась вплоть до конца эксперимента, в то время как при температуре 43 °С она вначале быстро возрастала, а затем резко снижалась. Важно и то, что максимальный уровень устойчивости к прогреву, достигаемый при действии на проростки повреждающей температуры, заметно уступал ее максимальному значению при закаливании в условиях температуры 37 °С.

Сопоставление динамики теплоустойчивости и уровня транскриптов гена *BI-1* позволяет сделать предположение о вовлечении этого гена и кодируемого им белка *BI-1* в реакцию

проростков пшеницы на действие и низких, и высоких закаливающих температур. Об этом свидетельствует тот факт, что рост устойчивости проростков пшеницы в начальный период холодого закаливания сопровождается увеличением экспрессии гена *BI-1*. Напротив, в ответ на действие низкой повреждающей температуры, когда повышение устойчивости проростков незначительно и носит кратковременный характер, в клетках листьев проростков отмечено не повышение, а снижение экспрессии гена *BI-1*. Следует также отметить, что первоначальное увеличение уровня транскриптов гена *BI-1* при действии температуры 37 °С наблюдали уже в первые 30 мин от его начала, что предшествовало повышению теплоустойчивости растений. При более высокой температуре (43 °С) характер изменения устойчивости и содержания кДНК гена в клетках листьев совпадали.

Интересно также отметить, что характер изменения содержания транскриптов этого гена при действии низких и высоких температур различался. Если при холодом закаливании накопление транскриптов гена *BI-1* происходило в его начале, то при действии высоких температур – в течение всего эксперимента. Более того, максимальный уровень транскриптов этого гена при действии температуры 43 °С значительно превышал таковой при действии холода.

Следует также отметить, что хотя имеются и некоторые отличия в динамике накопления транскриптов гена *BI-1* при низкой и высокой закаливающей температуре, в обоих случаях нами зарегистрировано повышение транскрипционной активности гена в листьях проростков пшеницы. Такую общность в характере изменения уровня экспрессии гена *BI-1* при данных воздействиях можно объяснить тем, что как низкие, так и высокие температуры способны индуцировать в клетках растений окислительный стресс, сопровождающийся резким увеличением концентрации активных форм кислорода [Miller et al., 2008]. Последние могут участвовать в трансдукции сигнала, запускающего процессы, ведущие как к повышению устойчивости клеток к неблагоприятным температурам, так и к гибели клеток в зависимости от интенсивности воздействия. Оказалось, что в клетках трансгенных растений с повышенной экспрессией белка *BI-1* концентрация активных форм кислорода практически не изменялась в ответ на действие факторов, индуцирующих окислительный стресс [Kawai-Yamada et al., 2004]. Это может свидетельствовать о вовлечении данного белка в защиту клеток от чрезмерного накопления этих молекул и АФК-зависимой ПКС.

Об участии гена *BI-1* и кодируемого им белка *BI-1* в устойчивости растений к разного вида биотическим и абиотическим неблагоприятным факторам говорят также и данные литературы. Как уже отмечалось, основная функция кодируемого геном *BI-1* антиапоптотического белка *BI-1* – ингибирование ПКС. Неблагоприятные температуры, так же как и другие абиотические факторы среды, например высокое содержание в почве солей, тяжелых металлов, способны индуцировать гибель клеток растений [Isbat et al., 2009]. Повышение уровня экспрессии гена *BI-1* у трансгенных растений способствует подавлению развития ПКС, индуцированной различными стрессорами [Kawai et al., 1999; Kawai-Yamada et al., 2004; Wang et al., 2012]. Напротив, нокаут этого гена приводит к ускорению процессов, приводящих к клеточной смерти. Например, у растений *Arabidopsis thaliana*, у которых отсутствует экспрессия гена *BI-1*, в ответ на обработку грибным токсином фумонизином или высокими температурами регистрировали ускоренное развитие признаков апоптозоподобной дегенерации клеток [Watanabe, Lam, 2006].

Как в растительных, так и в животных клетках в запуске ПКС могут участвовать различные клеточные компартменты. Один из них – ЭР, играющий важную роль в контроле за качеством клеточных белков [Liu, Howell, 2010]. Как уже отмечалось, при избыточном накоплении в его полости аномальных белков развивается ЭР-стресс. При этом инициируются сигналы, которые могут быть направлены как на активацию защитного механизма, названного «ответ на неупакованные белки», так и на индукцию ПКС. Направленность этих сигналов, вероятнее всего, определяется силой и длительностью действующего на растения фактора [Lisbona et al., 2009].

BI-1 является трансмембранным белком, локализованным в мембране ЭР. Вероятнее всего, данный белок проявляет свои защитные функции через участие в контроле за качеством белков при развитии ЭР-стресса. Предполагается, что *BI-1* влияет на гомеостаз ионов, в том числе катионов кальция, в ЭР [Ihara-Ohori et al., 2007]. Известно, что ионы кальция являются универсальными мессенджерами, которые вовлечены в клеточный сигналинг. Изменение потока кальция между ЭР, цитоплазмой и митохондриями может служить сигналом для запуска ПКС. Белок *BI-1*, вероятно, может регулировать этот поток, участвуя таким образом в подавлении ПКС. Так, сверхэкспрессия белка *Bcl-2*, подобного *BI-1*, снижает уровень Ca^{2+} в ЭР клеток млекопитающих [Foyouzi-Youssefi et al., 2000]. Повышение экспрессии апоптотического белка *Bax*,

вызванное различными факторами, приводит к усилению продукции АФК в клетках растений, разрушению органелл и выходу ионов из клеток [Baek et al., 2004]. В клетках трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* со сверхэкспрессией генов, кодирующих Вах и BI-1, наблюдали увеличение содержания АФК без изменения ионной проницаемости клеточных мембран [Kawai-Yamada et al., 2004]. Хотя BI-1 ингибирует действие апоптотического белка Вах, он с ним не связан напрямую. Контроль за ПКС, скорее всего, этот белок осуществляет через регуляцию потоков внутриклеточного кальция [Kawai-Yamada et al., 2004].

Возможны и другие пути вовлечения антиапоптотического белка BI-1 в контроль за качеством белков и развитием клеточной смерти. В частности, он может образовывать комплекс с цитохромом b5 и гидроксилазой жирных кислот FAH и вовлекаться в 2-гидроксилирование сфинголипидов [Nagano et al., 2009]. Например, у трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* со сверхэкспрессией BI-1 наблюдали увеличение уровня длинноцепочечных 2-гидрокси-жирных кислот [Nagano et al., 2009]. Следовательно, этот белок может участвовать в модификации липидного спектра растений в условиях стресса и модулировать сфинголипид-ассоциированный путь ПКС у растений. Также обнаружено, что BI-1 может взаимодействовать с белком IRE1- α , который играет одну из ключевых ролей в восприятии и развитии ЭР-стресса [Lisbona et al., 2009]. Этот факт свидетельствует об участии BI-1 в IRE1- α зависимом ответе на неупакованные белки, т. е. в механизме, обеспечивающем белковый гомеостаз ЭР.

Следует также подчеркнуть, что в литературе имеются указания на то, что BI-1 способен супрессировать развитие ЭР-стресса и гибель клеток растений в условиях так называемого «мягкого» стресса [Lisbona et al., 2009], с которым, по-видимому, сходен стресс, который испытывали растения пшеницы в наших экспериментах при холодовом и тепловом закаливании. При действии на растения неблагоприятных факторов более сильной напряженности BI-1 теряет такую способность. Это вполне согласуется с нашими данными, полученными при изучении экспрессии гена *BI-1* в листьях проростков пшеницы при действии отрицательной температуры. Исходя из представленных в данной работе результатов и анализа литературы, можно предположить, что высокий уровень *BI-1* в клетках является важным фактором для адаптации и повышения выживаемости растений в неблагоприятных температурных условиях.

В целом можно заключить, что разные по интенсивности и характеру воздействия на растения (закаливающее или повреждающее) низкие и высокие температуры вызывают неодинаковые как в количественном, так и в качественном отношении изменения их холодо- и теплоустойчивости. По нашему мнению, эти различия при умеренном (мягком) и сильном (жестком) температурном стрессе обусловлены проявлением разных защитно-приспособительных реакций и функционированием различных адаптационных механизмов, в том числе связанных с экспрессией гена антиапоптотического белка BI-1.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (тема № 0221-2014-0002).

Литература

- Александров В. Я. Цитофизиологические и цитозекологические исследования устойчивости растительных клеток к действию высоких температур // Тр. Ботан. ин-та АН СССР. 1963. Т. 4. С. 234–280.
- Балагурова Н. И., Дроздов С. Н., Хилков Н. И. Метод определения устойчивости растительных тканей к промораживанию. Петрозаводск: Карельск. филиал АН СССР, 1982. 6 с.
- Ванюшин Б. Ф. Апоптоз у растений // Успехи биологической химии. 2001. Т. 41. С. 3–38.
- Любушкина И. В., Грабельных О. И., Побежимова Т. П. и др. Развитие программируемой клеточной гибели в суспензионной культуре клеток озимой пшеницы *Triticum aestivum* (L.) при действии низкой положительной и отрицательной температур // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. 2010. Т. 3, № 4. С. 10–18.
- Baek D., Nam J., Koo Y. D. et al. Wax-induced cell death of *Arabidopsis* is mediated through reactive oxygen-dependent and independent processes // Plant Mol. Biol. 2004. Vol. 56. P. 15–27. doi: 10.1007/s11103-004-3096-4.
- Balk J., Leaver C. J., McCabe P. F. Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants // FEBS Lett. 1999. Vol. 463. P. 151–154. doi: 10.1016/S0014-5793(99)01611-7.
- Chae H. J., Ke N., Kim H. R. et al. Evolutionarily conserved cytoprotection provided by BAX Inhibitor-1 homologues from animals, plants, and yeast // Gene. 2003. Vol. 323. P. 101–113. doi: 10.1016/j.gene.2003.09.011.
- Chen X. H., Yu H., Deng H. J. et al. Cucumber BAX inhibitor-1, a conserved cell death suppressor and a negative programmed cell death regulator under cold stress // Biol. Plant. 2013. Vol. 47. P. 684–690. doi: 10.1007/s10535-013-0347-8.
- Foyouzi-Youssefi R., Arnoudeau S., Borner C. et al. Bcl-2 decreases the free Ca²⁺ concentration within the

endoplasmic reticulum // PNAS. 2000. Vol. 97. P. 5723–5728. doi: 10.1073/pnas.97.11.5723.

Ihara-Ohori Y., Nagano M., Muto S. et al. Cell death suppressor Arabidopsis Bax inhibitor-1 is associated with calmodulin binding and ion homeostasis // Plant Physiol. 2007. Vol. 143. P. 650–660. doi: 10.1104/pp.106.090878.

Isbat M., Zeba N., Kim S. R., Hong C. B. A BAX Inhibitor-1 gene in *Capsicum annum* is induced under various abiotic stresses and endows multi-tolerance in transgenic tobacco // J. Plant. Physiol. 2009. Vol. 166. P. 1685–1693. doi: 10.1016/j.jplph.2009.04.017.

Kawai M., Pan L., Reed J. C., Uchimiya H. Evolutionally conserved plant homologue of the Bax Inhibitor-1 (BI-1) gene capable of suppressing Bax-induced cell death in yeast // FFEBS Letters. 1999. Vol. 464. P. 143–147. doi: 10.1016/S0014-5793(99)01695-6.

Kawai-Yamada M., Ohori Y., Uchimiya H. Dissection of Arabidopsis Bax inhibitor-1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death // Plant. Cell. 2004. Vol. 16. P. 21–32. doi: 10.1105/tpc.014613.

Lisbona F., Rojas-Rivera D., Thielen P. et al. BAX Inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1 α // Mol. Cell. 2009. Vol. 33. P. 679–691. doi: 10.1016/j.molcel.2009.02.017.

Liu J. X., Howell S. H. Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants // Plant Cell. 2010. Vol. 22. P. 2930–2942. doi: 10.1105/tpc.110.078154.

Matsumura H., Nirasawa S., Kiba A. et al. Overexpression of Bax-inhibitor suppresses the fungal

elicitor-induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) cells // Plant J. 2003. Vol. 33. P. 425–434.

Miller G., Shulaev V., Mittler R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress // Physiol. Plant. 2008. Vol. 133. P. 481–489. doi: 10.1111/j.1399-3054.2008.01090.x.

Nagano M., Ihara-Ohori Y., Imai H. et al. Functional association of cell death suppressor, Arabidopsis Bax inhibitor-1, with fatty acid 2-hydroxylation through cytochrome b5 // Plant J. 2009. Vol. 58. P. 122–134. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03765.x.

Wang X., Tang C., Huang X. et al. Wheat BAX Inhibitor-1 contributes to wheat resistance to *Puccinia striiformis* // J. Exp. Biol. 2012. Vol. 63. P. 4571–4584. doi: 10.1093/jxb/ers140.

Watanabe N., Lam E. Arabidopsis BAX Inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic type of cell death // Plant J. 2006. Vol. 45. P. 884–894.

Watanabe N., Lam E. Bax inhibitor-1 modulates endoplasmic reticulum-mediated programmed cell death in Arabidopsis // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283. P. 3200–3210.

Watanabe N., Lam E. Bax inhibitor-1, a conserved cell death suppressor, is a key molecular switch downstream from a variety of biotic and abiotic stress signals in plants // Int. J. Mol. Sci. 2009. Vol. 10. P. 3149–3167. doi: 10.3390/ijms10073149.

Zhao Y., Chen J., Tao X. et al. The possible role of BAX and BI-1 genes in chilling-induced cell death in cucumber fruit // Acta Physiol. Plant. 2014. Vol. 36. P. 1345–1351. doi: 10.1007/s11738-014-1513-0.

Поступила в редакцию 10.09.2015

References

Aleksandrov V. Ja. Citofiziologicheskie i citojekologicheskie issledovanija ustojchivosti rastitel'nyh kletok k dejstvuju vysokih temperature [Cytophysiological and cytoecological study of plant cells tolerance to high temperatures]. Tr. Botan. in-ta AN SSSR [Proc. Botan. Inst. Acad. Sci. USSR]. 1963. Vol. 4. P. 234–280.

Balagurova N. I., Drozdov S. N., Hilkov N. I. Metod opredelenija ustojchivosti rastitel'nyh tkanej k promorazhivaniju [Method for determination of the resistance of plant tissues to freezing]. Petrozavodsk: Kar. filial AN SSSR. 1982. 6 p.

Ljubushkina I. V., Grabel'nyh O. I., Pobezhimova T. P., Fedoseeva I. V., Stepanov A. V., Fedjaeva A. V., Pavlovskaja N. S., Koroleva N. A., Vojnikov V. K. Razvitiie programmiruemoj kletочноj gibeli v suspenzionnoj kul'ture kletok ozimoi pshenicy *Triticum aestivum* (L.) pri dejstvii nizkoj polozhitel'noj i otricatel'noj temperature [The programmed cell death in suspension cell culture of winter wheat *Triticum aestivum* (L.) under low and subzero temperature]. Izvestija Irkutskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Serija Biologija. Jekologija [The Bulletin of Irkutsk State University. Ser. Biology. Ecology]. 2010. Vol. 3, No 4. P. 10–18.

Vanjushin B. F. Apoptoz u rastenij [Apoptosis in plants]. Uspehi biologicheskoi himii [Biochemistry. Spec. Iss. Biological Chem. Rev.]. 2001. Vol. 41. P. 3–38.

Baek D., Nam J., Koo Y. D., Kim D. H., Lee J., Jeong J. C., Kwak S. S., Chung W. S., Lim C. O., Bahk J. D., Hong J. C., Lee S. Y., Kawai-Yamada M., Uchimiya H., Yun D. J. Bax-induced cell death of Arabidopsis is mediated through reactive oxygen-dependent and independent processes. Plant Mol. Biol. 2004. Vol. 56. P. 15–27. doi: 10.1007/s11103-004-3096-4.

Balk J., Leaver C. J., McCabe P. F. Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants. FEBS Lett. 1999. Vol. 463. P. 151–154. doi: 10.1016/S0014-5793(99)01611-7.

Chae H. J., Ke N., Kim H. R., Chen S., Godzik A., Dickman M., Reed J. C. Evolutionarily conserved cytoprotection provided by BAX Inhibitor-1 homologues from animals, plants, and yeast. Gene. 2003. Vol. 323. P. 101–113. doi: 10.1016/j.gene.2003.09.011.

Chen X. H., Yu H., Deng H. J., Chen J. X., Mi H. B., Mao L. C. Cucumber BAX inhibitor-1, a conserved cell death suppressor and a negative programmed cell death regulator under cold stress. Biol. Plant. 2013. Vol. 47. P. 684–690. doi: 10.1007/s10535-013-0347-8.

Foyouzi-Youssefi R., Arnoudeau S., Borner C., Kelley W. L., Tschopp J., Lew D. P., Demaurex N., Krause K. H. Bcl-2 decreases the free Ca²⁺ concentration

within the endoplasmic reticulum. *PNAS*. 2000. Vol. 97. P. 5723–5728. doi: 10.1073/pnas.97.11.5723.

Ihara-Ohori Y., Nagano M., Muto S., Uchimiya H., Kawai-Yamada M. Cell death suppressor Arabidopsis Bax inhibitor-1 is associated with calmodulin binding and ion homeostasis. *Plant Physiol*. 2007. Vol. 143. P. 650–660. doi: 10.1104/pp.106.090878.

Isbat M., Zeba N., Kim S. R., Hong C. B. A BAX Inhibitor-1 gene in *Capsicum annum* is induced under various abiotic stresses and endows multi-tolerance in transgenic tobacco. *J. Plant. Physiol*. 2009. Vol. 166. P. 1685–1693. doi: 10.1016/j.jplph.2009.04.017.

Kawai M., Pan L., Reed J. C., Uchimiya H. Evolutionally conserved plant homologue of the Bax Inhibitor-1 (BI-1) gene capable of suppressing Bax-induced cell death in yeast. *FEBS Letters*. 1999. Vol. 464. P. 143–147. doi: 10.1016/S0014-5793(99)01695-6.

Kawai-Yamada M., Ohori Y., Uchimiya H. Dissection of Arabidopsis Bax inhibitor-1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death. *Plant. Cell*. 2004. Vol. 16. P. 21–32. doi: 10.1105/tpc.014613.

Lisbona F., Rojas-Rivera D., Thielen P., Zamorano S., Todd D., Martinon F., Glavic A., Kress C., Lin J. H., Walter P., Reed J. C., Climcher L. H., Helz C. BAX Inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1 α . *Mol. Cell*. 2009. Vol. 33. P. 679–691. doi: 10.1016/j.molcel.2009.02.017.

Liu J. X., Howell S. H. Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants. *Plant Cell*. 2010. Vol. 22. P. 2930–2942. doi: 10.1105/tpc.110.078154.

Matsumura H., Nirasawa S., Kiba A., Urasaki N., Saitoh H., Ito M., Kawai-Yamada M., Uchimiya H.,

Terauchi R. Overexpression of Bax-inhibitor suppresses the fungal elicitor-induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) cells. *Plant J*. 2003. Vol. 33. P. 425–434.

Miller G., Shulaev V., Mittler R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol. Plant*. 2008. Vol. 133. P. 481–489. doi: 10.1111/j.1399-3054.2008.01090.x.

Nagano M., Ihara-Ohori Y., Imai H., Inada N., Fujimoto M., Tsutsumi N., Uchimiya H., Kawai-Yamada M. Functional association of cell death suppressor, Arabidopsis Bax inhibitor-1, with fatty acid 2-hydroxylation through cytochrome b5. *Plant J*. 2009. Vol. 58. P. 122–134. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03765.x.

Wang X., Tang C., Huang X., Li F., Chen X., Zhang G., Sun Y., Han D., Kang Z. Wheat BAX Inhibitor-1 contributes to wheat resistance to *Puccinia striiformis*. *J. Exp. Biol*. 2012. Vol. 63. P. 4571–4584. doi: 10.1093/jxb/ers140.

Watanabe N., Lam E. Arabidopsis BAX Inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic type of cell death. *Plant J*. 2006. Vol. 45. P. 884–894.

Watanabe N., Lam E. Bax inhibitor-1 modulates endoplasmic reticulum-mediated programmed cell death in Arabidopsis. *J. Biol. Chem*. 2008. Vol. 283. P. 3200–3210.

Watanabe N., Lam E. Bax inhibitor-1, a conserved cell death suppressor, is a key molecular switch downstream from a variety of biotic and abiotic stress signals in plants. *Int. J. Mol. Sci*. 2009. Vol. 10. P. 3149–3167. doi: 10.3390/ijms10073149.

Zhao Y., Chen J., Tao X., Zheng X., Mao L. The possible role of BAX and BI-1 genes in chilling-induced cell death in cucumber fruit. *Acta Physiol. Plant*. 2014. Vol. 36. P. 1345–1351. doi: 10.1007/s11738-014-1513-0.

Received September 10, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Топчиева Людмила Владимировна

ведущий научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: topchieva67@mail.ru
тел.: (8142) 769810

Таланова Вера Викторовна

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

Титов Александр Федорович

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

CONTRIBUTORS:

Topchieva, Lyudmila

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: topchieva67@mail.ru
tel.: (8142) 769810

Talanova, Vera

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

Titov, Alexandr

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

Нилова Ирина Александровна

младший научный сотрудник
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: im-ira@mail.ru
тел.: (8142) 762712

Репкина Наталья Сергеевна

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

Венжик Юлия Валерьевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: Jul.Venzhik@gmail.com
тел.: (8142) 762712

Nilova, Irina

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

Repkina, Natalia

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

Venzhik, Yuliya

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

УДК 581.1

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ БТШ У ПШЕНИЦЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ВЫСОКИХ ТЕМПЕРАТУР

И. А. Нилова, Л. В. Топчиева, А. Ф. Титов

Институт биологии Карельского научного центра РАН

На недельных проростках пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39 изучали влияние высоких закаливающих (33 и 37 °С) и повреждающей (43 °С) температур на динамику теплоустойчивости клеток листьев и экспрессию генов белков теплового шока (БТШ). Показано, что под влиянием температур 33 и 37 °С теплоустойчивость клеток листьев постепенно возрастала, достигая максимума через 2 и 3 суток соответственно. Действие на проростки температуры 43 °С первоначально также вызывало быстрый рост устойчивости клеток к прогреву, который затем сменялся ее резким снижением. Повышение теплоустойчивости проростков во всех случаях сопровождалось изменением уровня экспрессии генов высокомолекулярных и низкомолекулярных БТШ: *TaHSP70*, *TaHSP90*, *TaHSP16,9* и *TaHSP19*. При этом уровень их экспрессии зависел как от интенсивности действующей на растения температуры и экспозиции, так и от принадлежности БТШ к определенному семейству белков. В частности, в начальный период действия температур 33, 37, 43 °С отмечено накопление транскриптов генов *TaHSP70*, *TaHSP90* и *TaHSP16,9*, тогда как при более длительном тепловом воздействии – транскриптов генов *TaHSP16,9* и *TaHSP19*. На основании полученных данных сделан вывод, что рост устойчивости клеток листьев пшеницы в начальный период действия высоких закаливающих и повреждающих температур связан с увеличением транскрипционной активности генов, кодирующих БТШ. Однако их относительный вклад в устойчивость может варьировать в зависимости от интенсивности и продолжительности высокотемпературного воздействия, а также от принадлежности к тому или иному семейству БТШ.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L.; теплоустойчивость; высокие температуры; изменения экспрессии генов; белки теплового шока.

I. A. Nilova, L. V. Topchieva, A. F. Titov. HSP GENE EXPRESSION IN WHEAT UNDER HEAT STRESS

The effect of hardening (33 and 37 °C) and damaging (43 °C) temperatures on thermotolerance in leaf cells and HSP gene expression was studied in one-week old wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) of cv. Moscovskaya 39. It was shown that thermotolerance in plant cells under the temperatures 33 and 37 °C gradually rose and reached a maximum after 2 and 3 days respectively. Thermotolerance in plant cells under the temperature 43 °C first grew rapidly but then dropped sharply. The rise of thermotolerance under all studied temperatures was accompanied by changes in the level of high and low molecular weight HSPs: *TaHSP70*, *TaHSP90*, *TaHSP16,9* and *TaHSP19*. The level of expression depended both on the intensity of high temperature impact and exposure, as well as on HSP group. For example, the accumulation of *TaHSP70*, *TaHSP90* and *TaHSP16,9* was detected in the initial period of 33, 37 and 43 °C temperature impact, while the accumulation of *TaHSP16,9*, *TaHSP19* was observed during prolonged heat treatment. The data

obtained suggest that the rise of thermotolerance in leaf cells of wheat at the initial stage of exposure to high hardening and damaging temperatures was associated with an enhancement of HSP gene expression. However, the action of these genes depends on the intensity of high temperature impact and duration of exposure, as well as on HSP group.

Keywords: *Triticum aestivum* L.; thermotolerance; high temperatures; changes in gene expression; heat shock proteins.

Введение

Растения обладают широким набором защитно-приспособительных механизмов, позволяющих им сохранять жизнеспособность в самых различных неблагоприятных ситуациях [Лархер, 1978; Колупаев, Карпец, 2010; Vita, Gerats, 2013; Hasanuzzaman et al., 2013]. Один из них – синтез стрессовых белков, в частности, белков теплового шока (БТШ), которым отводится одна из главных ролей в механизмах теплоустойчивости [Al-Whaibi, 2011; Qu et al., 2013]. Как локализация, так и функции БТШ в клетках в условиях стресса весьма разнообразны. Например, они могут выступать в качестве молекулярных шаперонов, защищая от агрегации другие белки, участвуют в стабилизации мембран, протеолизе нативных белков с нарушенной структурой, предотвращают деградацию мРНК [Колупаев, Карпец, 2010]. Установлено, что у устойчивых к действию высоких температур сортов растений наблюдается более высокий уровень экспрессии генов БТШ [Gulli et al., 2007]. Показано также, что трансгенные растения с конститутивным синтезом или сверхэкспрессией некоторых низкомолекулярных БТШ (нмБТШ) более устойчивы к нагреву, чем обычные растения или растения, которым вводили вектор с бессмысловой последовательностью генов, кодирующих эти белки [Malik et al., 1999; Sun et al., 2001; Sanmiya et al., 2004; Jiang et al., 2009]. Тем не менее, несмотря на очевидную роль БТШ в защите клеток от высокотемпературного стресса, ряд аспектов их участия в повышении теплоустойчивости растений требует исследования. Так, к примеру, недостаточно изучено, как изменяется уровень экспрессии БТШ и кодирующих их генов в ответ на действие высоких температур разной интенсивности [Gulli et al., 2007; Huerta et al., 2013; Хохлова и др., 2015]. Хотя известно, что не только субповреждающие (закаливающие), но и повреждающие температуры способны вызывать повышение устойчивости растений к прогреву в начальный период своего действия [Топчиева, 1994; Титов и др., 2006]. Но при более продолжительном их действии (свыше 4 часов) теплоустойчивость

быстро снижается, а растения погибают. Какую роль в этих событиях играют БТШ, пока не до конца ясно. В литературе имеются лишь единичные сведения относительно экспрессии генов, кодирующих стрессовые белки, при действии температур, которые по их влиянию на устойчивость можно отнести к повреждающим [Федяева, 2015; Хохлова и др., 2015]. Поэтому целью нашей работы явилось сравнительное изучение содержания транскриптов генов, кодирующих высоко- и низкомолекулярные БТШ при действии на растения пшеницы высоких температур разной интенсивности.

Материалы и методы

Исследования проводили на проростках озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39, которые выращивали в рулонах фильтровальной бумаги на питательном растворе в течение 7 суток с добавлением микроэлементов (рН 6,2–6,4) в камере искусственного климата при температуре воздуха 22 °С, его относительной влажности 60–70 %, освещенности 10 клк и фотопериоде 14 ч. Затем недельные проростки подвергали воздействию температур 33, 37 и 43 °С, первые две из которых являются для них закаливающими, а последняя – повреждающей [Нилова, Титов, 2014].

Продолжительность воздействия составляла от 15 мин до 3 суток. Начальный период действия неблагоприятных температур составлял интервал от 15 мин до 2 ч. Теплоустойчивость растений оценивали по температуре (ЛТ₅₀), вызывающей гибель 50 % палисадных клеток листа после 5-минутного прогрева листовых высевок в водном термостате [Александров, 1963].

Для изучения уровня транскриптов генов (*TaHSP70*, *TaHSP90*, *TaHSP16,9* и *TaHSP19*) навеску из листьев (50 мг) фиксировали в жидком азоте. Тотальную РНК выделяли с помощью набора Extract RNA (Евроген, Россия). Количество и качество тотальной РНК определяли методом капиллярного электрофореза на системе Experion (Bio-Rad, США). Тотальную РНК обрабатывали ДНКазой (1 е.а.). Первую цепь кДНК синтезировали, используя набор для обратной транскрипции с M-MLV обратной

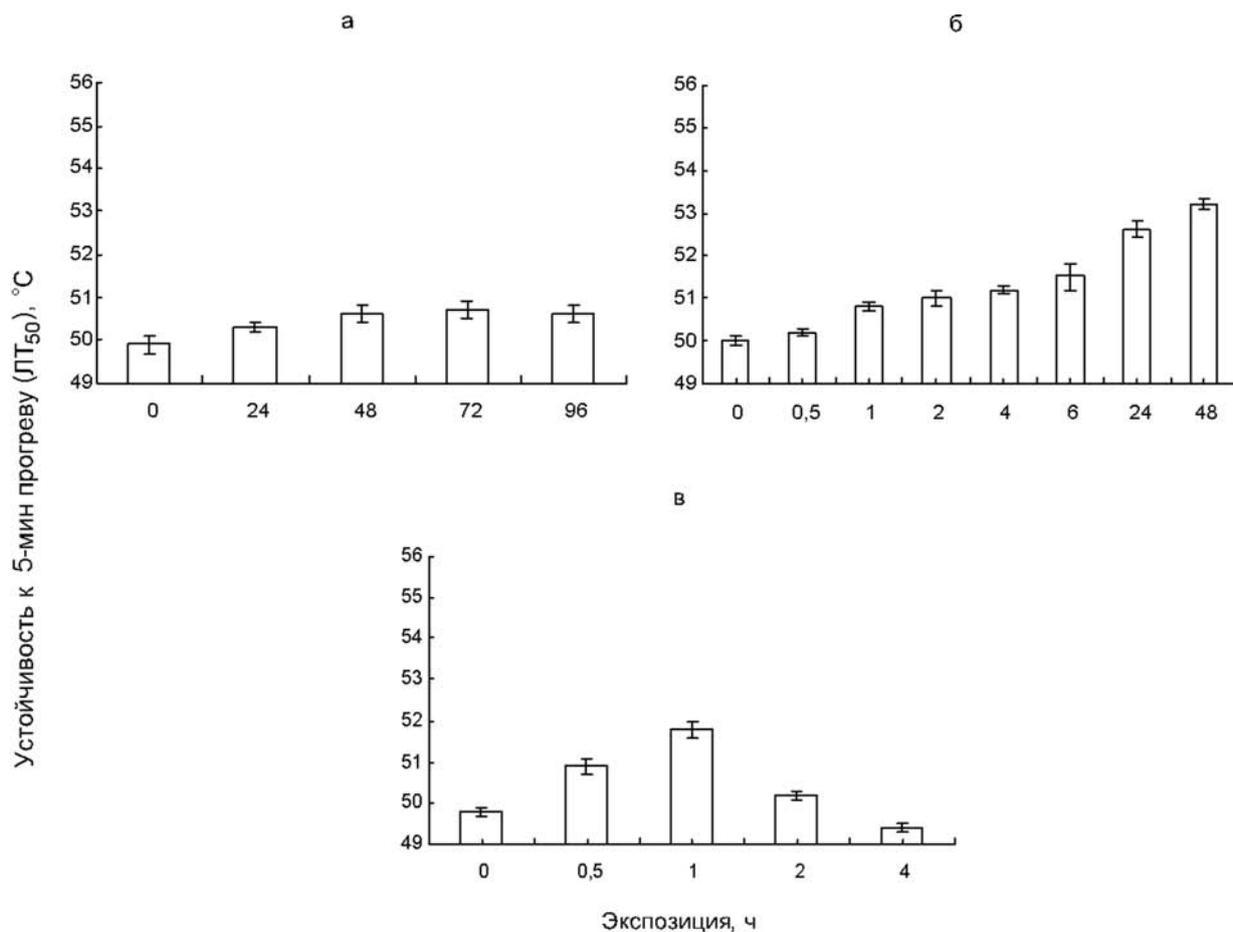


Рис. 1. Динамика теплоустойчивости растений пшеницы при действии температур разной интенсивности (а – 33 °C; б – 37 °C; в – 43 °C)

транскриптазой и случайными гексапраймерами (Евроген, Россия). Количество и качество выделенной кДНК определяли спектрофотометрически на приборе SmartSpec Plus (Bio-Rad, США). Уровень экспрессии генов растений оценивали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 (Bio-Rad, США), используя набор для амплификации с интеркалирующим красителем SYBR Green (Евроген, Россия). Праймеры (Евроген, Россия) для проведения ПЦР представлены в таблице. Смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала 100 нг кДНК, по 1 пкМ прямого и обратного праймеров, 5 мкл реакционной смеси и 16 мкл деионизованной воды, свободной от нуклеаз. Протокол ПЦР: денатурация кДНК 5 мин при 95 °C; 40 циклов: денатурация при 95 °C 30 с; отжиг при 58 °C 30 с; элонгация при 72° 30 с. Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР фрагментов. Эффективность ПЦР (98 %) оценивали по стандартной кривой. Относительный уровень экспрессии генов вычисляли по формуле:

$$\text{Относительный уровень экспрессии} = \frac{2^{-\Delta C_t}}{2^{-C_{t(\text{контрольный})}}}$$

где C_t – значение пороговых циклов.

В качестве контрольных образцов были выбраны кДНК, выделенные из растений, не подвергнутых неблагоприятному воздействию. В качестве референсного гена использовали актин.

Повторность в пределах одного опыта 2–6-кратная, а каждый опыт повторяли не менее 2–3 раз. О достоверности различий между вариантами судили с помощью критерия Стьюдента при $P < 0,05$.

Исследования выполнены на научном оборудовании ЦКП ИО Института биологии КарНЦ РАН «Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера».

Результаты

Воздействие температуры 33 °C на проростки пшеницы вызывало достоверное повышение

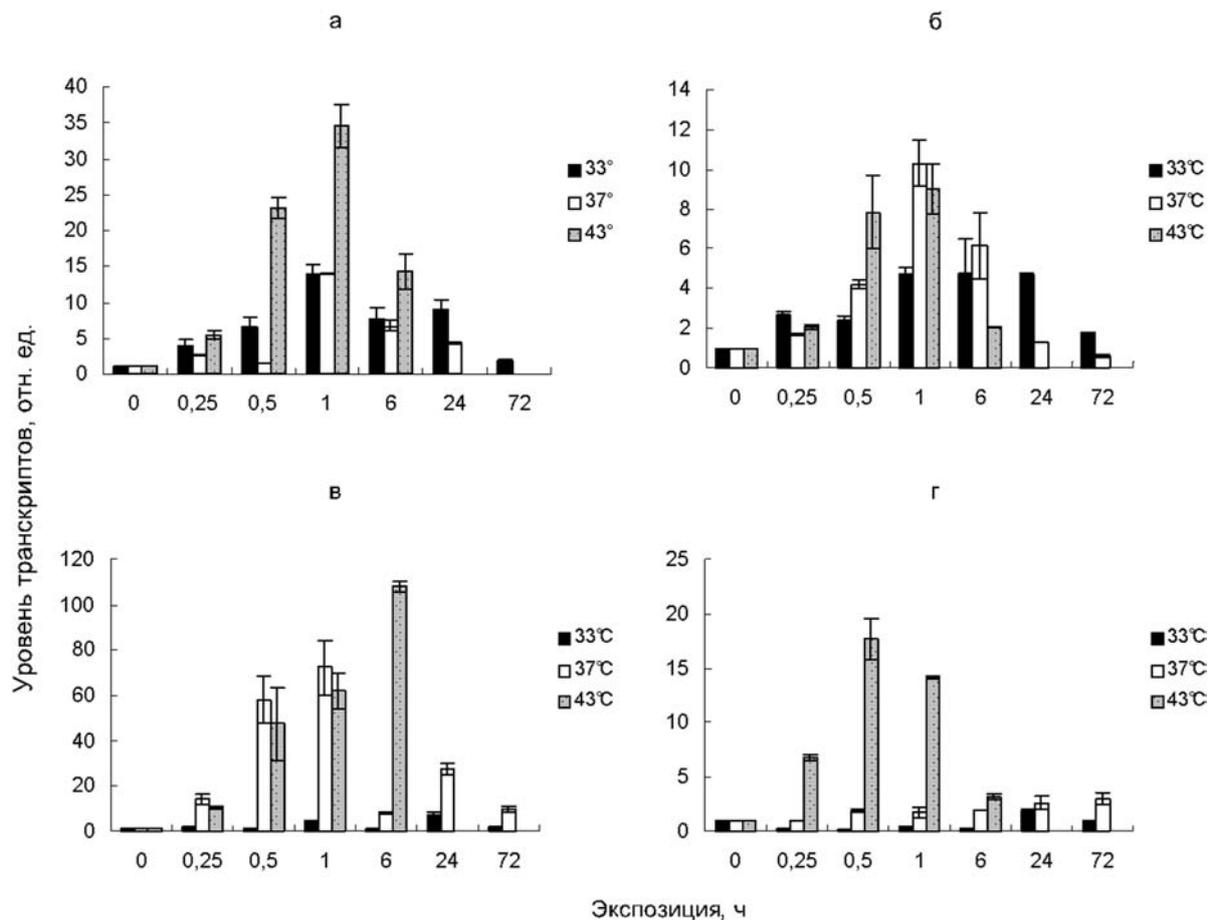


Рис. 2. Динамика экспрессии генов БТШ (а – *TaHSP70*; б – *TaHSP90*; в – *TaHSP16,9*; г – *TaHSP19*) при действии температуры разной интенсивности

их теплоустойчивости через сутки, а через двое суток она достигала максимума и в дальнейшем не изменялась (рис. 1, а). В отличие от этого температура 37 °С уже через 1 час от начала действия индуцировала рост теплоустойчивости листьев, который затем в течение трех суток продолжался, в результате чего она достигала значительно более высокого уровня, чем при 33 °С (рис. 1, б). Под влиянием температуры 43 °С также был зафиксирован быстрый рост теплоустойчивости, причем уже в первые минуты воздействия (рис. 1, в), но уже через 1 час наблюдали снижение устойчивости листьев к прогреву, а затем и гибель растений.

Динамика экспрессии генов, кодирующих БТШ с молекулярной массой 70, 90 и 16,9 (*TaHSP70*, *TaHSP90* и *TaHSP16,9*), при действии на растения температур 33, 37 и 43 °С в целом была схожа (рис. 2, а, б, в). В частности, отмечено увеличение содержания транскриптов указанных генов уже в первые минуты теплового воздействия, а затем – постепенное их снижение. Характер накопления транскриптов гена *TaHSP70* в листьях проростков при 33° был аналогичен таковому при

37 °С (см. рис. 2, а). В обоих случаях увеличение содержания мРНК этого гена наблюдали уже через 15 минут от начала теплового воздействия. Но после достижения максимального уровня через 1 час происходило его снижение. При температуре 43 °С уровень транскриптов данного гена постепенно увеличивался уже с первых минут эксперимента, достигая максимума через 2 часа, а затем также снижался. При этом экспрессия *TaHSP70* была многократно выше при 43 °С, чем при 33 и 37 °С.

Действие температуры 33 °С вызывало небольшое повышение содержания транскриптов гена *TaHSP90* уже через 15 минут от начала воздействия (см. рис. 2, б). Через 1 час был отмечен их максимальный уровень, а затем его снижение. При температуре 37 °С изменения в содержании мРНК этого гена также происходили через 15 мин от начала эксперимента. Максимальный уровень транскриптов при 37 °С наблюдали после часовой экспозиции проростков. При более продолжительном действии данной температуры содержание мРНК гена *TaHSP90* в листьях проростков снижалось, достигая через сутки исходных значений. Следует отметить, что при

температуре 37 °С максимальный уровень экспрессии гена был в 2 раза выше, чем при температуре 33 °С. При температуре 43 °С накопление транскриптов этого гена также происходило уже в первые минуты эксперимента. Максимум экспрессии гена *TaHSP90* в листьях проростков зафиксирован уже через 30 минут от начала эксперимента. Причем он был приблизительно равен максимальному уровню транскриптов при температуре 37 °С.

Температура 33 °С индуцировала накопление транскриптов гена *TaHSP16,9* уже через 15 мин от начала эксперимента (см. рис. 2, в). Максимальное содержание мРНК *TaHSP16,9* в листьях отмечено после суточной экспозиции проростков в этих условиях. Закаливание растений пшеницы при 37 °С также способствовало повышению экспрессии этого гена уже в первые минуты опыта. При действии температуры 37 °С максимальный уровень транскриптов гена *TaHSP16,9* был зафиксирован у проростков, находившихся всего лишь 1 ч в этих условиях, т. е. намного быстрее, чем у растений, испытывающих действие температуры 33 °С. К тому же он был значительно больше. Однако после 6 часов теплового закаливания независимо от используемой температуры (33 или 37 °С) в клетках листьев наблюдали понижение уровня транскриптов гена *TaHSP16,9*, за которым вновь следовало его повышение. У растений, находившихся при температуре 43 °С, наблюдали значительное повышение содержания транскриптов *TaHSP16,9*, с максимумом через 2 часа от начала теплового воздействия. Интересно, что уровень экспрессии гена *TaHSP16,9* в листьях проростков при температуре 43 °С в сотни раз превышал таковой, наблюдаемый при других тепловых воздействиях.

Нами также отмечено различное влияние температур 33, 37 и 43 °С на уровень транскриптов гена *TaHSP19*. В первые часы экспозиции проростков при 33 °С в листьях регистрировали уменьшение содержания мРНК гена *TaHSP19* (рис. 2, г). Через сутки наблюдали увеличение уровня его экспрессии, а через трое суток – снижение до исходного значения. При действии температуры 37 °С через 30 минут от начала опыта в листьях проростков пшеницы отмечен постепенный рост уровня экспрессии данного гена. Температура 43 °С вызывала быстрое накопление транскриптов гена *TaHSP19* с максимумом уже через 30 мин от начала эксперимента. Транскрипционная активность этого гена была высокой на протяжении 4 часов теплового воздействия, а затем снижалась.

Обсуждение

Полученные нами результаты показали, что в ответ на действие высоких субповреждающих (закаливающих) и повреждающей температур в клетках растений пшеницы изменяется транскрипционная активность генов, кодирующих БТШ с молекулярной массой 70, 90, 16,9 и 19 кДа. Важно, что изменение транскрипционной активности этих генов в начальный период действия температур 33, 37 и 43° происходило на фоне повышения устойчивости клеток листьев пшеницы к прогреву. Отметим, что изменение накопления мРНК генов, кодирующих нмБТШ (*TaHSP16,9*, *TaHSP19*) в клетках листьев проростков пшеницы, как правило, можно наблюдать не только в начальный период действия температур 33, 37, 43 °С, но и при их продолжительном воздействии. Это может свидетельствовать об участии БТШ16,9 и БТШ19 в ответной реакции растений на высокие температуры, как в начальный период их действия, так и при более продолжительном их воздействии.

Интересно, что динамика и уровень накопления мРНК четырех изученных нами генов зависели не только от интенсивности и продолжительности высокотемпературного воздействия на растения, но и от принадлежности БТШ к определенному семейству белков. Так, в начальный период действия (1–2 ч) температур 33, 37 и 43 °С в листьях проростков происходило повышение уровня транскриптов генов *TaHSP70*, *TaHSP90*. В дальнейшем при этих температурах устойчивость проростков к прогреву продолжала расти, тогда как уровень транскриптов этих генов снижался. Уменьшение экспрессии генов *TaHSP70*, *TaHSP90* может быть связано с тем, что в клетках листа к этому моменту накапливалось достаточное количество соответствующих белков для обеспечения присущей им функции. Синтез *de novo* белков в клетке является энергетически высокотратным процессом, поэтому чрезмерное накопление стрессовых белков может только усугубить негативный эффект неблагоприятной температуры. С другой стороны, следует иметь в виду и то обстоятельство, что отдельные БТШ могут заметно различаться по продолжительности жизни. Одни из них являются короткоживущими, а другие долгоживущими. Возможно, БТШ70 и БТШ90, кодируемые генами *TaHSP70* и *TaHSP90*, имеют достаточно большой период жизни, и дополнительного их синтеза при пролонгированном тепловом воздействии не требуется.

Характеристика праймеров и их последовательность

Ген	Прямой и обратный праймеры	Нуклеотидная последовательность праймера 5'.....3'	Номер доступа в базе данных NCBI
<i>TaHSP16,9</i>	прямой	TCCTACCTGCGGTCCGATAC	JQ809331.1
	обратный	AGGCGTCTCCTTCCAGTCCA	
<i>TaHSP19</i>	прямой	CCCCGTTCGGTAAGTCCTCG	AM422845.1
	обратный	CCAGCATCTGCCGCATCGTC	
<i>TaHSP70</i>	прямой	AGGAGGAGATTGAGAAGATGGTGC	AF005993.1
	обратный	GTCGTCTTGACCGTGTTC	
<i>TaHSP90</i>	прямой	TCCGACCTCGTCAACAACC	DQ270237.1
	обратный	ACACCGAACTGCCCAATCA	
<i>Actin</i>	прямой	GGGACCTCACGGATAATCTAATG	AB18199
	обратный	AACCTCCACTGAGAACAACATTAC	

В отличие от динамики транскриптов генов, кодирующих высокомолекулярные БТШ, изменение содержания мРНК гена *TaHSP16,9* в условиях теплового закаливания (33, 37 °С) носило двухфазный характер. Первое усиление транскрипционной активности этого гена наблюдали в начальный период действия указанных температур, второе – через сутки. Согласно литературным данным, динамика синтеза различных БТШ неодинакова. Синтез одних БТШ происходит на протяжении всего периода теплового воздействия, тогда как других – только в начальный период теплового закаливания [Neschi et al., 1987; Титов и др., 2006]. Возможно, такой характер изменения транскрипционной активности гена *TaHSP16,9* позволяет кодируемому им белку участвовать не только в быстрой защите внутриклеточных структур и других белков, но и в восстановлении и поддержании нормального метаболизма клеток в условиях пролонгированного стресса. Не исключено, что двухфазность синтеза транскриптов указанного гена связана также и с небольшим временем жизни кодируемого им белка. По имеющимся данным, время жизни разных низкомолекулярных БТШ может заметно варьировать. Например, время полураспада БТШ17,8 у *Arabidopsis thaliana* составляет примерно 6 ч, БТШ22 у кукурузы – 4 ч [Lund et al., 1998; Kim et al., 2011], у гороха время жизни БТШ18,1 – 40 ч, а хлоропластного БТШ21 – более 52 ч [Chen et al., 1990; DeRocher et al., 1991]. Вероятно, для осуществления защиты клеток растений пшеницы в ходе пролонгированного высокотемпературного стресса требуется дополнительный синтез БТШ16,9. Накопление транскриптов гена *TaHSP19*, индуцируемое высокими температурами, также характеризовалось некоторыми особенностями. В частности, в начальный период действия температуры 33 °С наблюдалось снижение экспрессии этого гена, а значительно позже – ее увеличение. К тому же при температурах 37 и 43 °С повышение уровня

транскриптов гена *TaHSP19* было постепенным, происходило раньше и было более выражено в количественном отношении, чем при 33 °С.

В целом полученные нами результаты согласуются с данными литературы о том, что экспрессия БТШ, как правило, усиливается уже в первые минуты теплового воздействия, достигает максимума через 2–4 часа и снижается при более продолжительном воздействии [Li et al., 1999, 2014; Huerta et al., 2013; Kumar et al., 2014; Park et al., 2013; Guo et al., 2014]. На основании этого можно предположить, что ранний (первичный) ответ растений пшеницы на действие высоких температур, проявляющийся в повышении устойчивости листьев к прогреву, связан с увеличением транскрипционной активности изученных нами генов и, соответственно, с усилением синтеза кодируемых ими белков. Тем не менее только их накопления, очевидно, недостаточно для сохранения жизнеспособности растений при пролонгированном действии повреждающей температуры, о чем свидетельствует снижение теплоустойчивости проростков уже после часового прогрева растений при 43 °С, а затем и их гибель.

Как известно, высокомолекулярные и низкомолекулярные БТШ обладают разнообразными свойствами, позволяющими им участвовать в защите клеточных структур и молекул от негативного действия высоких температур. К примеру, БТШ70 и БТШ90 – это большая группа высококонсервативных белков, присутствующая почти всем живым организмам [Broorsten et al., 1994; Usman et al., 2014], содержание которых в клетках даже при отсутствии стресса относительно велико (1–2 % от суммы всех цитозольных белков) [Козеко, 2010; Usman et al., 2014]. В условиях стресса эти белки выступают в качестве молекулярных шаперонов, т. е. участвуют в предотвращении агрегации частично денатурированных белковых молекул, в протеолитической деградации

необратимо поврежденных белков и их транспорте к лизосомам и протеосомам [Колупаев, Карпец, 2010]. При отсутствии стресса они образуют неактивный комплекс с факторами теплового шока (ФТШ), который при наступлении неблагоприятных условий разрушается, в результате чего освобождаются ФТШ. Последние транспортируются в ядро и дополнительно активируют экспрессию БТШ [Mittler, 2012; Рихванов и др., 2014]. Очевидно, благодаря этому БТШ70 и БТШ90 способны участвовать в защите растительных клеток от негативного действия неблагоприятных температур [Sung et al., 2001; Al-Whaibi, 2011], засухи [Cho, Hong, 2006; Song et al., 2014], засоления [Song et al., 2014] и окислительного стресса [Scarpeci et al., 2008; Montero-Barrientos et al., 2010]. Хотя сам механизм защитного действия этих белков изучен не до конца [Usman et al., 2014].

БТШ16,9 является одним из представителей семейства нмБТШ. БТШ16,9 относится к нмБТШ второго (цитозольного) класса [Basha et al., 2012]. Считается, что в вегетативных тканях растений в обычных условиях нмБТШ не синтезируются, но они появляются при действии различных стрессоров и во время некоторых фаз развития растений [Waters et al., 1996]. Предполагается, что эти белки участвуют в формировании повышенной устойчивости [Yen et al., 1997]. На это, в частности, указывает тот факт, что трансгенные растения с повышенной экспрессией гена, кодирующего БТШ16, характеризуются более высоким уровнем не только теплоустойчивости, но и устойчивости к другим стресс-факторам [Mu et al., 2013]. БТШ16,9 обладают функциями шаперонов, т. е. могут связываться с частично денатурированными белками независимым от АТФ способом и тем самым предотвращать их агрегацию [Панасенко и др., 2003; Колупаев, Карпец, 2010].

Что касается БТШ19, то конкретных данных относительно кодирующего его гена практически нет. Предполагается, что он участвует в процессе развития растений [Sarkar et al., 2009]. Как показали наши исследования, ген *TaHSP19* также может принимать участие в повышении теплоустойчивости, по крайней мере, при продолжительном действии температуры 37 °С, а также в начальный период действия температуры 43 °С.

Заключение

Результаты проведенного нами исследования показали, что действие высоких закаливающих (33 и 37 °С) и повреждающей (43 °С) температур в начальный период их действия

приводит не только к росту теплоустойчивости растений пшеницы, но и к изменению экспрессии ряда генов, кодирующих БТШ. В частности, в начальный период действия этих температур происходит накопление транскриптов генов *TaHSP70*, *TaHSP90* и *TaHSP16,9*. Увеличение экспозиции в условиях высоких закаливающих температур (33 и 37 °С) приводило к дальнейшему росту теплоустойчивости и одновременному усилению экспрессии генов *TaHSP16,9* и *TaHSP19*. Эти результаты говорят о том, что синтез БТШ вовлечен не только в первичную реакцию растений на действие высоких закаливающих и повреждающих температур, но и в процесс их адаптации при продолжительном нахождении в условиях теплового закаливания. Очевидно, ответная реакция растений пшеницы на действие высоких температур направлена на повышение теплоустойчивости и носит многокомпонентный характер. Судя по полученным данным, в ее формировании наряду с другими структурно-функциональными изменениями активно участвуют различные стрессовые белки (БТШ), соотносительный вклад которых в устойчивость может варьировать не только в зависимости от интенсивности и продолжительности высокотемпературного воздействия, но и от принадлежности конкретного белка к тому или иному семейству БТШ.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (тема № 51.2, № г. р. 01201358737).

Литература

- Александров В. Я. Цитофизиологические и цитозологические исследования устойчивости растительных клеток к действию высоких температур // Тр. Ботан. ин-та АН СССР. 1963. Т. 4. С. 234–280.
- Козеко Л. Е. Белки теплового шока 90 КДа: разнообразие, структура и функции // Цитология. 2010. Т. 52, № 11. С. 893–910.
- Колупаев Ю. Е., Карпец Ю. В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. Киев: Основа, 2010. 351 с.
- Лархер В. Экология растений. М.: Мир, 1978. 384 с.
- Нилова И. А., Титов А. Ф. Динамика теплоустойчивости проростков пшеницы в зависимости от интенсивности высокотемпературного воздействия // Труды КарНЦ РАН. 2014. № 5. С. 214–217.
- Панасенко О. О., Ким М. В., Гусев Н. Б. Структура и свойства малых белков теплового шока // Успехи биологической химии. 2003. Т. 43. С. 59–98.
- Рихванов Е. Г., Федосеева И. В., Пятрикас Д. В. и др. Механизм функционирования кальциевой сигнальной системы у растений при действии теплового

стресса. Роль митохондрий в этом процессе // Физиология растений. 2014. Т. 61, № 2. С. 155–169. doi: 10.7868/S0015330314020134.

Титов А. Ф., Акимова Т. В., Таланова В. В., Топчиева Л. В. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. М.: Наука, 2006. 143 с.

Топчиева Л. В. Сравнительное изучение реакции растений на действие высоких закалывающих и повреждающих температур: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 1994. 19 с.

Федяева А. В. Продукция активных форм кислорода и митохондриальный потенциал при температурном воздействии в клетках растений и дрожжей: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Иркутск, 2015. 23 с.

Хохлова Л. П., Валиуллина Р. Н., Мидер Д. Р., Акберова Н. И. Термостабильность мембран и экспрессия генов низкомолекулярных белков теплового шока (мБТШ) при действии на растения повышенных температур и водного дефицита // Биологические мембраны. 2015. Т. 32, № 1. С. 59–71. doi: 10.7868150233475515010065.

Al-Whaibi M. H. Plant heat-shock proteins: A mini review // Journal of King Saud University – Science. 2011. No 23. P. 139–150. doi: 10.1016/j.jksus.2010.06.002.

Basha E., O'Neill H., Vierling E. Small heat shock proteins and α -crystallins: dynamic proteins with flexible functions // Trends Biochem. Sci. 2012. Vol. 37. P. 106–117.

Bita C. E., Gerats T. Plant tolerance to high temperature in changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops // J. Frontiers in plant science. Crop science and horticulture. 2013. Vol. 4. P. 1–18. doi: 10.3389/fpls.2013.00273.

Boorstein W. R., Ziegelhoffer Th., Craig E. A. Molecular evolution of the HSP70 multigene family // J. Mol. Evol. 1994. P. 1–17.

Chen Q., Lauzon L. M., DeRocher A. E., Vierling E. Accumulation, stability, and localization of a major chloroplast heat-shock protein // J. Cell. Biol. 1990. Vol. 110, No 6. P. 1873–1883.

Cho E. K., Hong Ch. B. Over-expression of tobacco NtHSP70–1 contributes to drought-stress tolerance in plants // Physiology and biochemistry. 2006. P. 349–358. doi: 10.1007/s00299-005-0093-2.

DeRocher A. E., Helm K. W., Lauzon L. M., Vierling E. Expression of a conserved family of cytoplasmic low molecular weight heat stress proteins during heat stress and recovery // Plant Physiol. 1991. Vol. 96, No 4. P. 1038–1047.

Gou M., Zhai Yu., Lu Ji. et al. Characterization of *CaHsp70–1*, a Pepper heat-shock protein gene in response to heat stress and some regulation exogenous substances in *Capsicum annuum* L. // Int. J. Mol. Sci. 2014. P. 19741–19759. doi: 10.3390/ijms151119741.

Gulli M., Corradi M., Rampino P. et al. Four members of the HSP101 gene family are differently regulated in *Triticum durum* Desf. // FEBS letters. 2007. P. 4841–4849. doi: 10.1016/j.febslet.2007.09.010.

Hasanuzzaman M., Nahar K., Alam M. M. et al. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of

heat stress tolerance in plants // Int. J. Mol. Sci. 2013. P. 9643–9684. doi: 10.3390/ijms14059643.

Huerta C., Freire M., Cardemil L. Expression of *hsp70*, *hsp100* and *ubiquitin* in *Aloe barbadensis* Miller under direct heat stress and under temperature acclimation conditions // Plant cell Rep. 2013. P. 293–307. doi: 10.1007/s00299-012-1363-4.

Jiang C., Xu J., Zhang H. et al. A cytosolic class I small heat shock protein, RcHSP17.8, of *Rosa chinensis* confers resistance to a variety of stresses to *Escherichia coli*, yeast and *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell Environ. 2009. Vol. 32. P. 1046–1059. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.01987.x.

Kim D. H., Xu Z.-Y., Na Y. J. et al. Small heat shock protein Hsp17.8 functions as an AKR2A cofactor in the targeting of chloroplast outer membrane proteins in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2011. Vol. 157. P. 132–146. doi: 10.1104/pp.111.178681.

Kumar R. R., Singh G. P., Goswami S. et al. Proteome analysis of wheat (*Triticum aestivum* L.) for the identification of differentially expressed heat-responsive proteins // AJCS. 2014. P. 973–986.

Li J., Wang Zh., Peng H., Liu Zh. A MITE insertion into the 3'-UTR regulates the transcription of *TaHSP16.9* in common wheat // The Crop Journal. 2014. P. 381–387. doi: 10.16/j.cj.2014.07.001.

Li Q. B., Haskell D. W., Guy Ch. L. Coordinate and non-coordinate expression of the stress 70 family and other molecular chaperones at high and low temperature in spinach and tomato // Plant Molecular Biology. 1999. P. 21–34.

Lund A. A., Blum P. H., Bhatramakki D., Elthon T. E. Heat-Stress response of maize mitochondria // Plant Physiol. 1998. Vol. 116. P. 1097–1110.

Malik M. K., Slovin J. P., Hwang C. H., Zimmerman J. L. Modified expression of a carrot small heat shock protein gene, *hsp17.7*, results in increased or decreased thermotolerance // Plant J. 1999. Vol. 20. P. 89–99.

Mittler R., Finka A., Goloubinoff P. How plants feel the heat? // Trends in Biochemical Science. 2012. Vol. 37, No 3. doi: 10.16/j.tibs.2011.11.007.

Montero-Barrientos M., Hermosa R., Cardoza R. E. et al. Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum hsp70* gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stress // Journal of Plant Physiology. 2010. P. 659–665. doi: 10.1016/j.jplph.2009.11.012.

Mu Ch., Zhang Sh., Yu G. et al. Overexpression of small heat shock protein LimHSP16.45 in *Arabidopsis* enhances tolerance to abiotic stresses // PLOS ONE. 2013. Vol. 8. doi: 10.1371/journal.pone.0082264.

Necchi A., Pogna N. E., Mapelli J. Early and late heat shock proteins in wheats and other cereal species // Plant Physiol. 1987. Vol. 84, No 4. P. 1378–1384.

Park H. J., Jung W. Yo., Lee S. S. et al. Use of stress responsive gene expression levels for early selection of heat tolerant cabbage (*Brassica oleracea* L.) // J. Mol. Sci. 2013. P. 1187–11894. doi: 10.3390/ijms140611871.

Qu A., Ding Y., Jiang Q., Zhu Ch. Molecular mechanisms of the plant heat stress response // Biochemical and biophysical research communications. 2013. P. 203–207.

Sanmiya K., Suzuki K., Egawa Y., Shono M. Mitochondrial small heat shock protein enhances thermotolerance in tobacco plants // *FEBS Lett.* 2004. Vol. 557. P. 265–268.

Sarkar N. K., Kim Y. K., Grover A. Rice sHsp genes: genomic organization and expression profiling under stress and development // *BMC Genomics.* 2009. doi: 10.1186/1471-2164-10-393.

Scarpeci E. T., Zanor M. I., Valle E. M. Investigation the role of plant heat shock proteins during oxidative stress // *Plant signaling and behavior.* 2008. Vol. 3. P. 856–857. doi: 10.1007/s11103-007-9274-4.

Song A., Zhu X., Chen F. et al. A Chrysanthemum heat shock protein confers tolerance to abiotic stress // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. P. 5063–5078. doi: 10.3390/ijms15035063.

Sun W. N., Bernard C., van de Cotte B. et al. At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in Arabidopsis, can enhance osmotolerance upon overexpression // *Plant J.* 2001. Vol. 27. P. 407–415.

Sung D. Y., Vierling E., Guy Ch. L. Comprehensive expression profile analysis of the Arabidopsis Hsp70 gene family // *Plant Physiology.* 2001. Vol. 126. P. 789–800.

Usman M. G., Rafii M. Y., Ismail M. R. et al. Heat shock proteins: functions and response against heat stress in plants // *IJSTR.* 2014. Vol. 3, iss. 11. P. 204–218.

Wahid A., Gelani S., Ashraf M., Foolad M. R. Heat tolerance in plants: An overview // *J. Environmental and Experimental Botany.* 2007. Vol. 61. P. 199–223.

Waters E. R., Lee G. J., Vierling E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants // *Journal of experimental botany.* 1996. Vol. 47. No 296. P. 325–338.

Yen Ch. H., Chang P. F. L., Yen K. W. et al. Expression of a gene encoding a 16.9-kDa heat-shock protein Oshsp16.9, in *Escherichia coli* enhance thermotolerance // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. Vol. 94. P. 10967–10972.

Поступила в редакцию 11.09.2015

References

Aleksandrov V. Ja. Citofiziologicheskie i citojekologicheskie issledovaniya ustojchivosti rastitel'nyh kletok k dejstvuju vysokih temperature [Cytophysiological and cytoecological study of plant cells tolerance to high temperatures]. *Tr. Botan. in-ta AN SSSR [Proc. Botan. Inst. Acad. Sci. USSR]*. 1963. Vol. 4. P. 234–280.

Kozeko L. E. Belki teplovogo shoka 90 kDa: raznobraziye struktura i funkcii [Heat shock proteins 90 kDa: diversity, structure, functions]. *Citologija.* 2010. Vol. 52, No 11. P. 893–910.

Kolupaev Ju. E., Karpec Ju. V. Formirovanie adaptivnyh reakcij rastenij na dejstvie abioticheskikh stressorov [Formation of plants adaptive reaction to abiotic stressors influence]. Kiev: Osнова, 2010. 351 p.

Larher V. Jekologija rastenij [Plant ecology]. Moscow: Mir, 1978. 384 p.

Nilova I. A., Titov A. F. Dinamika teploustojchivosti prorostkov pshenicy v zavisimosti ot intensivnosti vysokotemperaturnogo vozdejstviya [The dynamics of thermotolerance in wheat plants depending on the intensity of high temperature influence]. *Trudy KarNC RAN [Transactions of KarRC RAS]*. 2014. No 5. P. 214–217.

Panasenko O. O., Kim M. V., Gusev N. B. Struktura i svojstva malyh belkov teplovogo shoka [Structure and properties of small heat shock proteins]. *Uspehi biologicheskoy himii [Biochemistry. Spec. Iss. Biological Chem. Rev.]*. 2003. Vol. 43. P. 59–98.

Rihvanov E. G., Fedoseeva I. V., Pjatrikas D. V., Borovskij G. B., Vojnikov V. K. Mehanizm funkcionirovaniya kal'cievoj signal'noj sistemy u rastenij pri dejstvii teplovogo stressa. Rol' mitohondrii v jetom processe [Role of mitochondria in the operation of calcium signaling system in heat-stressed plants]. *Fiziologija rastenij [Russ. J. Plant Physiol.]*. 2014. Vol. 61, No 2. P. 155–169. doi: 10.7868/S0015330314020134.

Titov A. F., Akimova T. V., Talanova V. V., Topchieva L. V. Ustojchivost' rastenij v nachal'nyj period dejstvija neblagoprijatnyh temperatur [Plant resistance in

the initial period of unfavourable temperatures effects]. Moscow: Nauka, 2006. 143 p.

Topchieva L. V. Sravnitel'noe izuchenie reakcii rastenij na dejstvie vysokih zakalivajushih i povrezhdajushih temperature [Comparative study of the response of plants to the effects of high hardening and damaging temperatures]: PhD Diss. (Biol.). Petrozavodsk, 1994. 19 p.

Fedjaeva A. V. Produkcija aktivnyh form kisloroda i mitohondrial'nyj potencial pri temperaturnom vozdejstvii v kletkah rastenij i drozhzhej [Production of reactive oxygen and mitochondrial membrane potential in plant cells and yeast under temperature effects]: PhD Diss. (Biol.). Irkutsk, 2015. 23 p.

Hohlova L. P., Valiullina R. N., Mider D. R., Akberova N. I. Termostabil'nost' membran i jekspressija genov nizkomolekuljarnyh belkov teplovogo shoka (mB-TSh) pri dejstvii na rastenija povyshennyh temperatur i vodnogo deficita [Membrane thermostability and gene expression of small heat shock protein (sHSP) in wheat shoots exposed to elevated temperatures and water deficiency]. *Biologicheskie membrany [Biological membranes]*. 2015. Vol. 32, No 1. P. 59–71. doi: 10.7868150233475515010065.

Al-Whaibi M. H. Plant heat-shock proteins: A mini review. *Journal of King Saud University – Science.* 2011. No 23. P. 139–150. doi: 10.1016/j.jksus.2010.06.002.

Basha E., O'Neill H., Vierling E. Small heat shock proteins and α -crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends Biochem. Sci.* 2012. Vol. 37. P. 106–117.

Bitá C. E., Gerats T. Plant tolerance to high temperature in changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *J. Frontiers in plant science. Crop science and horticulture.* 2013. Vol. 4. P. 1–18. doi: 10.3389/fpls.2013.00273.

Boorstein W. R., Ziegelhoffer Th., Craig E. A. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J. Mol. Evol.* 1994. P. 1–17.

- Chen Q., Lauzon L. M., DeRocher A. E., Vierling E. Accumulation, stability, and localization of a major chloroplast heat-shock protein. *J. Cell Biol.* 1990. Vol. 110, No 6. P. 1873–1883.
- Cho E. K., Hong Ch. B. Over-expression of tobacco NtHSP70–1 contributes to drought-stress tolerance in plants. *Physiology and Biochemistry.* 2006. P. 349–358. doi: 10.1007/s00299-005-0093-2.
- DeRocher A. E., Helm K. W., Lauzon L. M., Vierling E. Expression of a conserved family of cytoplasmic low molecular weight heat stress proteins during heat stress and recovery. *Plant Physiol.* 1991. Vol. 96, No 4. P. 1038–1047.
- Gou M., Zhai Yu., Lu Ji., Chai L., Chai W., Gong Zh., Lu M. Characterization of *CaHsp70–1*, a Pepper heat-shock protein gene in response to heat stress and some regulation exogenous substances in *Capsicum annuum* L. *Int. J. Mol. Sci.* 2014. P. 19741–19759. doi: 10.3390/ijms151119741.
- Gulli M., Corradi M., Rampino P., Marmioli N., Perrotta C. Four members of the HSP101 gene family are differently regulated in *Triticum durum* Desf. *FEBS letters.* 2007. P. 4841–4849. doi: 10.1016/j.febslet.2007.09.010.
- Hasanuzzaman M., Nahar K., Alam M. M., Roychowdhury R., Fujita M. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2013. P. 9643–9684. doi: 10.3390/ijms14059643.
- Huerta C., Freire M., Cardemil L. Expression of *hsp70*, *hsp100* and *ubiquitin* in *Aloe barbadensis* Miller under direct heat stress and under temperature acclimation conditions. *Plant Cell Rep.* 2013. P. 293–307. doi: 10.1007/s00299-012-1363-4.
- Jiang C., Xu J., Zhang H., Zhang X., Shi J., Li M., Ming F. A cytosolic class I small heat shock protein, RcHSP17.8, of *Rosa chinensis* confers resistance to a variety of stresses to *Escherichia coli*, yeast and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 2009. Vol. 32. P. 1046–1059. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.01987.x.
- Kim D. H., Xu Z.-Y., Na Y. J., Yoo Y.-J., Lee J., Sohn E.-J., Hwang I. Small heat shock protein Hsp17.8 functions as an AKR2A cofactor in the targeting of chloroplast outer membrane proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2011. Vol. 157. P. 132–146. doi: 10.1104/pp.111.178681.
- Kumar R. R., Singh G. P., Goswami S., Pathak H., Rai R. D. Proteome analysis of wheat (*Triticum aestivum* L.) for the identification of differentially expressed heat-responsive proteins. *AJCS.* 2014. P. 973–986.
- Li J., Wang Zh., Peng H., Liu Zh. A MITE insertion into the 3'-UTR regulates the transcription of *TaHSP16.9* in common wheat. *The Crop Journal.* 2014. P. 381–387. doi: 10.16/j.cj.2014.07.001.
- Li Q. B., Haskell D. W., Guy Ch. L. Coordinate and non-coordinate expression of the stress 70 family and other molecular chaperones at high and low temperature in spinach and tomato. *Plant Molecular Biology.* 1999. P. 21–34.
- Lund A. A., Blum P. H., Bhatramakki D., Elthon T. E. Heat-Stress response of maize mitochondria. *Plant Physiol.* 1998. Vol. 116. P. 1097–1110.
- Malik M. K., Slovin J. P., Hwang C. H., Zimmerman J. L. Modified expression of a carrot small heat shock protein gene, *hsp17.7*, results in increased or decreased thermotolerance. *Plant J.* 1999. Vol. 20. P. 89–99.
- Mittler R., Finka A., Goloubinoff P. How plants feel the heat? *Trends in Biochemical Science.* 2012. Vol. 37, No 3. doi: 10.1016/j.tibs.2011.11.007.
- Montero-Barrientos M., Hermosa R., Cardoza R. E., Gutierrez S., Nicolas C., Monte E. Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum hsp70* gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stress. *Journal of Plant Physiology.* 2010. P. 659–665. doi: 10.1016/j.jplph.2009.11.012.
- Mu Ch., Zhang Sh., Yu G., Ni Ch., Li X., Liu H. Over-expression of small heat shock protein LimHSP16.45 in *Arabidopsis* enhances tolerance to abiotic stresses. *PLOS ONE.* 2013. Vol. 8. doi: 10.1371/journal.pone.0082264.
- Necchi A., Pogna N. E., Mapelli J. Early and late heat shock proteins in wheats and other cereal species. *Plant Physiol.* 1987. Vol. 84, No 4. P. 1378–1384.
- Park H. J., Jung W. Yo., Lee S. S., Song J. H., Kwon S., Kim H., Kim Ch., Ahn J. Ch., Cho H. S. Use of stress responsive gene expression levels for early selection of heat tolerant cabbage (*Brassica oleracea* L.). *J. Mol. Sci.* 2013. P. 1187–11894. doi: 10.3390/ijms140611871.
- Qu A., Ding Y., Jiang Q., Zhu Ch. Molecular mechanisms of the plant heat stress response. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2013. P. 203–207.
- Sanmiya K., Suzuki K., Egawa Y., Shono M. Mitochondrial small heat shock protein enhances thermotolerance in tobacco plants. *FEBS Lett.* 2004. Vol. 557. P. 265–268.
- Sarkar N. K., Kim Y. K., Grover A. Rice sHsp genes: genomic organization and expression profiling under stress and development. *BMC Genomics.* 2009. doi: 10.1186/1471-2164-10-393.
- Scarpeci E. T., Zanol M. I., Valle E. M. Investigation the role of plant heat shock proteins during oxidative stress. *Plant signaling and behavior.* 2008. Vol. 3. P. 856–857. doi: 10.1007/s11103-007-9274-4.
- Song A., Zhu X., Chen F., Gao H., Jiang Ji., Chen S. A *Chrysanthemum* heat shock protein confers tolerance to abiotic stress. *Int. J. Mol. Sci.* 2014. P. 5063–5078. doi: 10.3390/ijms15035063.
- Sun W. N., Bernard C., van de Cotte B., Van Montagu M., Verbruggen N. At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression. *Plant J.* 2001. Vol. 27. P. 407–415.
- Sung D. Y., Vierling E., Guy Ch. L. Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* Hsp70 gene family. *Plant Physiology.* 2001. Vol. 126. P. 789–800.
- Usman M. G., Rafii M. Y., Ismail M. R., Malek M. A., Latif M. Ab., Oladosu Yu. Heat shock proteins: functions and response against heat stress in plants. *IJSTR.* 2014. Vol. 3, iss. 11. P. 204–218.
- Wahid A., Gelani S., Ashraf M., Floodad M. R. Heat tolerance in plants: An overview. *J. Environmental and Experimental Botany.* 2007. Vol. 61. P. 199–223.
- Waters E. R., Lee G. J., Vierling E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in

plants. *Journal of Experimental Botany*. 1996. Vol. 47, No. 296. P. 325–338.

Yen Ch. H., Chang P. F. L., Yen K. W., Lin W. Ch., Chen Y. M., Lin Ch. Yu. Expression of a gene encoding a 16.9-kDa heat-shock protein Oshsp16.9, in

Escherichia coli enhance thermotolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. Vol. 94. P. 10967–10972.

Received September 11, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Нилова Ирина Александровна

младший научный сотрудник
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: im-ira@mail.ru
тел.: (8142) 762712

Топчиева Людмила Владимировна

ведущий научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: topchieva67@mail.ru
тел.: (8142) 769810

Титов Александр Федорович

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

CONTRIBUTORS:

Nilova, Irina

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

Topchieva, Lyudmila

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: topchieva67@mail.ru
tel.: (8142) 769810

Titov, Alexandr

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

УДК 582.632:581.132:581.52

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЫХАНИЯ ВЕТВЕЙ И СТВОЛОВ КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ И БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ

В. К. Болондинский, Л. М. Виликайнен

Институт леса Карельского научного центра РАН

В ходе вегетации изучали дыхание стволов и ветвей двух форм деревьев *Betula pendula* Roth: обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) и карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*). Исследовались 4–6-летние деревья, а также 2–3-летние саженцы, выращенные в сосудах. Среди объектов карельской березы встречались экземпляры как без видимых отклонений от нормального роста, так и со структурными аномалиями ствола. Наряду с зависимостью от внешних факторов среды (в основном температуры) наблюдалась тесная связь дыхания с деятельностью камбия и ростом ствола в толщину. В период до камбиального роста (июнь) средние величины дыхания у ветвей и стволиков саженцев диаметром 10–14 мм составляли у березы повислой (БП) и карельской березы (БК) соответственно 4,6 и 5,3 мкмоль·м⁻²·с⁻¹, во время камбиального роста (конец июня – первая половина августа) – 12,3 и 17,6 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ и в период торможения роста (вторая половина августа – начало сентября) – 2,6 и 3,1 мкмоль·м⁻²·с⁻¹. Наибольшие величины дыхания у БП и БК были зафиксированы в конце июля и составили соответственно 20 и 28 мкмоль·м⁻²·с⁻¹, что превышало по абсолютной величине CO₂-газообмен листьев. Примерно в 30 % случаев дыхание БК было в два раза сильнее, чем дыхание БП. Повышенная интенсивность дыхания у БК по сравнению с БП связана прежде всего с более высокой метаболической активностью в камбиальной зоне у карельской березы и с большим количеством у нее живых дышащих тканей на единицу длины побега у одинаковых по толщине ветвей этих двух форм. Исследование толщины и объема коры ветвей БП и БК показало, что эти параметры у БК на 16–20 % выше, чем у БП. Не обнаружено достоверных различий в дыхании ветвей у 6-летних деревьев карельской березы, уже имевших значительные утолщения ствола, и саженцев со слабо выраженными признаками отклонений от нормального роста. В редких случаях у березы повислой наблюдалось более энергичное дыхание, чем у карельской березы. Проанализированы причины этого явления.

Ключевые слова: *Betula* L.; карельская береза; CO₂-газообмен; дыхание ствола; зависимость от температуры; толщина коры.

V. K. Bolondinsky, L. M. Vilikainen. RESEARCH OF RESPIRATION OF TWIGS AND STEMS IN KARELIAN BIRCH AND SILVER BIRCH

Stem respiration was investigated in two forms of *Betula pendula* Roth [Silver birch (*B. pendula* var. *pendula*) and Karelian birch (*B. pendula* var. *carelica*)]. The study was carried out on 4 to 6-year old trees and 2 to 3-year old pot-grown seedlings. Among Karelian birch there were specimens both without visible deviations from normal growth and with structural anomalies of stems. Stem respiration rate was strongly related to cambial activity and stem diameter growth, along with the environmental factors (mainly temperature). Before cambial growth (in June) mean respiration rates of twigs and stems in seedlings

with diameters of 10–14 mm in Silver birch and Karelian birch were 5.3 and 4.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ respectively, during cambial growth (late June – first half of August) – 12.3 and 17.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, and during the period of growth inhibition (second half of August – early September) – 2.6 and 3.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Maximal respiration rates (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ and 28 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ for Silver birch and Karelian birch, respectively) were registered in late July and were higher (in absolute value) than net CO_2 gas exchange of leaves.

In about 30 % of the measurements the respiration rate in Karelian birch was double that of Silver birch. Higher respiration rate in Karelian birch in comparison with Silver birch is mostly related to higher metabolic activity in the cambial zone and higher amount of living respiring tissues per unit of stem length in stems of the same width in the two birch forms. The measurements showed that the thickness and volume of bark in Karelian birch were higher by 16–20 % than in Silver birch. There were no significant differences in stem respiration of 6-year old Karelian birch trees with visible thickenings of stems and seedlings without visible signs of structural anomalies. In rare cases stem respiration rate was higher in Silver birch than in Karelian birch. The causes of this phenomenon were analyzed.

Key words: *Betula* L.; Karelian birch; CO_2 gas exchange; stem respiration; temperature dependence; bark thickness.

Введение

У живых тканей древесного растения, включая ассимилирующие органы, энергетика обмена веществ и жизнедеятельности обеспечивается не только фотосинтезом, но и процессом дыхания. Фотосинтез в основном служит поставщиком дыхательного материала [Семихатова и др., 2009]. Дыхательная активность растений варьирует в зависимости от вида и жизненной формы [Головки и др., 2009]. Помимо изучения дыхания листьев большой интерес представляет дыхание неассимилирующих органов – ствола и ветвей, поскольку его величина тесным образом связана с оттоком ассимилятов из кроны [Цельникер и др., 1993]. Интерпретация результатов измерения выделения CO_2 с поверхности ствола достаточно сложна, так как ветви и стволы содержат газы, объем и состав которых меняется во времени. Часто неясно, образуются ли они в ходе дыхания или уже содержались в стволе. Большая сложность возникает и при разделении дыхания у древесных растений на функциональные составляющие. Для древесных растений, даже для саженцев, не всегда годятся приемы, разработанные для травянистых растений. Большая доля питательных веществ, образованных деревьями, используется на дыхание нефотосинтезирующих тканей [Цельникер и др., 1993].

Неуклонное увеличение концентрации углекислоты в атмосфере в настоящее время связывают с фундаментальной проблемой устойчивости экосистемы в целом [Rothman, 2002]. Дыхание нефотосинтезирующих частей растений, хотя и уступает общему дыханию почвы, играет существенную роль в формировании

углеродного баланса биогеоценоза и может составлять для разных регионов от 4 до 22 % [Goulden et al., 1996]. По другим оценкам, вклад дыхания ствола в общий бюджет углерода наземной части спелого древостоя составляет от 13 % [Ryan, Waring, 1992] до 42 % [Waring, Schlesinger, 1985]. Береза – широко распространенная лесообразующая порода, на которой исследуется не только CO_2 -газообмен листьев, но достаточно часто и газообмен стволов и ветвей [Kunstle, Mitcherlich, 1976; Цельникер и др., 1993; Wittmann et al., 2006; Wittmann, Pfantz, 2007; Fang, Wang, 1995; Matyssek et al., 2002]. В расходной части углекислотного газообмена насаждения выделение углекислоты стволами древесных растений составляет значительную величину, так как биомасса стволов занимает существенную часть древостоя. Интенсивность дыхания стволов варьирует в зависимости от породы и возраста дерева, сезона и других биогенных и абиогенных факторов [Lavigne, 1996; Забуга, Забуга, 2005]. Дыхание может потреблять от 11 до 70 % углерода, фиксированного растениями при фотосинтезе [Waring, Schlesinger, 1985; Ryan, 1991].

Дыхание стволов и ветвей в ростовой период характеризуется высокой интенсивностью, которая в расчете на единицу поверхности иногда значительно превосходит интенсивность дыхания листьев. Кроме того, оно зависит от состояния растений [Цельникер и др., 1993]. Интенсивность дыхания стволов сосны обыкновенной в южнотаежных сосняках Нижнего Приангарья составила от 1,0 до 11,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Анализ, проведенный на группах деревьев со сходной интенсивностью дыхания ствола, показал, что среднее дыхание ствола в группе

здоровых деревьев в 1,5–1,6 раза превышало дыхание ослабленных и сильно ослабленных деревьев [Масягина и др., 2007].

Колебания температуры в стволе связаны с объемом и составом газовой фазы в древесине, что может вызвать либо избыточное выделение, либо, наоборот, поглощение углекислого газа стволом. При резком падении температуры воздуха на 5–10 °С возникает значительный градиент между температурами ствола и окружающего воздуха, что в свою очередь может привести к резкому увеличению выделения CO₂ из ствола [Цельникер и др., 1993]. Дыхание ствола имеет суточную ритмику и колеблется в течение вегетационного периода [Kunstle, Mitcherlich, 1976]. Наряду с зависимостью от внешних факторов среды (в основном температуры) наблюдается тесная связь дыхания с деятельностью камбия и ростом ствола в толщину [Negisi, 1981; Забуга, Забуга, 2005; Татаринев и др., 2011].

Физиолого-биохимические исследования обменных процессов у узорчатых растений карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*) и обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) показали, что они имеют свои особенности, в основном связанные с накоплением запасных форм метаболитов. Высказано предположение, что причиной расстройства нормальной ритмики камбиальной активности является избыток количества поступающей в ткань сахарозы [Новицкая, 2008], которое достаточно тесно связано с интенсивностью CO₂-газообмена в кроне дерева. Однако исследования в природных условиях, проводимые в течение длительного времени, не показали достоверных различий в средних величинах фотосинтеза между этими формами березы повислой [Болондинский, 2010; Болондинский, Виликайнен, 2011].

Возрастание содержания сахарозы во флоэме *БК* связывают с низкой активностью сахарозосинтазы в период камбиального роста [Галибина и др., 2015]. Это снижает акцепторные способности тканей ксилемы, приводя к изменению программы развития клеток в камбиальной зоне, что может отразиться на величинах дыхания ствола и ветвей. Поскольку у *БК* наряду со значительным увеличением объемов коры имеются и другие пути утилизации избыточных ассимилятов [Новицкая, 2008], энергетика процессов в прикамбиальной зоне может существенно отличаться по сравнению с *БП*, что отразится на дыхании тканей ствола и ветвей. Представляет интерес исследовать этот процесс у карельской березы в сравнении с березой повислой на разных этапах вегетации,

влияние на него температуры, дефицита водяного пара в воздухе и других факторов внешней среды.

Материалы и методы

Работу проводили на территории Агробиологической станции Института биологии КарНЦ РАН, находящейся на южной окраине г. Петрозаводска (61°47' с. ш., 34°21' в. д.). 3-летние растения берез в мае 2005 г. были посажены в грунт. Участок располагался на месте бывшей теплицы. Верхние горизонты почвы до 50 см содержали смесь торфа и песка. Горизонт 60–70 см представляет собой глину, смешанную с песком.

В качестве экспериментальных использовались растущие рядом шесть 4–5-летних деревьев *БП* и *БК*, а также несколько деревьев карельской березы с разной степенью выраженности характерных признаков. Исследования проводились в 2007–2011 гг. в фазу интенсивного роста (июль), окончания роста (август) и во время перехода к периоду покоя (сентябрь). К началу эксперимента (июль 2007) 2-, 4-, и 6-летние деревья березы повислой и карельской березы имели высоту 0,8; 1,5 и 2,5 метра соответственно. Кроме того, в августе–сентябре 2010–2011 гг. велись исследования на 3-летних саженцах, которые росли в 10-литровых вегетационных сосудах. Их стволы имели диаметр от 12 до 14 мм в 10 см от корневой шейки и высоту около 1 м.

Сосуды ставили на подставку высотой 60 см. Расстояние от камеры до почвы составляло примерно 1 м. Измерения дыхания саженцев, растущих на грядках, проводили ограниченно, так как в приземном слое воздуха концентрация углекислоты изменялась в безветренную погоду от 400 до 800 мкмоль·моль⁻¹ (ppm), что создавало определенные методические трудности.

Основную часть измерений интенсивности темного дыхания ветвей и стволов проводили с помощью газометрической системы Li-6200 (Li-Cor, USA) с использованием камеры оригинальной конструкции, изготовленной из дюралюминия (рис. 1). Длина камеры 128 мм. В камеру помещалась часть ветви или стволика диаметром не более 14 мм. Пространство между стволиком и отверстием камеры заделывалось герметиком. Ассимиляционная камера Li-6200 также подключалась, чтобы ее датчиками измерять ФАР, температуру и относительную влажность воздуха.

Измерения начинали при концентрации в камере CO₂, близкой к его концентрации



Рис. 1. Камера из дюралюминия для измерения темнового дыхания ветвей

в окружающем воздухе. Делали по три измерения, каждое продолжительностью 10 сек. Измерения осуществлялись по замкнутому циклу, в связи с чем концентрация углекислоты в камере повышалась и ее приходилось проветривать перед каждым запуском. На каждой ветви или стволике производилось не менее пяти серий измерений в течение 10–15 минут, после чего камеру переустанавливали на следующий объект. Если мы делали замеры без проветривания камеры, концентрация CO_2 в ней росла и через некоторое время достигала насыщающего значения – компенсационной точки, при которой выделение CO_2 в камеру прекращалось. При высоком уровне дыхания концентрация CO_2 в камере доходила за 7–8 серий измерений до 1200–1300 ppm. По мере роста количества углекислоты в камере до таких величин темновое дыхание снижаться не должно, и выделяемая живыми тканями углекислота, по всей вероятности, диффундировала в ксилему или в приграничные области коры. Для анализа мы старались использовать данные, полученные при первых измерениях дыхания, когда концентрация углекислоты в камере была близка к окружающей.

Эксперименты в основном проводили в дневной динамике с 12 до 18 часов в малооблачные дни. При этом часть ветви дерева, на которой устанавливалась камера, обычно находилась в тени. Температура поверхности ствола при отсутствии попадания прямых солнечных лучей была близка к температуре окружающего воздуха. Однако в процессе измерения воздух прокачивали в камеру через газоанализатор, и он нагревался на 3–4 °С. При кратковременных измерениях с частыми проветриваниями камеры температура поверхностных тканей ствола увеличивалась незначительно, но при определении углекислотного компенсационного пункта, когда камера не проветривалась

в течение 15–20 минут, температура коры возрастала. Данное обстоятельство могло привести к усилению дыхания, что вносило определенную погрешность при расчете компенсационной точки – величины концентрации CO_2 в камере, когда выделение углекислоты из ствола отсутствовало.

Внешние факторы среды измеряли стандартными методами, солнечную радиацию – пиранометром Янишевского. Использовались также датчики Li-6200. Температуру поверхности ствола определяли с помощью термопары медь–константан.

Коэффициент Вант-Гоффа (Q_{10}) для темнового дыхания листьев рассчитывали по формуле: $Q_{10} = (R_a / R_b)^{10/(T_a - T_b)}$, где R_a и R_b – значения интенсивности дыхания, измеренной соответственно при температуре T_a и T_b .

Дефицит давления водяного пара в воздухе (D) рассчитывали по формуле:

$D = E_w (1 - H / 100)$, где E_w – насыщающая упругость водяного пара над водой, H – относительная влажность воздуха.

Для определения площади коры, ее толщины, объема и других параметров измерялись диаметры свежесрезанных побегов березы в коре и без коры. Ветка разрезалась на 5–10-см отрезки. Обычно исследовались ветви с минимальным диаметром 5 мм и с максимальным 20 мм. По известным формулам вычислялся объем отрезка с корой и без коры. Поскольку сечение ветки, особенно у березы карельской, не является идеальным кругом, штангенциркулем делали до трех замеров, по которым вычислялся средний диаметр. Для контроля данных объема коры в мерном цилиндре с водой измерялся объем веток с корой и без коры. Сравнение объемов, полученных двумя способами, показало, что разница не превышала 10 %. Второй способ определения объема более точный, но размеры площади и толщины коры нужно все равно рассчитывать, используя данные диаметров.

Обработку результатов проводили в среде Microsoft Office Excel 2003. Проверку гипотез и оценку существенных различий между средними величинами осуществляли с помощью критерия Стьюдента при 5-процентном уровне значимости.

Результаты и обсуждение

Дыхание ветвей 5–6-летних саженцев

Основная часть работы была выполнена на ветвях 5–6-летних саженцев, которые, произрастая на хорошо удобренной почве,

представляли собой 3–4-метровые деревья с ветвями диаметром до 20 мм у основания ствола. Весь вегетационный сезон, как это сделано в работе Ю. Л. Цельникер с соавторами [1993], мы разбивали на периоды, различающиеся по физиологической активности кроны и камбия. Каждому из них соответствовала определенная дыхательная активность ветвей. Первый период – от начала набухания почек до достижения листьями брахибластов и самыми первыми листьями ауксибластов своей максимальной величины – характеризовался низкими величинами дыхания. В этот период нами было сделано всего несколько замеров дыхания с конца мая до середины июня. Максимальные величины дыхания были менее $6 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Измерения в этот период проводились при умеренной температуре воздуха, не превышавшей $18 \text{ }^\circ\text{C}$. Ночью температура колебалась в пределах $3\text{--}5 \text{ }^\circ\text{C}$. Возможно, из-за этого, а также из-за малого количества измерений не было выявлено каких-либо достоверных различий в средних величинах дыхания у *БП* и *БК*. Максимальные величины дыхания были несколько выше у *БК* по сравнению с *БП*.

Дыхание ветвей с начала распускания листьев до окончания роста брахибластов было довольно стабильным – $4,6$ и $5,3 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ у *БП* и *БК* соответственно. При этом стандартное отклонение не превышало 10 % от средних величин. Первые листья ауксибластов к середине июня имели площадь менее 6 см^2 и далее росли крайне медленно. Известно, что во время роста листы первой генерации экспорт ассимилятов из кроны низок [Цельникер и др., 1993]. Основное количество ассимилятов шло на рост побегов и новых листьев. Известно, что у березы в отличие от других лиственных пород повышение интенсивности дыхания весной начинается с запозданием, поскольку эта порода относится к рассеянопорovým [Сукачев, 1940]. Начало образования новых клеток камбия относительно сроков раскрытия почек запаздывает у них на 2–3 недели. У кольцевопорových пород (дуб, хвойные породы) активация камбия наступает раньше распускания почек [Антонова, Шебеко, 1986]. Но усиление дыхания у березы в начале вегетации происходит обычно раньше, чем у других пород, из-за более раннего начала экспорта ассимилятов. При этом в целом у березы наблюдается тесная связь между дыханием ветвей и экспортом ассимилятов [Цельникер и др., 1993].

Второй период начинался во вторую декаду июня, а при неблагоприятных условиях – в третью декаду, и продолжался до второй половины, а иногда даже до конца августа. Он

совпадал с максимальной активностью камбия, которой соответствовала высокая дыхательная способность ветвей. Основные наши измерения были сделаны именно в этот период. Уже в начале июля, когда был развернут ассимиляционный аппарат, дыхание ветвей превышало $10 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ и далее возрастало, что говорит об активной деятельности камбия. Средние величины дыхания в первую половину июля у *БП* и *БК* различались не более чем на 30 %. Во вторую половину июля средние величины дыхания ветвей у *БП* и *БК* составили соответственно 15 и $24 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. На некоторых ветвях разница составляла более 100 %. В этот период достигались и наибольшие величины дыхания *БП* и *БК*.

Имеются данные, что в период интенсивных ростовых процессов суточная динамика дыхания стволов дуба близко соответствует динамике содержания восстановленных сахаров в стволе [Edwards, McLaughlin, 1978]. Таким образом, дыхание сопряжено с процессами метаболизма в ветвях и стволе, а также с синхронизированными с ними ростовыми процессами. В ряде экспериментов показана связь дыхания ствола с ритмами оттока ассимилятов [Цельникер и др., 1993].

При анализе зависимости интенсивности дыхания ветвей от их диаметра нами было обнаружено, что дыхание значительно усиливалось при уменьшении диаметра ветви. Если при диаметре ветки 11–12 мм в среднем оно составляло около $15 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, то при диаметре этой же ветки 6–7 мм – $21 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Тонкие ветки, как правило, находились ближе к периферии кроны и имели меньший возраст (2–3 года), в то время как 12-мм ветки были 4–5-летние. Так как тонкие ветки труднее герметизировать при помещении в камеру, основная масса измерений была сделана на ветках диаметром 10–12 мм. Увеличение интенсивности дыхания у 6–7-мм веток, по сравнению с 12-мм, скорее всего, связано с тем, что у первых значительно больше относительная величина живых тканей. У 4–7-летних веток живые ткани составляют меньшую часть. Подобное отмечали Кюнстле и Миттчерлих [Kunstle, Mitcherlich, 1976] на сосне, где дыхание при трехкратном увеличении возраста падало более чем в четыре раза. Эти же авторы отмечают более высокую активность дыхания ветвей, нежели ствола.

Одной из причин значительных градиентов выделения углекислоты по ветви от ствола к периферии, возможно, является перенос CO_2 , образовавшегося при дыхании ствола и приствольных участков ветвей,

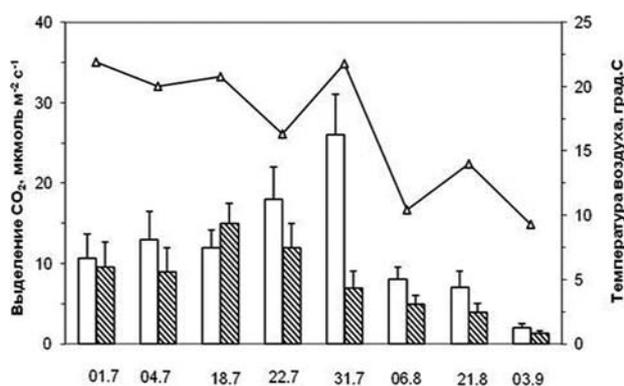


Рис. 2. Сезонная динамика дыхания ветвей у 5–6-летних саженцев карельской березы (белые столбики) и березы повислой (темные столбики) и температура воздуха в моменты измерений (линия).

По оси абсцисс – даты

с транспирационным током и выделением его в верхней части ветви. Но скорее всего, эта углекислота в связи с большим диффузионным сопротивлением для газов тканей, лежащих с наружной стороны камбия, в незначительных количествах выделяется в верхних частях ветви. К такому выводу пришли Линдер и Троенг [Linder, Troeng, 1980]. Наиболее вероятно, что главная причина повышенного выделения CO₂ на периферии ветви по сравнению с ее основанием – неодинаковая ростовая активность этих участков. Имеются данные о неравномерном распределении ростовых гормонов по высоте дерева [Меняйло, 1987].

Таким образом, высокая активность дыхания свойственна участкам ветвей, обладающим высокой метаболической активностью. Пеннинг де Фриз [Penning de Vries, 1975, цит. по Цельникер и др., 1993] рассчитал затраты энергии, необходимой для синтеза различных органических соединений, а также соответствующие этому количеству энергии затраты органических веществ на дыхание. Зная химический состав новообразующейся ткани, можно рассчитать и дыхательные затраты на их рост [Chung, Barnes, 1977]. Оказалось, что на 1 г тканей камбиальной зоны, ксилемы нужно около 1,22 г глюкозы, а на ткани флоэмы – примерно 1,45 г. Но больше всего затрат идет на образование коры. Не исключено, что повышенная интенсивность дыхания, обнаруженная нами у карельской березы, по сравнению с березой повислой, отчасти связана с этим фактором, так как именно у первой наблюдалось усиленное образование коры [Новицкая, 2008].

В отличие от березы повислой, у которой дыхание было более стабильным и достаточно хорошо просматривался его сезонный ритм, у карельской березы этот ритм сильно искажен

труднообъяснимыми скачками (рис. 2). Примерно в 70 % случаев при последовательных замерах у двух форм березы в третью декаду июля активность дыхания у карельской березы была в 1,5–2 раза больше, чем у березы повислой. Очень часто наблюдались скачки дыхания как от ветви к ветви, так и во времени. Одна ветвь давала 18 мкмоль·м⁻²·с⁻¹, другая на этом же дереве – 12 мкмоль·м⁻²·с⁻¹. Через час на одном и том же месте дыхание могло снизиться на 30–40 % без какого-либо изменения внешних факторов среды.

Коэффициент вариации для массива данных, полученных в течение одного дня измерений на разных ветвях двух объектов БП, не превышал 40 %. Дыхание же БК имело значительно большую вариабельность как во времени, так и от ветви к ветви. Отчасти это было связано с различным освещением ветвей. При нахождении ветви в течение 2–3 часов в тени отток ассимилятов из листьев снижался, что сказывалось, как правило, и на дыхании скелетных частей ветви. Однако какой-либо четкой зависимости здесь нам установить не удалось, поскольку имелись исключения. Так, в одном из экспериментов у хорошо освещенной ветви БК с утра до полудня уровень дыхания в дневные часы был ниже, чем у затененной ветви. Поскольку почти все наши измерения проводились в дни, когда деревья не испытывали недостатка в почвенной влаге и отсутствовала атмосферная засуха, полуденная депрессия фотосинтеза носила неярко выраженный характер и не могла явиться причиной снижения интенсивности дыхания.

Несмотря на ярко выраженную тенденцию превышения активности дыхания БК по сравнению с БП, в ряде случаев наблюдались и противоположные явления. Так, во вторую декаду июля при оптимальных внешних условиях средняя величина дыхания у двух из трех ветвей у БК была примерно на 20 % ниже, чем у БП (см. рис. 2). Максимальные же значения отличались еще сильнее. И эта разница сохранялась до вечерних часов. Для того чтобы найти объяснение этому факту, нами были сняты показатели углекислотной зависимости дыхания у побегов березы повислой и березы карельской (рис. 3). Во время измерений камера не проветривалась, и концентрация углекислоты в ней последовательно нарастала. При дыхании флоэмы, камбия и неомертвевших клеток ксилемы, тканей коры углекислый газ диффундирует через поры и чечевички бересты в окружающий воздух. Часть углекислоты может уходить внутрь ствола и растворяться в ксилемном соке. С транспирационным током CO₂ достигает

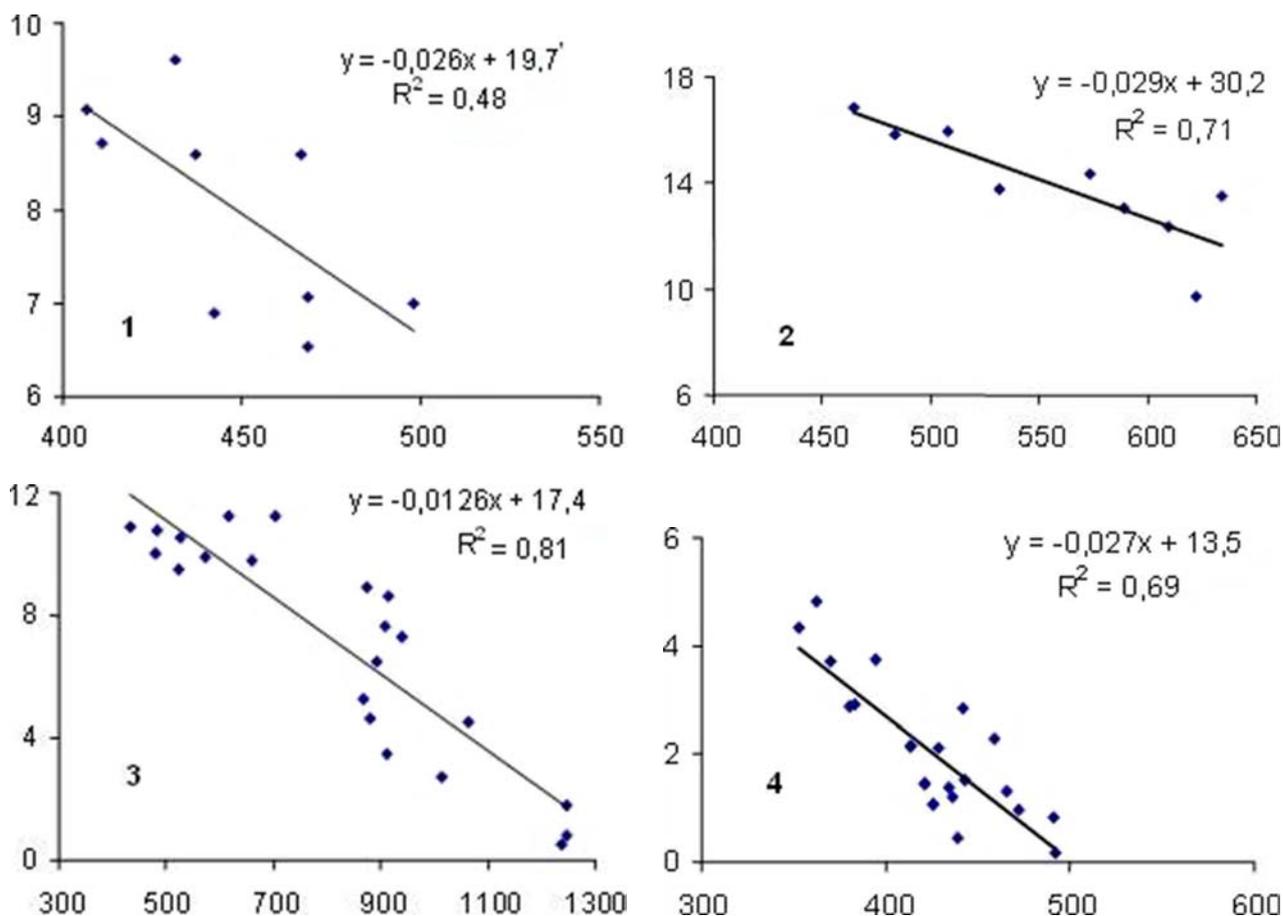


Рис. 3. Углекислотные зависимости дыхания ветвей березы повислой (1, 3) и карельской березы (2, 4).

По оси абсцисс – концентрация CO₂ в камере в мкмоль-моль⁻¹, по оси ординат – выделение веткой CO₂ в мкмоль-м⁻²-с⁻¹. 1, 2 – измерения 01.07.2009, с 17 до 18 часов, T_{воздуха} = 22 °С; 3, 4 – измерения 18.07.2009, с 14 до 15 часов, T_{воздуха} = 24 °С

листьев, где может реассимилироваться. Работы по CO₂ в заболони показывают, что измерения потока CO₂, выходящего из стебля, могут занижать действительные скорости древесного дыхания [Teskey, McGuire, 2002]. Если это так и если CO₂, образующийся в стволе, используется для фотосинтеза листвы или уходит в верхнюю часть ствола, ветви и веточки, мы можем занижить оценку потока CO₂ из ствола. Измерения, проведенные [Ryan et al., 1997], показывают, что возможные занижения этих оценок малы и не должны существенно повлиять на разницу в дыхании. С использованием нескольких методов (измерения pCO₂, pH, температуры и потока ксилемной воды) в литературе оценена доля фотосинтеза, связанная с ксилемным потоком CO₂ [Levy et al., 1999]. Эта оценка показала, что только 3 % фотосинтеза у молодых деревьев и 1,5 % у 25-метровых может быть связано с ксилемным CO₂, если он не был повторно зафиксирован в ветвях, прежде чем достиг листьев [Ryan et al., 1997]. Поток CO₂ из коры в ствол не всегда имеет место, т. к. концентрация углекислоты в ксилеме может быть достаточно

высокой, и тогда, напротив, будет происходить диффузия ксилемного углекислого газа в кору и окружающий воздух. Вопросы о величинах этой добавки к дыханию последнее время активно дискутируются [Teskey et al., 2008].

Наш анализ углекислотной зависимости дыхания ветвей показал, что в подавляющем большинстве случаев величина компенсационного пункта у БП ниже, чем у БК (рис. 3, графики 1 и 2). Но в ряде случаев, особенно в период интенсивного роста, это правило не всегда соблюдается (рис. 3, графики 3 и 4), возможно, из-за значительной диффузии углекислоты у БК в ксилему. Скорее всего, это связано с большими потерями влаги стволом и ветвями БК по сравнению с БП в связи с интенсивной транспирацией. Не насыщенная влагой ксилема становится проницаемой для газов, и часть углекислоты, выделяемой при дыхании, с транспирационным током уходит к листьям.

По мере затухания ростовых процессов у ветвей всех экспериментальных деревьев снижалось и дыхание. Особенно заметно это

было у карельской березы (см. рис. 2). В первую половину августа дыхание у нее было на некоторых ветвях более чем в два раза активнее по сравнению с березой повислой, но в конце августа различия нивелировались. Отчасти этому способствовало и понижение температуры воздуха. После кратковременного похолодания в начале августа, сопровождавшегося значительным снижением интенсивности дыхания, наступившее потепление частично восстановило прежний уровень. Выделение CO_2 с поверхности ветвей составило у *БП* и *БК* 7,4 и 9,1 $\text{мкмоль}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$.

В осенний период дыхание ветвей стало более стабильным, чем в период роста. У *БК* средние величины дыхания были на 20 % выше, чем у *БП*. В данный период развития многие авторы характеризуют этот процесс как дыхание поддержания [Цельникер и др., 1993]. Величина его в первую очередь зависит от массы живых тканей.

Судя по фотографиям, приводимым в ряде монографий [Новицкая, 2008; Ветчинникова и др., 2013], толщина коры карельской березы с ярко выраженными аномалиями ствола иногда в разы больше, чем у березы повислой. Поскольку количественных данных нам обнаружить не удалось, для объяснения причин разницы в дыхании в осенний период мы измерили толщину коры у ветвей и стволиков саженцев *БП* и *БК* (рис. 4).

Для определения метрических показателей исследуемых побегов мы измеряли диаметр, толщину коры и длину части побега, помещенной в камеру. Кроме того, были дополнительно срезаны похожие ветви *БК* и *БП* у деревьев, растущих вне экспериментального участка, и на них проведены необходимые измерения по всей длине ветви с шагом 5 см. Диаметр ветвей, на которых проводились эксперименты, ограничивался отверстием в камере (14 мм). Для изучения толщины коры побегов мы брали ветви диаметром до 3 см. Такие достаточно толстые ветви в избытке имелись у 7–8-летних деревьев *БК*. У березы повислой такого же возраста они практически отсутствовали, поэтому для сравнения мы были вынуждены использовать березу повислую 11–12 лет. В результате мы сравнивали ветви одинаковой толщины, но возраст ветвей березы *БП* на 3–4 года превышал возраст ветвей *БК*.

Толщина коры у побегов *БК* явно больше, чем у *БП*, уже в двухлетнем возрасте, когда внешний диаметр составляет всего 4–6 мм (см. рис. 4). В трехлетнем возрасте кора *БК* толще, чем у *БП*, в среднем на 0,3 мм. С увеличением возраста и, соответственно, диаметра

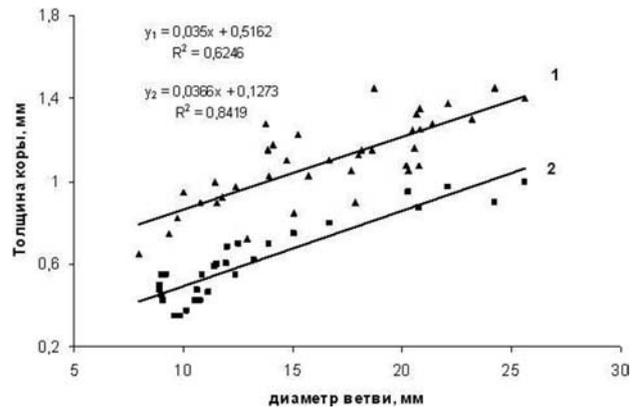


Рис. 4. Зависимость толщины коры у карельской березы (1) и березы повислой (2) от диаметра ветви

ветви эта разница постепенно растет, и у ветвей толщиной до 3 см толщина коры уже превышает 1 мм. Кора молодых ветвей и стволиков 2–3-летних саженцев в основном состоит из живых тканей. По мере утолщения ветвей и стволов доля ксилемы в общем объеме существенно возрастает. Линейные регрессионные зависимости объема коры от диаметра ветви имели достаточно высокие множественные коэффициенты корреляции: 0,84 у *БП* и 0,62 у *БК*. Разбросы измеряемых показателей у *БК* значительны. Причина такой большой вариабельности связана с тем, что диаметр как неокоренных побегов, так и окоренных сильно варьируется даже на одном 5-см отрезке ветви. Толщина коры тоже неодинакова на протяжении всей длины отрезка. Полученные уравнения можно использовать для приблизительного расчета объема коры по данному внешнему диаметру.

Таким образом, одной из причин более энергичного дыхания ветвей карельской березы после прекращения ростовых процессов, по сравнению с березой повислой, является большая масса и объем тканей коры. На некоторых участках ветки или стволика разница достигала 30–40 %.

Зависимость дыхания ветвей от температуры. Из внешних факторов среды дыхание ветвей наиболее тесным образом было связано с температурой воздуха и тканей ствола. Анализ связи выделения CO_2 из стволов и внешних факторов среды достаточно сложен, так как дыхание зависит в первую очередь от метаболических процессов, имеющих свой внутренний ритм. У березы повислой в период интенсивного роста, несмотря на то, что температура воздуха в первую половину июля 2009 г. постепенно уменьшалась, а с середины июля до начала августа росла (см. рис. 2), дыхание имело наивысшие значения в сезоне. По мере

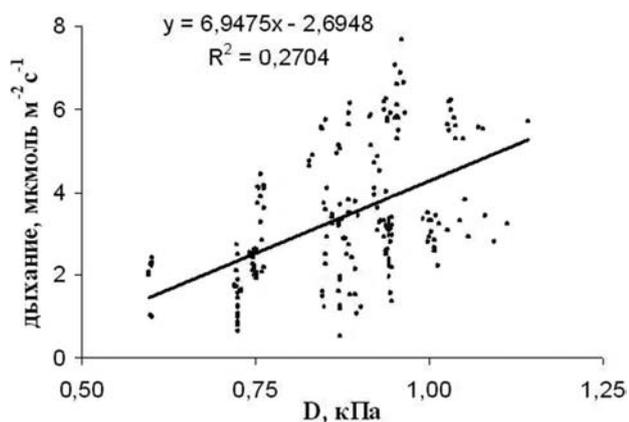


Рис. 5. Зависимость дыхания ветвей от дефицита давления водяного пара воздуха (D) в период с умеренными температурами в августе 2009 г.

снижения температуры воздуха и затухания ростовых процессов в августе уменьшалась и интенсивность дыхания. Для всего вегетационного сезона изменение дыхания в целом совпадало с ходом температуры (см. рис. 2). Максимальные величины дыхания зарегистрированы в период интенсивных ростовых процессов при температуре 22–23 °С. В более жаркие дни, когда наблюдалась депрессия фотосинтеза, дыхание у березы повислой не превышало 10, а у карельской березы – 18 мкмоль·м⁻²·с⁻¹. В последний месяц вегетации 2009 г. при относительно стабильной температуре воздуха активность дыхания последовательно уменьшалась.

Среднее значение коэффициента Вант-Гоффа (Q_{10}) с середины июля до начала августа было равным 1,95, а в конце августа – начале сентября – 1,21. Изменение значений Q_{10} в ходе вегетации, возможно, было связано с изменением соотношения живых клеток в тканях ствола. Из литературы известно, что высокие значения Q_{10} отмечались в период, когда проводящая флоэма достигала наибольшей ширины [Астраханцева, 2009]. По мере сокращения проводящей флоэмы на фоне развития годичного кольца ксилемы чувствительность дыхания к температуре воздуха снижалась. Это объясняется тем, что каждая ткань, как и каждая стадия развития клеток, характеризуется собственной чувствительностью к действию температурного фактора [Антонова, Стасова, 1988; Гамалей, 2004].

В целом полученные в течение всего вегетационного сезона данные можно лишь условно объединить в одну температурную кривую. В разные отрезки периода вегетации растений температурная зависимость дыхания различна. В конце периода вегетации интенсивность дыхания при примерно одинаковых температурах

оказывалась значительно ниже, чем в середине сезона (см. рис. 2). Это же отмечают и другие исследователи [Kunstle, Mitcherlich, 1976; Negisi, 1981].

В конце сентября при температуре воздуха 12 °С дыхание некоторых ветвей, сохранивших часть листьев поздней генерации, оказывалось на уровне конца августа – начала сентября. Такая значительная величина дыхания, возможно, объясняется все еще продолжающимся утолщением стенок клеток ксилемы и флоэмы при постепенном отмирании их живого содержимого [Антонова, Шебеко, 1986]. Но в целом в сентябре, когда ростовые процессы заканчивались, дыхание как у карельской березы, так и у березы повислой было очень низкое – 0,5–0,6 мкмоль·м⁻²·с⁻¹.

Коэффициент корреляции дыхания и температуры за весь сезон у березы повислой был достаточно высок – 0,68, а у карельской березы – менее 0,20. С середины июля до середины августа (период интенсивного роста) коэффициенты корреляции у березы повислой и карельской березы составляли соответственно 0,54 и 0,58. Одна из возможных причин очень сильной вариабельности дыхания как по кроне, так и во времени заключается в несовпадении суточного ритма дыхания с суточным ритмом температуры. Ряд авторов указывают на максимальные величины дыхания в вечерние часы, если температура достаточно высока [Kunstle, Mitcherlich, 1976; Цельникер и др., 1993]. При этом для березы дыхание в суточном ритме часто не коррелировало с изменениями температуры [Kunstle, Mitcherlich, 1976]. Негизи [Negisi, 1979] связывает уменьшение дыхания днем с увеличением скорости переноса CO₂ транспирационным током.

Тренд дыхания от дефицита водяного пара в воздухе (D), если взять все измерения за сезон, или даже выборку для небольшого периода, очень слабый (рис. 5). Максимум дыхания в области 2,1–2,3 кПа, скорее всего, связан с тем, что происходили интенсивные ростовые процессы, т. е. обусловлен эндогенными факторами. При невысоком уровне дыхания, когда температура воздуха умеренная, а относительная влажность высокая, зависимость дыхания от D выражена более ярко. Вероятнее всего, такая зависимость связана с тем, что увеличение D происходило после прекращения дождя и при высокой облачности.

Уменьшение интенсивности дыхания при высоких значениях D может иметь и физическую причину. Происходит это в атмосферную засуху, то есть когда температура высока, а относительная влажность воздуха низкая.

При высокой транспирации при уменьшении содержания влаги в ветвях внутренние слои древесины становятся проницаемыми для газов в радиальном направлении, и часть углекислоты может диффундировать к центру. При высоком содержании воды в древесине она становится малопроницаемой для газов, как, впрочем, и камбий [Цельникер и др., 1993].

Дыхание стволов трехлетних саженцев

Эксперименты по изучению дыхания стволиков саженцев, растущих в вегетационных сосудах, проводились в августе – первой половине сентября. Измерения велись на трех деревьях *БП* и шести саженцах *БК*, выращенных из семян, полученных с помощью контролируемого опыления. В начале августа при температуре 23 °С, когда еще продолжался активный камбиальный рост, средние величины дыхания стволиков составляли у *БК* и *БП* соответственно 18 и 14 мкмоль·м⁻²·с⁻¹. Достоверных отличий дыхания ветвей 6-летних деревьев от дыхания стволиков саженцев получить не удалось. В некоторых случаях его интенсивность была выше, чем у ветвей, что, возможно, связано с неравномерным освещением последних. Часть листьев ветвей находилась в тени или полутени. Саженцы же были все время на открытом месте, и наблюдался активный рост листьев и побегов.

В середине августа рост побегов у саженцев карельской березы замедлился, а у березы повислой практически прекратился. Отчасти это было связано с похолоданием. Дыхание стволиков, измеренное в пасмурную погоду в середине дня, составляло у *БК* и *БП* соответственно 2,4 и 1,6 мкмоль м⁻²·с⁻¹. Измерения в начале сентября, сопровождавшиеся понижением температуры и низкой облачностью, показали значительное снижение величин дыхания – до 1 мкмоль·м⁻²·с⁻¹.

Для изучения зависимости дыхания стволиков саженцев от влажности почвы сосуды в конце августа помещались под полиэтиленовый навес и в течение 8 дней не поливались. Интенсивность дыхания у всех объектов, испытывавших почвенную засуху, уменьшилась в несколько раз и была на уровне 0,2–0,4 мкмоль·м⁻²·с⁻¹. После обильного полива саженцы частично восстановились. Однако в данный период вегетации выход их из состояния стресса значительно отличался от того, как если бы они были подвергнуты обезвоживанию в активный летний период, например в июле. Обнаружилась зависимость дыхания стволиков от состояния кроны. Саженцы березы повислой со средней величиной дыхания 1,27 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ имели

около 20 % желтеющих листьев, примерно 20 % были повреждены грибковыми и бактериальными заболеваниями (парша, пятнистость, плесень, ржавчина), площадь поверхности некрозов не превышала 10 %. Средние величины дыхания у саженцев *БП*, не испытывавших водного стресса (контроль) и имевших здоровый вид, составили 1,42 мкмоль·м⁻²·с⁻¹. У саженцев *БК*, где продолжался рост листьев и побегов, дыхание было зафиксировано в пределах 1,48–1,65 мкмоль·м⁻²·с⁻¹. Площадь поражения листьев не превышала 7–8 %.

Достоверных отличий в дыхании стволиков саженцев диаметром 10–12 мм и дыхании ветвей такого же диаметра у 5–6-летних деревьев мы не получили. Но как для саженцев, так и для ветвей в августе–сентябре сохранялась тенденция более активного дыхания у *БК*. При этом была выявлена одна важная особенность. При измерении на ветвях мы точно знали, что имеем дело с карельской березой, поскольку уже проявились признаки аномального роста. У саженцев, которые были выращены из семян *БК*, полученных контролируемым опылением, лишь с пятидесятипроцентной вероятностью в ходе онтогенеза обнаружатся в будущем признаки карельской березы [Ветчинникова и др., 2013]. В наших измерениях у четырех саженцев *БК* значения дыхания превышали дыхание *БП* на 30–50 %. У трех саженцев значения дыхания отличались не более чем на 10 %. Ни один из саженцев карельской березы во время проведения эксперимента не имел характерных признаков этой формы. В 2015 году при пересадке саженцев в грунт было обнаружено, что у трех из четырех саженцев с повышенным дыханием, появились утолщения ствола. У трех же саженцев с дыханием, близким к дыханию *БП*, до сих пор каких-либо аномалий замечено не было, и возможно, их не будет и в будущем.

Таким образом, примененный нами метод измерения дыхания стволиков берез на ранней стадии их развития после соответствующей доработки можно будет использовать для ранней диагностики. При помощи данного метода появляется возможность среди 2–3-летних саженцев, выращенных из семян карельской березы, с большой вероятностью выделять растения, у которых в будущем возможно появление узорчатой древесины.

Заключение

Измерения темного дыхания ветвей деревьев и стволиков саженцев показали, что в среднем за три года эксперимента оно было на 27 % активнее у карельской березы, чем

у березы повислой. В период роста побегов по диаметру различия были самые существенные. Зафиксированы случаи, когда интенсивность дыхания ветвей карельской березы более чем в два раза превосходила таковую у березы повислой. Основным внешним фактором, влияющим на дыхание ствола, – температура воздуха. Дыхание активизируется на участках ствола и ветвей, обладающих высокой метаболической активностью. Значительную роль в выделении углекислоты с поверхности ствола и ветвей могут играть диффузионные процессы в ксилеме.

Факты уменьшения различий в дыхании березы повислой и карельской березы после прекращения ростовых процессов свидетельствуют, что нарушения ксилогенеза, процессы утилизации сахаров повышенной концентрации энергозатратны, и возможно, значительная часть ассимилятов у карельской березы идет не на рост ксилемы, а на транспорт и образование других структур. Дыхание побегов и стволиков у карельской березы и в какой-то мере у березы повислой более неустойчиво и вариабельно, чем процессы CO_2 -газообмена листьев, где вариабельность вполне оправданна из-за изменяющейся солнечной радиации. Сильное повышение интенсивности дыхания у карельской березы носит кратковременный характер (часы), после чего дыхание стабилизируется иногда на более низком уровне, чем у березы повислой. Поскольку лишь 50 % деревьев, выращенных из семян карельской березы, проявляют в онтогенезе характерные признаки этой формы, то более высокая интенсивность дыхания (1,3–1,5 раза) стволов и ветвей у саженцев, еще не обнаруживших структурных аномалий, позволяет с большой вероятностью диагностировать появление узорчатой древесины у растений карельской березы.

Исследования выполнены в рамках государственного задания Института леса КарНЦ РАН 2014–2016 гг. и при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант 13-04-00827-а).

Литература

Антонова Г. Ф., Шебеко В. В. Влияние внешней среды на развитие вторичной клеточной стенки трахеид сосны обыкновенной // Лесоведение. 1986. № 2. С. 72–76.

Антонова Г. Ф., Стасова В. В. Образование и развитие трахеид при формировании годичного прироста древесины в стволах *Larix sibirica* (Pinaceae) // Бот. журнал. 1988. Т. 73, № 8. С. 1130–1140.

Астраханцева Н. В. Зависимость дыхания ствола сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) от анатомического строения и развития тканей флоэмы

и ксилемы: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Красноярск, 2009. 28 с.

Болондинский В. К. Исследование зависимости фотосинтеза от интенсивности солнечной радиации, температуры и влажности воздуха у растений карельской березы и березы повислой // Труды КарНЦ РАН. 2010. № 2. С. 3–10.

Болондинский В. К., Виликайнен Л. М. Исследование световой зависимости фотосинтеза у саженцев березы в норме и в условиях почвенной засухи // Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействием факторов среды. Петрозаводск, 2011. С. 38–42.

Ветчинникова Л. В., Титов А. Ф., Кузнецова Т. Ю. Карельская береза: биологические особенности, динамика ресурсов и воспроизводство. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2013. 312 с.

Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Красавина М. С., Мощенская Ю. Л. Активность сахарозсинтазы в тканях ствола карельской березы в период камбиального роста // Физиология растений. 2015. Т. 62, № 3. С. 410. doi: 10.7868/S0015330315030057.

Гамалей Ю. В. Транспортная система сосудистых растений. СПб.: С.-Петербург. ун-т, 2004. 424 с.

Головкин Т. К., Далькэ И. В., Табаленкова Г. Н., Гармаш Е. В. Дыхание растений Приполярного Урала // Ботанический журнал. 2009. Т. 94, № 8. С. 1216–1226.

Забуга В. Ф., Забуга Г. А. Оценка затрат на дыхание ветвей *Pinus silvestris* (Pinaceae) по их радиальному росту // Ботанический журнал. 2005. Т. 90, № 12. С. 1867–1878.

Забуга Г. А. Эколого-физиологические аспекты продукционного процесса сосны обыкновенной в лесостепной зоне Предбайкалья: автореф. дис. ... докт. биол. наук. Иркутск, 2006. 44 с.

Масягина О. В., Прокушкин С. Г., Иванова Г. А. Влияние пожаров на интенсивность дыхания стволов сосны обыкновенной (*Pinus silvestris* L.) // Хвойные бореальной зоны. 2007. Вып. XXIV, № 1. С. 82–91.

Меняйло Л. Н. Гормональная регуляция ксилогенеза хвойных. Новосибирск: Наука, 1987. 184 с.

Мокроносов А. Т. Участие экспортных продуктов фотосинтеза в CO_2 -газообмене надземных скелетных частей сосны (*Pinus sylvestris* L.) // Физиология растений. 2001. Т. 48, № 2. С. 172–176.

Новицкая Л. Л. Карельская береза: механизмы роста и развития структурных аномалий. Петрозаводск: Verso, 2008. 143 с.

Семихатова О. А., Иванова Т. И., Кирпичникова О. В. Растения Севера: дыхание и его связь с продукционным процессом // Физиология растений. 2009. Т. 56, № 3. С. 340–350.

Сукачев В. Н. Определитель древесных пород. Л.: Гослестехиздат, 1940. 340 с.

Татаринев Ф. А., Молчанов А. Г., Курбатова Ю. А. Роль погодных и эдафических условий в формировании дыхания стволов деревьев в еловых лесах на юго-западе Валдайской возвышенности // Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействием факторов среды. Петрозаводск, 2011. С. 346–351.

Цельникер Ю. Л., Малкина И. С., Ковалев А. Г. и др. Рост и газообмен CO₂ у лесных деревьев. М: Наука, 1993. 256 с.

Chung H. H., Barnes K. L. Photosynthate allocation in *Pinus taeda*. 1. Substrate requirements for synthesis of shoot biomass // *Canad. J. Forest Res.* 1977. Vol. 7. No 1. P. 106–111.

Edwards N. T., McLaughlin S. B. Temperature-independent diel variations of respiration rates in *Quercus alba* and *Liliodendron tulipifera* // *Oikos*. 1978. Vol. 31. No 2. P. 200–206.

Fang J., Wang X. Measurement of respiration amount of white birch (*Betula platyphylla*) population in the mountainous region of Beijing // *Journal of environmental sciences*. 1995. Vol. 7, No 4. P. 391–398.

Goulden M. L., Munger J. W., Fan S.-M. et al. Measurements of carbon sequestration by longterm eddy covariance: methods and a critical evaluation of accuracy // *Global Change Biol.* 1996. Vol. 2. P. 169–182.

Kunstle E., Mitcherlich G. Photosynthese, Atmung und Transpiration in einem Mischbestand im Schwarzwald. 3. Atmung // *Allgem. Forst- und Jagdztg.* 1976. Bd. 147, No 9. P. 169–177.

Lavigne M. B. Comparing stem respiration and growth of jack pine provenances from northern and southern locations // *Tree Physiology*. 1996. No 16. P. 847–852.

Levy P. E., Meir P., Allen S. J., Jarvis P. G. The effect of aqueous transport of CO₂ in xylem sap on gas exchange in woody plants // *Tree Physiology*. 1999. Vol. 19. P. 53–58.

Linder S., Troeng E. Photosynthesis and Transpiration of 20-years-old Scots Pine // *Structure and Function of Northern Coniferous Forests*. Ecological Bulletins (Stockholm). 1980. No 32. P. 165–181.

Matyssek R., Günthardt-Goerg M. S., Maurer S., Christ R. Tissue structure and respiration of stems of *Betula pendula* under contrasting ozone exposure and nutrition // *Trees*. 2002. Vol. 16. P. 375–385.

Negisi K. Respiration of forest trees // *Primary product*. Jap. Forests. Tokyo, 1977. Vol. 16. P. 86–99.

Negisi K. Bark respiration rate in stem segments detached from young *Pinus densiflora* trees in relation

to velocity of artificial sap flow // *J. Japan. Forest soc.* 1979. Vol. 61, No 3. P. 88–93.

Negisi K. Diurnal and seasonal fluctuations in the stem bark respiration of standing *Quercus myrsinaefolia* tree // *J. Japan. Forest soc.* 1981. Vol. 63, No 7. P. 235–241.

Penning de Vries F. W. T. The cost of maintenance processes in plant cell // *Ann. Bot.* 1975. Vol. 3, No 1. P. 77–83.

Rothman D. H. Atmospheric carbon dioxide levels for the last 500 million years // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002. Vol. 99, No 7. P. 4167–4171.

Ryan M. G. The effect of climate change on plant respiration // *Ecol. Appl.* 1991. No 1. P. 157–167.

Ryan M. G., Waring R. H. Maintenance respiration and stand development in a subalpine lodgepole pine forest // *Ecology*. 1992. No 73. P. 2100–2108.

Ryan M. G., Binkley D., Fownes J. H. Age-Related Decline in Forest Productivity: Pattern and Process // *Advances in Ecological research*. Academic press, London, 1997. Vol. 27. P. 213–262.

Teskey R. O., McGuire M. A. Carbon dioxide transport in xylem causes errors in estimation of rates of respiration in stems and branches of trees // *Plant Cell and Environment*. 2002. Vol. 25. P. 1571–1577.

Teskey R. O., Saveyn A., Steppe K., McGuire M. A. Origin, fate and significance of CO₂ in tree stems // *New Phytologist*. 2008. Vol. 177. P. 17–32.

Waring R. H., Schlesinger W. H. Forest ecosystems concepts and management. New York: Academic Press Inc., 1985. 340 p.

Wittmann C., Pfanz H., Loreto F. et al. Light-induced reduction of carbon release from branches of birch trees: cortical photosynthesis, photorespiration or inhibition of mitochondrial respiration? // *Plant, Cell and Environment*. 2006. Vol. 29. P. 1149–1158.

Wittmann C., Pfanz H. Temperature dependency of bark photosynthesis in beech (*Fagus sylvatica* L.) and birch (*Betula pendula* Roth.) trees // *Journal of Experimental Botany*. 2007. Vol. 58, No 15/16. P. 4293–4306. doi: 10.1093/jxb/erm313.

Поступила в редакцию 17.09.2015.

References

Antonova G. F., Shebeko V. V. Vliyanie vneshej sredy na razvitie vtorichnoj kletочноj stenki traheid sosny obyknovennoj [Effect of environment on the secondary cell wall development of Scots Pine tracheids]. *Lesovedenie [Russ. J. Forest Sci.]*. 1986. No 2. P. 72–76.

Antonova G. F., Stasova V. V. Obrazovanie i razvitie traheid pri formirovanii godichnogo prirosta drevesiny v stvolah *Larix sibirica* (Pinaceae) [Formation and development of the tracheids in the annual increment of wood in trunks of *Larix sibirica* (Pinaceae)]. *Bot. Zhurnal [Bot. J.]*. 1988. Vol. 73, No 8. P. 1130–1140.

Astrahanceva N. V. Zavisimost' dyhaniya stvola sosny obyknovennoj (*Pinus sylvestris* L.) ot anatomicheskogo stroeniya i razvitiya tkanej flo`emy i ksilemy [Stem respiration dependence in Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) on anatomical structure and tissue development

in phloem and xylem]: PhD Diss. (Biol). Krasnoyarsk, 2009. 28 p.

Bolondinskij V. K., Vilikajnen L. M. Issledovanie svetovoj zavisimosti fotosinteza u sazhencev berezy v norme i v usloviyah pochvennoj zasuhi [Research of light dependence of photosynthesis in the birch seedlings in normal condition and in conditions of soil drought]. Strukturnye i funkcional'nye otkloneniya ot normal'nogo rosta i razvitiya rastenij pod vozdejstviem faktorov sredy [Structural and functional deviations from normal growth and development of plants under the influence of environmental factors]. Petrozavodsk, 2011. P. 38–42.

Bolondinskij V. K. Issledovanie zavisimosti fotosinteza ot intensivnosti solnechnoj radiacii, temperatury i vlazhnosti vozduha u rastenij karel'skoj berezy i berezy povisluj [Research of dependence of photosynthesis on the

intensity of solar radiation, air temperature and humidity in Karelian (curly) and silver birch plants]. *Trudy KarNC RAN [Transactions of KarRC of RAS]*. 2010. No 2. P. 3–10.

Cel'niker Yu. L., Malkina I. S., Kovalev A. G., Chmora S. N., Mamaev V. V., Molchanov A. G. Rost i gazoobmen CO₂ u lesnyh derev'ev [Growth and CO₂ exchange in woody plants]. Moscow: Nauka, 1993. 256 p.

Galibina N. A., Novitskaya L. L., Krasavina M. S. Activity of sucrose synthase in trunk tissues of Karelian birch during cambial growth. *Russ. J. Plant Physiol.* 2015. Vol. 52. P. 381–389.

Gamaley Yu. V. Transportnaya sistema sosudistyh rastenij [Transport system of vascular plants]. St. Petersburg: SpbGU, 2004. 424 p.

Golovko T. K., Dal'k'e I. V., Tabalenkova G. N., Garmash E. V. Dyhanie rastenij Pripolyarnogo Urala [Respiration of plants of the Subpolar Urals]. *Botanicheskij zhurnal [Bot. J.]*. 2009. Vol. 94, No 8. P. 1216–1226.

Masyagina O. V., Prokushkin S. G., Ivanova G. A. Vliyaniye pozharov na intensivnost' dyhaniya stvolov sosny obyknovnoy (*Pinus silvestris* L.) [Influence of fires on the intensity of respiration in *Pinus silvestris* L. trunks]. *Hvoynye boreal'noj zony [Conifers of the boreal zone]*. 2007. Iss. XXIV, No 1. P. 82–91.

Menyajlo L. N. Gormonal'naya regulyaciya ksilogeneza hvoynnyh [Hormonal regulation of xylogenesis in conifers]. Novosibirsk: Nauka, 1987. 184 p.

Mokronosov A. T. Involvement of Exported Photosynthetic Products in the CO₂ Exchange of the Skeletal Shoots of Pine (*Pinus sylvestris* L.). *Russ. J. Plant Physiol.* 2001. Vol. 48. P. 143–147.

Novickaya L. L. Karel'skaya bereza: mehanizmy rosta i razvitiya strukturnykh anomalij [Karelian birch: mechanisms of growth and development of structural abnormalities]. Petrozavodsk: Verso, 2008. 143 p.

Semikhatova O. A., Ivanova T. I., Kirpichnikova O. V. Respiration rate of arctic plants as related to the production process. *Rus. J. Plant Physiol.* 2009. Vol. 56, No 3. P. 306–315.

Sukachev V. N. Opredelitel' drevesnyh porod [Guide to woody plants]. Leningrad: Goslestehizdat, 1940. 340 p.

Tatarinov F. A., Molchanov A. G., Kurbatova Yu. A. Rol' pogodnyh i `edaficheskikh uslovij v formirovanii dyhaniya stvolov derev'ev v elovyh lesah na yugo-zapade valdajskoj vozvyshehnosti [The influence of weather and soil conditions on stem respiration in spruce forest at south-west of Valdai hill]. *Strukturnye i funktsional'nye otkloneniya ot normal'nogo rosta i razvitiya rastenij pod vozdejstviem faktorov sredey [Structural and functional deviations from normal growth and development of plants under the influence of environmental factors]*. Petrozavodsk, 2011. P. 346–351.

Vetchinnikova L. V., Titov A. F., Kuznecova T. Yu. Karel'skaya bereza: biologicheskie osobennosti, dinamika resursov i vosproizvodstvo [Curly birch: biological characteristics, resource dynamics, and reproduction]. Petrozavodsk: KarRC of RAS, 2013. 312 p.

Zabuga G. A. Ekologo-fiziologicheskie aspekty produkcionnogo processa sosny obyknovnoy v lesostepnoj zone Predbaikal'ya [Ecological and physiological aspects of the production process in Scots Pine in forest-steppe zone of PreBaikal area]: DSc Diss. (Biol.). Irkutsk, 2006. 44 p.

Zabuga V. F., Zabuga G. A. Ocenka zatrat na dyhanie vetvej *Pinus silvestris* (Pinaceae) po ih radial'nomu rostu [The estimation of respiratory expenses of *Pinus silvestris* (Pinaceae) branches by their radial growth]. *Botanicheskij zhurnal [Bot. J.]*. 2005. Vol. 90, No 12. P. 1867–1878.

Chung H. H., Barnes K. L. Photosynthate allocation in *Pinus taeda*. 1. Substrate requirements for synthesis of shoot biomass. *Canad. J. Forest Res.* 1977. Vol. 7, No 1. P. 106–111.

Edwards N. T., McLaughlin S. B. Temperature-independent diel variations of respiration rates in *Quercus alba* and *Liliodendron tulipifera*. *Oikos*. 1978. Vol. 31, No 2. P. 200–206.

Fang J., Wang X. Measurement of respiration amount of white birch (*Betula platyphylla*) population in the mountainous region of Beijing. *Journal of Environmental Sciences*. 1995. Vol. 7, No 4. P. 391–398.

Goulden M. L., Munger J. W., Fan S.-M., Daube B. C., Wofsy S. C. Measurements of carbon sequestration by longterm eddy covariance: methods and a critical evaluation of accuracy. *Global Change Biol.* 1996. Vol. 2. P. 169–182.

Kunstle E., Mitcherlich G. Photosynthese, Atmung und Transpiration in einem Mischbestand im Schwarzwald. 3. Atmung. *Allgem. Forst- und Jagdztg.* 1976. Bd. 147, No 9. P. 169–177.

Lavigne M. B. Comparing stem respiration and growth of jack pine provenances from northern and southern locations. *Tree Physiology*. 1996. No 16. P. 847–852.

Levy P. E., Meir P., Allen S. J., Jarvis P. G. The effect of aqueous transport of CO₂ in xylem sap on gas exchange in woody plants. *Tree Physiology*. 1999. Vol. 19. P. 53–58.

Linder S., Troeng E. Photosynthesis and Transpiration of 20-years-old Scots Pine. Structure and Function of Northern Coniferous Forests. *Ecological Bulletins* (Stockholm). 1980. No 32. P. 165–181.

Matyssek R., Günthardt-Goerg M. S., Maurer S., Christ R. Tissue structure and respiration of stems of *Betula pendula* under contrasting ozone exposure and nutrition. *Trees*. 2002. Vol. 16. P. 375–385.

Negisi K. Respiration of forest trees. *Primary product. Jap. Forests*. Tokyo, 1977. Vol. 16. P. 86–99.

Negisi K. Bark respiration rate in stem segments detached from young *Pinus densiflora* trees in relation to velocity of artificial sap flow. *J. Japan. Forest soc.* 1979. Vol. 61, No 3. P. 88–93.

Negisi K. Diurnal and seasonal fluctuations in the stem bark respiration of standing *Quercus myrsinaefolia* tree. *J. Japan. Forest soc.* 1981. Vol. 63, No 7. P. 235–241.

Penning de Vries F. W. T. The cost of maintenance processes in plant cell. *Ann. Bot.* 1975. Vol. 3, No 1. P. 77–83.

Rothman D. H. Atmospheric carbon dioxide levels for the last 500 million years. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002. Vol. 99, No 7. P. 4167–4171.

Ryan M. G. The effect of climate change on plant respiration. *Ecol. Appl.* 1991. No 1. P. 157–167.

Ryan M. G., Waring R. H. Maintenance respiration and stand development in a subalpine lodgepole pine forest. *Ecology*. 1992. No 73. P. 2100–2108.

Ryan M. G., Binkley D., Fownes J. H. Age-Related Decline in Forest Productivity: Pattern and Process. *Advances in Ecological research*. Academic press, London, 1997. Vol. 27. P. 213–262.

Teskey R. O., McGuire M. A. Carbon dioxide transport in xylem causes errors in estimation of rates of respiration in stems and branches of trees. *Plant Cell and Environment*. 2002. Vol. 25. P. 1571–1577.

Teskey R. O., Saveyn A., Steppe K., McGuire M. A. Origin, fate and significance of CO₂ in tree stems. *New Phytologist*. 2008. Vol. 177. P. 17–32.

Waring R. H., Schlesinger W. H. Forest ecosystems concepts and management. New York: Academic Press Inc., 1985. 340 p.

Wittmann C., Pfanz H., Loreto F., Centritto M., Pitrini F., Alessio G. Light-induced reduction of carbon release from branches of birch trees: cortical photosynthesis, photorespiration or inhibition of mitochondrial respiration? *Plant, Cell and Environment*. 2006. Vol. 29. P. 1149–1158.

Wittmann C., Pfanz H. Temperature dependency of bark photosynthesis in beech (*Fagus sylvatica* L.) and birch (*Betula pendula* Roth.) trees. *Journal of Experimental Botany*. 2007. Vol. 58, No 15/16. P. 4293–4306. doi: 10.1093/jxb/erm313.

Received September 17, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Болондинский Виктор Константинович

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

Виликайнен Людмила Матвеевна

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

CONTRIBUTORS:

Bolondinsky, Viktor

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

Vilikainen, Lyudmila

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

УДК 574.24

АВТОМАТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА РАННЕГО ОПОВЕЩЕНИЯ ОБ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ОПАСНОСТИ НА ВОДОЕМАХ И ЕЕ АПРОБАЦИЯ

А. А. Ипатов¹, И. Н. Бахмет², Д. А. Екимов¹, Н. А. Кулдин¹

¹ Петрозаводский государственный университет

² Институт биологии Карельского научного центра РАН

Автоматическая система раннего оповещения об экологической опасности на водоемах относится к средствам биомониторинга при помощи дистанционного контроля состояния двустворчатых моллюсков. Система включает в себя самих животных, инфракрасные оптико-электронные датчики, кабели, буй, сервер, ноутбук, мобильный телефон. Буй состоит из аккумуляторной батареи, блока обработки данных, приемно-передающего устройства. Благодаря такой конструкции обеспечивается автономное использование системы, снижение затрат на ее обслуживание, а также возможность использовать систему в полевых условиях. Апробация системы выполнена на пресноводных и морских двустворчатых моллюсках. Была показана высокая стабильность сердечной ритмики животных и возможность применения системы как в лабораторных, так и в полевых условиях.

Ключевые слова: биомониторинг; экология; сердечный ритм; плетизмография; *M. edulis*; *Unio sp.*

A. A. Ipatov, I. N. Bakhmet, D. A. Yekimov, N. A. Kuldin. AUTOMATIC EARLY WARNING DEVICE FOR ENVIRONMENTAL RISKS AT WATERBODIES AND ITS TRIALS

Automatic early warning device for environmental risks at waterbodies is a tool for bio-monitoring based on remote monitoring of the condition of bivalves. The system is made up of the animals, IR optic sensors, cables, buoy, server, laptop computer, mobile phone. Buoy consists of accumulator, data processing unit, transceiver. This design enables stand-alone operation of the device, reduction of service costs, the possibility to use it in the field. Trial runs were performed for freshwater and saltwater bivalves. They demonstrated high stability of the animals' heart rate and applicability of the device in both laboratory and field conditions.

Keywords: biomonitoring; ecology; heart rate; plethysmography; *M. edulis*; *Unio sp.*

Введение

Известна система биологического мониторинга водной среды, состоящая из датчика носительного движения частей тела животного,

линии передачи сигнала датчика, выполненной в виде оптического волокна, усилителя, аналого-цифрового преобразователя и компьютера. Данная система основана на регистрации и анализе сигналов движения жаберных

крышек рыб, характеризующих дыхательную активность животных [Холодкевич, Любимцев, 2008]. Недостатком данной системы является невысокая точность измерений, поскольку размещение датчика относительного движения на теле рыбы может вызвать у нее состояние стресса, которое не связано с изменением качества водной среды. Кроме того, движение жаберных крышек рыб часто связано с причинами, обусловленными факторами индивидуальных особенностей особей и физиологическими природными изменениями. Во второй известной системе биомониторинга в качестве животных-индикаторов используются двустворчатые моллюски, а именно – движение створок раковины животных [Холодкевич, Любимцев, 2009]. Недостаток данной системы заключается в том, что изменение положения створок раковин двустворчатых моллюсков может быть обусловлено иными внешними воздействиями (подводные течения, приливы), а не изменением качества водной среды. Кроме того, движение створок раковин моллюсков никак не скоррелировано с дыхательной активностью, так как потребление кислорода обеспечивается движением ресничек жаберного эпителия. Таким образом, при изменении факторов внешней среды изменяется скорость течения воды через жабры моллюсков, тогда как створки раковин могут оставаться в этот момент без движения. Наиболее близким аналогом к нашей разработке является система биологического мониторинга окружающей среды, которая состоит из инфракрасных оптико-электронных датчиков, установленных на карапаксе речных раков, усилителей, аналого-цифровых преобразователей и компьютера [Kholodkevich et al., 2008]. Система регистрирует параметры кардиологической активности животных. Тестируемых животных размещают в проточном аквариуме. У данной системы также существует несколько недостатков. Во-первых, она требует регулярного обслуживания и непригодна для автономной работы в полевых условиях (раков необходимо кормить и отслеживать периоды линьки и размножения, во время которых сердечная активность зависит в основном от внутренних факторов). Во-вторых, данный вид животных достаточно подвижен, что также вносит дополнительный фактор, меняющий сердечную ритмику вне зависимости от качества воды. В то же время использование неинвазивного метода регистрации сердечной активности животных, на наш взгляд, является достаточно перспективным. В связи с этим данная методика была выбрана в качестве прототипа разработанной нами системы.

Материалы и методы

1. Разработанная система мониторинга окружающей среды в водных объектах

Техническим результатом, на достижение которого направлена разрабатываемая автоматическая система раннего оповещения об экологической опасности на водоемах (далее АСРЭВ), является создание комплекса устройств, которые обеспечат возможность автономной работы системы, снижение затрат на ее обслуживание, а также возможность использовать систему в полевых условиях. Достигается технический результат за счет того, что АСРЭВ снабжена приемо-передающим устройством, которое связано с блоком обработки данных и с сервером, а в качестве биоиндикаторов использованы моллюски, что дает возможность отслеживать состояние среды непосредственно на водоеме.

АСРЭВ (рис. 1) включает в себя: моллюсков (1), инфракрасные оптико-электронные датчики (2), кабели (3), буй (4), приемо-передающую антенну (5), ретрансляторную вышку (6), сервер (7), планшет (8), ноутбук (9), мобильный телефон (10).

Буй (рис. 2) состоит из аккумуляторной батареи (11), блока обработки данных (12), приемо-передающего устройства (13).

Работа предлагаемой АСРЭВ должна осуществляться следующим образом. Инфракрасные оптико-электронные датчики (см. рис. 1/2), закрепленные на раковинах моллюсков (см. рис. 1/1), измеряют плетизмограмму в режиме реального времени. Затем данные измерений передаются по кабелям в блок обработки данных (см. рис. 2/12), откуда при помощи приемо-передающего устройства (см. рис. 2/13) отправляются по беспроводному каналу связи на сервер (см. рис. 2/7). На сервере производится анализ принятых данных, по результатам которого можно судить об экологической обстановке на месте расположения системы. Питание системы осуществляется от аккумуляторной батареи (см. рис. 2/11).

В случае возникновения экологической опасности тревожное сообщение с сервера поступает на планшет или ноутбук (см. рис. 1/8, 9) в виде электронного письма и на мобильный телефон (см. рис. 1/10) в виде SMS с указанием места и времени наступления аварии.

Применение моллюсков в качестве тест-объектов избавляет от необходимости кормить животных. Увеличение числа биоиндикаторов, в нашем случае данного типа животных,

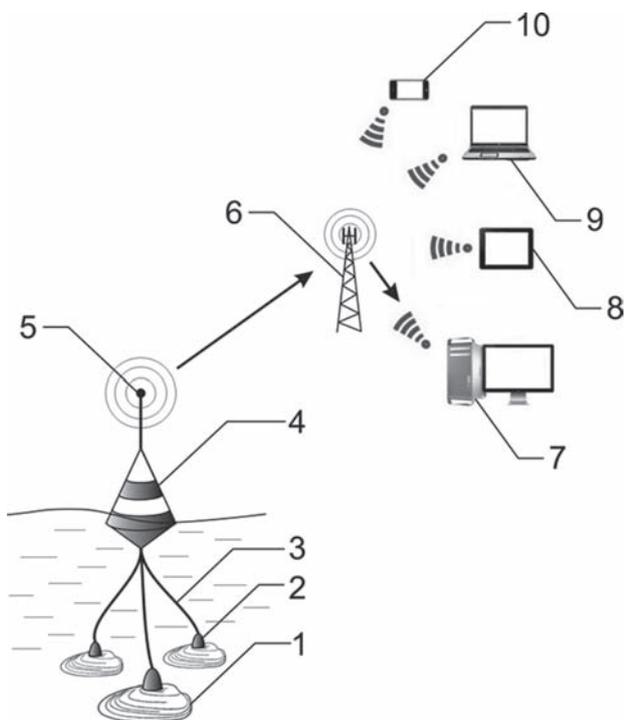


Рис. 1. Общая схема автоматической системы раннего оповещения об экологической опасности на водоемах

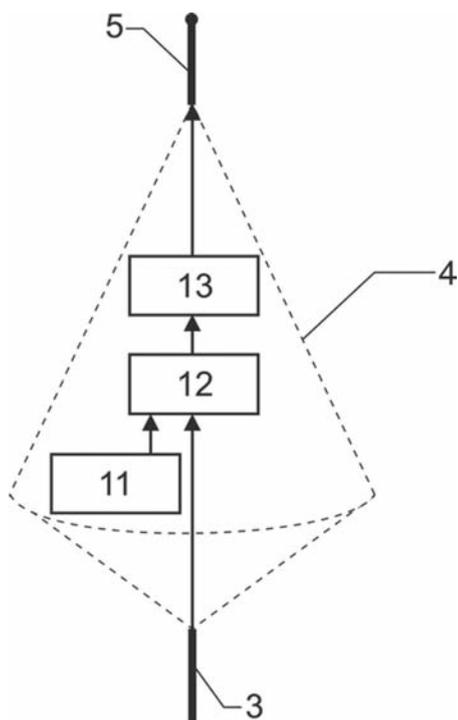


Рис. 2. Схема внутренней конструкции буя

снижает вероятность ложной тревоги и пропуска сигнала экологической опасности. Однако, с другой стороны, это приведет к повышенному энергопотреблению и тем самым снизит автономность системы. Поэтому по результатам исследований, проведенных в ПетрГУ, установлено, что оптимально использовать в системе 5–6 моллюсков, а в дополнение к аккумуляторной батарее использовать солнечную батарею.

2. Апробация разработанной системы

Для проверки разработанного прибора были проведены эксперименты по регистрации сердечной активности двустворчатых моллюсков – пресноводных *Unio sp.* и морских *Mytilus edulis*. Выбор объектов исследования обусловлен прежде всего широким распространением вышеуказанных видов и, следовательно, возможностью применения животных в дальнейшем при биоиндикации пресных (*Unio sp.*) и морских (*M. edulis*) прибрежных вод. Кроме того, мидии и беззубки являются модельными объектами и достаточно часто используются в различных экспериментах [Brand, 1968; Бергер, 1976; Widdows, Shick, 1985; Polhill, Dimock, 1996]. Это позволяет сравнить полученные результаты с уже имеющимися данными.

Основными целями данной работы являлись, во-первых, отработка методики полевой

регистрации сердечной активности моллюсков и, во-вторых, оценка стабильности сердечного ритма.

Пресноводные двустворчатые моллюски *Unio sp.* были собраны в старом русле реки Суна. После сбора измерили длину моллюсков, которая составила в среднем $67,7 \pm 7,7$ мм, и приклеили к ним оптические сенсоры CNY70. Перед началом регистрации сердечной ритмики животных в течение 7 суток акклиматизировали к лабораторным условиям. Моллюсков содержали в аквариумах из оргстекла с аэрируемой водой при постоянном освещении и температуре 17 °С. Ежедневно проводилась частичная смена воды. Всего в эксперименте было использовано 23 моллюска. Регистрация их сердечной активности осуществлялась непрерывно на протяжении 10 суток. Для проверки адекватности работы разработанного прибора параллельно использовали стандартную методику регистрации сердечной активности моллюсков [Depledge, Andersen, 1990; Bakhmet et al., 2005]. Все показатели указаны как средние значения \pm ошибка средней.

Мидии собирали в бухте Круглой Чупинской губы Кандалакшского залива Белого моря с установок для культивирования моллюсков (глубина 2 м) при температуре воды 8 °С. После сбора измеряли длину моллюсков и определяли возраст по кольцам зимней остановки роста

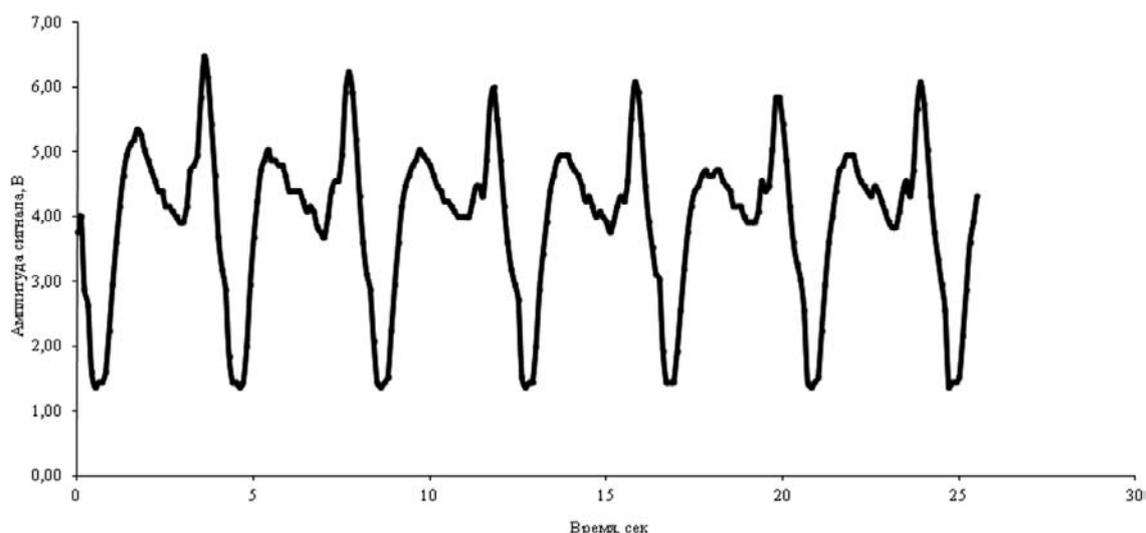


Рис. 3. Стандартная плетизмограмма *Unio sp.* и *M. edulis*

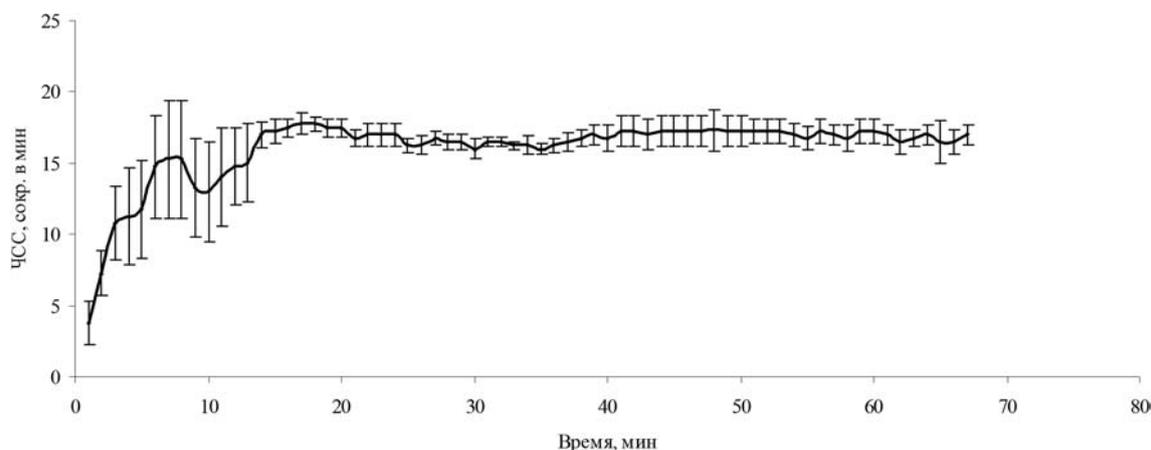


Рис. 4. Изменение ЧСС мидий в процессе адаптации к лабораторным условиям

раковины. Все работы выполнялись на ББС ЗИН РАН «Картеш». В дальнейшем соблюдалась методика, описанная для пресноводных животных, за исключением солености воды, которая поддерживалась на уровне 25 ‰ (характерная соленость для Белого моря) и температуры 10 °С. Первая часть экспериментов выполнялась в лабораторных условиях, вторая – в полевых. Для полевых работ мидии с приклеенными датчиками опускали в садке в море на глубину трех метров. Были использованы моллюски с длиной раковины $47,2 \pm 3,4$ мм.

Результаты и обсуждение

Прежде всего следует отметить, что мы получили четко выраженную запись плетизмограммы *Unio sp.* в виде последовательных волн, показывающих сокращение предсердий (короткий и высокий пик) и желудочка (пик более длительный и уплощенный) (рис. 3).

Применение стандартной методики дало аналогичный результат, что подтверждает адекватность использования нового прибора. Частота сердечных сокращений (ЧСС) составила в среднем $10,1 \pm 0,4$ в начале эксперимента и $8,1 \pm 0,3$ сокращений в минуту. Понижение сердечной активности объясняется недостатком питания. В то же время показатели ЧСС были достаточно стабильны на протяжении всего времени регистрации и не отклонялись от средних значений более чем на 1,1 сокращения в минуту. Следует отметить, что сердечная активность пресноводных моллюсков была более чем в два раза ниже ЧСС мидий при тех же температурах [Kholodkevich et al., 2009], а при 10 °С – в 1,5 раза выше (см. ниже). Причина данных различий пока неясна.

Плетизмограмма мидий не отличалась от таковой у пресноводных моллюсков (см. рис. 3). Средняя ЧСС составила $16,9 \pm 0,2$ сокращения в минуту в начале эксперимента

и $9,2 \pm 0,5$ – в конце, что также обусловлено недостатком питания. Хотелось бы подчеркнуть, что благодаря online-регистрации сердечной ритмики удалось отследить акклимацию животных к лабораторным условиям (рис. 4). Заметно, что для выхода ЧСС на плато моллюскам достаточно 20–40 минут. Относительно короткий период акклимации после хэндлинга связан, на наш взгляд, с условиями обитания мидий на литорали. В связи с отливно-приливной волной животные периодически подвергаются полной осушке (до 7 часов). Таким образом, мидии имеют достаточно ограниченное время для питания и дыхания. Следовательно, моллюски вынуждены быстро адаптироваться к изменениям параметров окружающей среды, что мы и наблюдали в нашем случае. Так же как и в случае с пресноводными моллюсками, ЧСС мидий была достаточно стабильна на протяжении всего времени регистрации и не отклонялась от средних значений более чем на 0,8 сокращения в минуту.

Разработанная методика полевой регистрации сердечной активности позволила получить четко различимую запись ЧСС мидий, расположенных на глубинах от двух до десяти метров. При отсутствии изменения температуры (в зимнее время) сердечная активность мидий достоверно не отклонялась от средних значений на протяжении четырех месяцев и составила в среднем $5,6 \pm 0,3$ сокращения в минуту. Отметим достаточно высокую ЧСС моллюсков, несмотря на низкую температуру ($-1,5$ °C), что свидетельствует о выработанных механизмах адаптации животных к зимним условиям существования.

Заключение

На основе проведенных экспериментов можно сделать вывод о том, что АСРЭВ позволяет дистанционно отслеживать изменения сердечной активности двустворчатых моллюсков, как пресноводных, так и морских, как в лабораторных, так и в полевых условиях. Ранее было показано, что ЧСС мидий высокочувствительна к самым различным поллютантам: тяжелым металлам [Marchan et al., 1999; Curtis et al., 2000], аммиаку [Bloxham et al., 1999], нефтепродуктам [Бахмет, 2009]. Следовательно, после создания базы данных по ЧСС моллюсков, обитающих в определенных водоемах, возможны следующие варианты применения данной системы:

– непрерывный дистанционный контроль водных объектов;

- обнаружение чрезвычайных экологических ситуаций, вызванных загрязнением водоемов промышленными стоками, тяжелыми металлами, аварийными разливами нефтепродуктов, с возможностью автоматического оповещения по электронной почте или путем отправки SMS-сообщения;
- контроль качества воды на водозаборах;
- контроль эффективности работы очистных сооружений.

Кроме того, АСРЭВ найдет применение в экспериментальных работах по изучению сердечной ритмики двустворчатых моллюсков в лабораторных и полевых исследованиях. В частности, с точки зрения фундаментальной науки, чрезвычайно важно проведение экспериментов по исследованию сердечной активности животных при изменяющихся природных факторах, как абиогенных (температура, соленость, концентрация кислорода), так и биогенных (питание, хищники).

Литература

Бахмет И. Н. Оценка влияния нефтепродуктов на сердечный ритм мидий // Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем. 2009. Т. XXII. С. 267–277.

Бергер В. Я. Сравнение реакций баренцевоморских и беломорских литторин на изменение солености среды и обсуждение вопроса о критериях физиологических рас / В сб. Исследование фауны морей. Т. XVII (XXV) Соленостные адаптации водных организмов. Л.: ЗИН РАН, 1976. С. 112–123.

Холодкевич С. В., Любимцев В. А. Датчик относительного движения частей тела животного и система биологического мониторинга среды обитания животного на его основе // Патент России № RU 77974 U1. 2008.

Холодкевич С. В., Любимцев В. А. Способ биологического мониторинга водной среды на основе регистрации положения створок раковин двустворчатых раковинных моллюсков и система для его осуществления // Патент России № RU 2361207. 2009.

Bakhmet I. N., Berger V. Ja., Khalaman V. V. The effect of salinity change on the heart rate of *Mytilus edulis* specimens from different ecological zones // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2005. Vol. 318, No 2. P. 121–126.

Bakhmet I. N., Fokina N. N., Nefedova Z. A., Nemova N. N. Physiological-biochemical properties of blue mussel *Mytilus edulis* adaptation to oil contamination // Environ. Monit. Assess. 2009. Vol. 155. P. 581–591.

Bakhmet I. N., Kantserova N. P., Lysenko L. A., Nemova N. N. Effect of copper and cadmium ions on heart function and calpain activity in blue mussel *Mytilus edulis* // J. Environ. Sci. Health Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng. 2012. Vol. 47, No. 12. P. 1528–35.

Brand A. R. Some adaptations to the burrowing habit in the class Bivalvia. Ph. D. thesis, Univeraity of Hull, 1968. 23 p.

Curtis T. M., Williamson R., Depledge M. H. Simultaneous, long-term monitoring of valve and cardiac activity in the blue mussel *Mytilus edulis* exposed to copper // *Mar. Biol.* 2000. Vol. 136, No 5. P. 0837–0846.

Depledge M. H., Andersen B. B. A computer-aided physiological monitoring system for continuous, long-term recording of cardiac activity in selected invertebrates // *Comp. Biochem. Physiol.* 1990. Vol. 96. P. 474–477.

Kholodkevich S. V., Ivanov A. V., Kurakin A. S. et al. Real time biomonitoring of surface water toxicity level at water supply stations // *Environ. Bioindic.* 2008. Vol. 3, No 1. P. 23–34.

Kholodkevich S. V., Ivanov A. V., Kuznetsova T. V. et al. Ultradian rhythms in cardiac activity of

bivalvia // *Dokl. Biol. Sci. Physiol.* 2009. Vol. 426. P. 216–218.

Marchan S., Davies M. S., Fleming S., Jones H. D. Effect of copper and zinc on the heart rate of the limpet *Patella vulgata* L. // *J. Comp. Biochem. Physiol.* 1999. A. Vol. 123. P. 89–93.

Polhill B. J. V., Dimock R. V. Jr. Effects of temperature and pO₂ on the heart rate of juvenile and adult freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae) // *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol.* 1996. Vol. 114, iss. 2. P. 135–141.

Widdows J., Shick J. M. Physiological responses of *Mytilus edulis* and *Cardium edule* to aerial exposure // *Mar. Biol.* 1985. Vol. 85. P. 217–232.

Поступила в редакцию 15.05.2015.

References

Bakhmet I. N. Ocenka vliyaniya nefteproduktov na serdechnyi ritm midiy [Petroleum products impact assessment on the heart rate of mussels]. *Problemy ekologicheskogo monitoringa i modelirovaniya ekosistem* [Problems of ecological monitoring and ecosystem modelling]. 2009. Vol. XXII. P. 267–277.

Berger V. Ja. Sravnenie reakcii barentsovomorskih i belomorskih littorin na izmenenie solenosti sredy obsuzhdenie voprosa o kriteriyah fiziologicheskikh ras [Comparison of reactions to salinity changes in Littorina from the Barents and White Seas and discussion on criteria of physiological races]. *V sb. Issledovanie fauny morei* [Study of marine fauna]. Vol. XVII (XXV) Solenostnye adaptacii vodnyh organismov. Leningrad: ZIN RAN, 1976. P. 112–123.

Holodkevich S. V., Liubimcev V. A. Datchik otnositelnogo dvizheniya chastei tela zhivotnogo i sistema biologicheskogo monitoringa sredy obitaniya zhivotnogo na ego osnove [Sensing device for capturing relative motions of animal body parts and biological monitoring of the living environment]. Patent Rossii No RU 77974 U1 [Russian patent No RU 77974 U1]. 2008.

Holodkevich S. V., Liubimcev V. A. Sposob biologicheskogo monitoringa vodnoi sredy na osnove registracii polkozheniya stvorok rakoviny dvuhstvorchatyh rakovinyh molluskov i sistema ego osuschestvleniya [Method for aquatic medium biological monitoring based on recording the position of the shell valves of bivalve mollusks and a system for carrying out said method]. Patent Rossii No RU 2361207 [Russian patent No RU 2361207]. 2009.

Bakhmet I. N., Berger V. Ja., Khalaman V. V. The effect of salinity change on the heart rate of *Mytilus edulis* specimens from different ecological zones. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2005. Vol. 318, No 2. P. 121–126.

Bakhmet I. N., Fokina N. N., Nefedova Z. A., Nemova N. N. Physiological–biochemical properties of blue mussel *Mytilus edulis* adaptation to oil contamination. *Environ. Monit. Assess.* 2009. Vol. 155. P. 581–591.

Bakhmet I. N., Kantserova N. P., Lysenko L. A., Nemova N. N. Effect of copper and cadmium ions on heart function and calpain activity in blue mussel *Mytilus edulis*. *J. Environ. Sci. Health Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 2012. Vol. 47, No 12. P. 1528–1535.

Brand A. R. Some adaptations to the burrowing habit in the class Bivalvia. Ph. D. thesis, Univeraity of Hull, 1968. 23 p.

Curtis T. M., Williamson R., Depledge M. H. Simultaneous, long-term monitoring of valve and cardiac activity in the blue mussel *Mytilus edulis* exposed to copper. *Mar. Biol.* 2000. Vol. 136, No 5. P. 0837–0846.

Depledge M. H., Andersen B. B. A computer-aided physiological monitoring system for continuous, long-term recording of cardiac activity in selected invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 1990. Vol. 96. P. 474–477.

Kholodkevich S. V., Ivanov A. V., Kurakin A. S., Kornienko E. L., Fedotov V. P. Real time biomonitoring of surface water toxicity level at water supply stations. *Environ. Bioindic.* 2008. Vol. 3, No 1. P. 23–34.

Kholodkevich S. V., Ivanov A. V., Kuznetsova T. V., Kurakin A. S., Kornienko E. L., Pan'kov S. L., Khalatov A. N. Ultradian rhythms in cardiac activity of bivalvia. *Dokl. Biol. Sci. Physiol.* 2009. Vol. 426. P. 216–218.

Marchan S., Davies M. S., Fleming S., Jones H. D. Effect of copper and zinc on the heart rate of the limpet *Patella vulgata* L. *J. Comp. Biochem. Physiol.* 1999. A. Vol. 123. P. 89–93.

Polhill B. J. V., Dimock R. V. Jr. Effects of temperature and pO₂ on the heart rate of juvenile and adult freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae). *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol.* 1996. Vol. 114, iss. 2. P. 135–141

Widdows J., Shick J. M. Physiological responses of *Mytilus edulis* and *Cardium edule* to aerial exposure. *Mar. Biol.* 1985. Vol. 85. P. 217–232.

Received May 15, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Ипатов Андрей Александрович

магистрант
Петрозаводский государственный университет,
физико-технический факультет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
е-mail: andrej.ipatov2011@yandex.ru
тел.: (8142) 764288

Бахмет Игорь Николаевич

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: igor.bakhmet@gmail.com
тел.: (8142) 769810

Екимов Дмитрий Анатольевич

старший преподаватель
Петрозаводский государственный университет,
физико-технический факультет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: edmitr@sampo.ru
тел.: (8142) 719662

Кулдин Николай Александрович

доцент
Петрозаводский государственный университет,
физико-технический факультет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: kuldin@petsu.ru
тел.: (8142) 719662

CONTRIBUTORS:

Ipatov, Andrey

Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: andrej.ipatov2011@yandex.ru
tel.: (8142) 764288

Bakhmet, Igor

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

Yekimov, Dmitry

Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: edmitr@sampo.ru
tel.: (8142) 719662

Kuldin, Nikolai

Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: kuldin@petsu.ru
tel.: (8142) 719662

УДК 577.3

ФАЗОВЫЕ ДИАГРАММЫ БЕЛКОВОГО РАСТВОРА И СТРУКТУРНЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ МОЛЕКУЛЫ БЕЛКА

С. П. Рожков, А. С. Горюнов

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Анализ стандартных термодинамических функций белка позволяет установить важные особенности фазового поведения белковых растворов, в частности, наличие на фазовой диаграмме (ФД) нижней и верхней критических температур растворения. Сопоставление фазовых и соответствующих конформационных превращений белковых структур с фазовыми превращениями раствора белка в целом на основе ФД дает возможность рассмотреть вопрос о соотношении конформации белков со структурной организацией белковых систем в предденатурационной области. В координатах температура–энтропия представлена ФД раствора глобулярного белка, на основе которой анализируются фазовые состояния раствора и устанавливается вероятная связь топологических структур, возникающих в закритической области ФД, с фазовыми процессами в низко- и высокотемпературной области, что демонстрирует возможность совмещения двух типов ФД – с нормальной и ретроградной растворимостью белка. В координатах температура – плотность упаковки предложена обобщенная ФД белкового раствора с нижней и верхней критическими температурами смешения и закритической зоной между ними, характерной для раствора нативного (N) белка, а также замкнутой зоной для раствора денатурированного (D) белка в диапазоне температур, сопредельном физиологическому. На этой основе с учетом вклада растворителя в низко- и высокотемпературном интервалах описана надмолекулярная организация белкового раствора, которая включает метастабильные фазы из молекул белка в конформациях, модифицированных по отношению к нативному и денатурированному состояниям, а также динамические кластеры и олигомеры белка в закритической зоне. Различные области ФД интерпретируются, в частности, в предположении, что молекулы в конформациях, соответствующих N и D состояниям, способны формировать различные нанокристаллические суперрешетки, которые определяют топологические особенности структурированности их растворов в широком диапазоне температур. Обсуждается возможная роль закритических фазовых состояний белковых растворов в саморегуляции химических потенциалов компонентов за счет надмолекулярной самоорганизации раствора при изменениях температуры и/или концентрации солей и тем самым в реакции на внешние факторы среды.

К л ю ч е в ы е с л о в а: глобулярный белок; конформационные состояния; фазовые переходы; закритические явления; критические температуры растворения; кластеры белка; надмолекулярная организация.

S. P. Rozhkov, A. S. Goryunov. PROTEIN SOLUTION PHASE DIAGRAMS AND PROTEIN MOLECULE STRUCTURAL TRANSITIONS

An analysis of standard thermodynamic functions of protein structure in solution allows revealing important features of protein solution phase behavior, particularly the presence of

higher and lower critical solution temperatures on phase diagram (PD). Linking the phase and the corresponding conformational transitions of protein molecules to phase transitions of the protein solution as a whole will provide consideration of the relationship between protein conformation and the structural organization of protein systems in the predenaturation interval. A phase diagram (PD) for the globular protein solution is presented in the temperature-entropy coordinate plane. Solution phase states have been analyzed and a probable interrelation of topological structures arising in the supercritical region with the phase processes in low- and high-temperature range has been defined when considering PD. This shows the possibility to superpose two types of PD: for normal and retrograde protein solubility. PD in the temperature-packing density plane has been presented for a protein solution with low and high critical solution temperatures and a supercritical zone between them typical of native protein solution, and a closed zone typical of denatured protein solution in the near physiological temperature interval. Supramolecular organization of protein solution has been described on this basis including metastable phases of protein molecules in conformations altered with respect to native (N) and denatured (D) states as well as dynamical protein clusters and oligomers in the supercritical zone. The contribution of the solvent in the low- and high-temperature ranges has also been taken into account. Various PD regions have been interpreted under the assumption that molecules in conformations, corresponding to N and D states are capable of forming different nanocrystal lattices which define the topological features of the corresponding solutions in a wide temperature range. Probable significance of supercritical phase states of protein solutions for the self-regulation of the components' chemical potentials at the expense of the solution supramolecular organization at changing temperature and/or salt concentration and thereby at changing environmental factors has been discussed.

Key words: globular protein; conformational states; phase transitions; supercritical phenomena; critical solution temperatures; protein clusters; supramolecular organization.

Введение

Фазовые превращения растворов нативных белков, образование конденсированных фаз в биологических жидкостях, содержащих белки, представляют значительный интерес с точки зрения целого ряда областей науки и технологии и лежат в основе разнообразных патологических состояний организма человека. Так, кристаллизация и полимеризация гемоглобина вызывают серповидноклеточную патологию [Charache et al., 1967; Vekilov, 2012]. Образование насыщенной белком жидкой фазы (фазовый переход жидкость – жидкость (L-L)) в сетчатке глаза связано с патологическим процессом, приводящим к катаракте [Berland et al., 1992; Asherie et al., 2001]. Образование кристаллов инсулина в поджелудочной железе защищает инсулин от действия протеаз, присутствующих в островках Лангерганса [Dodson, Steiner, 1998]. Регулируемая скорость растворения белковых кристаллов и обогащенных белком жидких микрокапель обеспечивает пролонгирование действия инсулина, интерферона, гормона роста в фармации; разработка средств доставки лекарственных препаратов основывается на синтезе частиц путем желирования или сшивания обогащенных белком жидких микрокапель [Bromberg et al., 2005].

Фазовые состояния белкового раствора, а также фазовые границы, определяющие условия существования и сосуществования этих состояний, находятся в центре внимания при термодинамическом описании фазовых превращений белковых растворов. Для растворов глобулярных белков были предложены классические варианты диаграмм фазового равновесия, известные для флюидных систем типа газ–жидкость и гетерогенных коллоидных систем [Muschol, Rozenberger, 1997; Zaccarelli, 2007] с фазовым переходом первого рода (ФП 1), заканчивающихся критическим ФП при определенной температуре и составе. В таком виде ФД позволяют представить фазовые равновесия и ФП жидкость – твердое тело (L-S), жидкость – плотная жидкость (L-L), золь – гель, обозначить зону существования метастабильных мезоскопических кластеров белка и олигомеров [Dumetz et al., 2008; Vekilov, 2012; Rozhkov, Goryunov, 2010] в закритической области ФД. Ранее нами было обосновано предположение [Рожков, Горюнов, 2014], что именно в области ФД, сопряженной с областью критических фазовых переходов, система вода–белок–соль в наибольшей степени способна к саморегуляции в ответ на изменения температуры и/или солености среды, что могло бы служить моделью установления механизмов

взаимодействия протеиноидной системы клетки с окружающей средой в реализации основополагающих принципов гомеостаза.

До недавнего времени считалось, что при ФП нативных белков с надлежащим образом свернутой полипептидной цепью структура белка не модифицируется, а внутримолекулярная динамика не влияет на термодинамическое равновесие или кинетические характеристики [Vekilov, 2012]. Однако в последнее время обнаруживается, что конформационные свойства белка могут быть весьма существенны с точки зрения механизма образования обогащенных белком микрофаз и мезоскопических кластеров [Vekilov, Vorontsova, 2014; Vorontsova et al., 2015]. В настоящее время исследование соотношения конформации белков с возникающей структурной организацией белковых систем в предденатурационной области температур вызывает все больший интерес [Bemporad, Chiti, 2012; Nicolai, Durand, 2013; Miti et al., 2015]. Поскольку тепловая и холодовая денатурация глобулярных белков представляют собой процессы, близкие к ФП 1 [Привалов, 1987], одним из подходов к рассмотрению этих вопросов является сопоставление фазовых и соответствующих конформационных превращений самих белковых структур с фазовыми превращениями раствора белка на основе обобщенной фазовой диаграммы. Нами ранее показано, что микрокалориметрические данные о стандартных термодинамических функциях белков позволяют установить важные особенности фазового поведения белковых растворов, в частности, одновременное наличие на фазовой диаграмме белкового раствора как нижней, так и верхней критических температур растворения [Рожков, Горюнов, 2015]. Эти результаты свидетельствуют о прямой взаимосвязи между конформационным состоянием белковой макромолекулы и фазовым состоянием белкового раствора, что открывает путь для построения обобщенной фазовой диаграммы водных растворов глобулярных белков, учитывающей и фазовое состояние внутримолекулярной структуры белка.

Таким образом, задача работы заключается в том, чтобы на основании известных термодинамических данных о конформационном состоянии молекул глобулярных белков (на примере лизоцима [Пфайль, Привалов, 1982; Привалов, 1987]) предложить фазовые диаграммы, позволяющие качественно описать фазовые состояния и превращения белковых растворов в широком диапазоне температур, включая низко- и высокотемпературные области, в которых конформационное состояние молекул белка,

а также межмолекулярное взаимодействие, гидратация и топология возникающих надмолекулярных структур существенно изменяются.

Фазовые состояния белкового раствора и фазовая диаграмма в плоскости температура – энтропия

Качественно представим раствор молекул белка в нативном (N) и денатурированном (D) состояниях в рамках топологической модели совокупности плотных упаковок жестких и мягких сфер, различающихся правилами упаковки и потенциалом взаимодействия. Рассмотрим фазовые переходы между N и D состояниями белка, а также раствора белка при этих переходах на фазовой диаграмме в координатной плоскости температура–энтропия (TS), имеющей тесную аналогию с плоскостью давление–объем (PV), где должен отчетливо проявляться скачок энтропии. Вид этих кривых может быть представлен только качественно, ибо даже для газа Ван-дер-Ваальса функции состояния получить не удастся. На рисунке 1 на основании экспериментальных данных о поведении энтропии лизоцима [Пфайль, Привалов, 1982] представлена обобщенная ФД раствора белка в плоскости (TS) в виде семейства изобар, где ФП 1 белка $D \leftrightarrow N$ и соответствующим переходам в растворе сопутствуют скачки энтропии (горизонтальные участки). Поскольку часто предельным случаем ФП 1 в плоскости PV является критический переход, который сопряжен с существованием метастабильных фаз (в нашем случае двух жидких фаз, поэтому это переходы типа L-L), **изобары могут быть представлены не плоским участком, а петлями типа петли Ван-дер-Ваальса (В-д-В), характеризующей переходы газ – жидкость, в том числе иметь изобары критического и за критического типа (см. рис. 1, пунктир).** Каждой изобаре соответствует свое давление (осмотическое), которое зависит от концентрации белка и других компонентов, присутствующих в растворе.

Наличие семейства изобар с петлей В-д-В может быть обусловлено возможностью образования различных метастабильных топологических структур раствора, который выступает как совокупность плотных упаковок жестких и мягких сфер. При этом каждому выделенному конформационному состоянию молекулы белка должен соответствовать свой удельный объем, свой тип гидратации и тип микрокристаллической решетки (или некристаллографических упорядоченных нанокластеров). Так, на примере дисперсий наночастиц показано, что взаимодействие с растворителем может

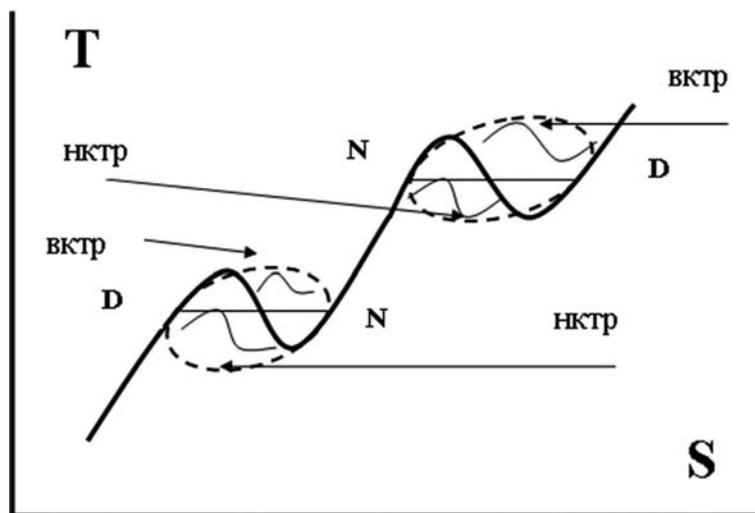


Рис. 1. Схематическое представление фазовой диаграммы раствора глобулярного белка в координатах температура T – стандартная энтропия S с изобарами в форме двух «петель» Ван-дер-Ваальса, соответствующих низкотемпературному и высокотемпературному фазовому переходу.

Горизонтальные отрезки соответствуют ФП первого рода между конформациями, соответствующими нативному и денатурированному состояниям белка. Наличие «петель» в области ФД, ограниченной пунктирными окружностями, указывает на существование метастабильных состояний (микрофаз) раствора белка с измененными конформациями, отличными от денатурированного и нативного. НКТР и ВКТР – нижняя и верхняя критические температуры растворения

способствовать образованию различающихся по плотности упаковки нанокристаллических суперрешеток [Goodfellow, Korgel, 2011] и таким образом приводить к кристаллическому полиморфизму [Wang et al., 2013], влияющему на фазовые свойства раствора.

Наличие критических изобар на рисунке 1 и метастабильных состояний имеет прямое отношение к термодинамической устойчивости системы [Rozhkov, Goryunov, 2014]. Граница термодинамической устойчивости раствора белка по отношению к процессам диффузии (к росту флуктуаций концентрации, предшествующих фазовому разделению) может быть определена из условия $\det|\delta^2G| = 0$, в котором детерминант устойчивости состоит из равных нулю коэффициентов устойчивости. В качестве последних фигурируют производные от термодинамических сил (температура T , давление P , химический потенциал μ_i) по сопряженным с ними координатам (энтропия S , объем V , концентрация c_i соответственно) [Базаров, 1983]. То есть в данном случае экстремумы изобар $\partial T/\partial S = 0$ определяют спинодаль ФД, а ноды, соединяющие противоположные стороны петли В-д-В – бинодаль ФД, аналогичные спинодали и бинадали на общей ФД белковых растворов в координатах температура–концентрация [Dumetz et al., 2008; Vekilov, 2012]. Разница заключается в том, что концентрация белка является термодинамическим параметром, пропорциональным осмотическому давлению,

от которого зависит конформация и плотность упаковки белковых молекул в соответствующей «нанокристаллической суперрешетке».

Ранее нами теоретически показана возможность того, что раствор глобулярного белка имеет одновременно как верхнюю, так и нижнюю критические температуры растворения (смешения) (ВКТР и НКТР), причем область между НКТР и ВКТР содержит закритическую зону, которая имеет двухфазный или однофазный характер в зависимости от конформации белка – **D или N соответственно** [Рожков, Горюнов, 2015].

Поскольку для **D-состояния** белка область между критическими точками на рисунке 1 двухфазна, то на закритической изобаре (пунктир) может иметь место петля В-д-В, отражающая тот факт, что метастабильные состояния белка в конформации, промежуточной между **D и N, могут реализоваться в форме мезоскопических белковых кластеров**. То, что она является закритической и отражает непрерывный $D \leftrightarrow D^*$ температурный фазовый переход между различными топологическими структурами раствора, различающимися параметром порядка, может указывать на жидкокристаллическую природу белковых кластеров. Такая же закритическая изобара может иметь место и для непрерывного $N \leftrightarrow N^*$ фазового перехода.

Таким образом, рисунок 1 показывает возможную связь топологических структур, возникающих в закритической области ФД,

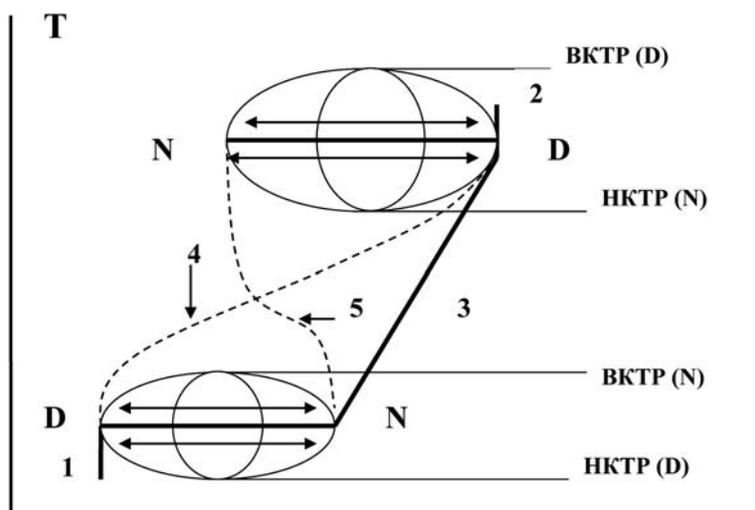


Рис. 2. Фазовая диаграмма раствора глобулярного белка в координатах температура – плотность упаковки.

Вертикальные отрезки 1 и 2 соответствуют фазе раствора с молекулами белка в денатурированном состоянии. Отрезок 3 характеризует твердую фазу белка из нативных молекул. Большие полусегменты представляют бинадали, сопряженные с фазовым переходом (ФП) первого рода между D и N состояниями при низких и высоких температурах (жирные горизонтальные линии). Тонкие стрелки указывают на ФП типа жидкость – жидкость (L-L). Малые полусегменты представляют спинодали, сходящиеся с бинадалями в критических точках: ВКТР и НКТР соответственно для растворов N и D белка. Пунктир 4 – кривая растворимости молекул белка в конформации, близкой к D; 5 – кривая растворимости молекул белка в конформации, близкой к N. Относительное расположение нижнего и верхнего эллипсов весьма условно, так как неизвестна плотность упаковки соответствующих белковых структур в нанокристаллические суперрешетки

с фазовыми процессами в низко- и высоко-температурной области и демонстрирует возможность совмещения двух типов фазовых диаграмм – с нормальной и ретроградной растворимостью белка – в координатной плоскости TS. Следовательно, для лучшего понимания механизмов возникновения структурной организации растворов белка ФД может быть представлена и в других координатах, например, в координатах температура – плотность упаковки, при постоянном давлении, определяемом концентрацией белка. Плотность упаковки здесь может определяться как конформационным состоянием молекул белка, так и строением возможных топологических структур (кристаллографических решеток или некристаллографических структур).

Надмолекулярная организация белкового раствора и фазовая диаграмма в плоскости температура – плотность упаковки

Здесь будем исходить из следующих допущений. Во-первых, считаем, что в D-состоянии при низких температурах молекулы белков образуют кристаллогидраты (clathrate hydrates, solid solvates), гидратация же N-состояния имеет другой тип. Во-вторых, белок может кристаллизоваться в различных кристаллографических сингониях (для лизоцима это тетрагональная и орторомбическая). В этих сингониях

вероятно образование сложных элементарных ячеек, отличающихся по плотности упаковки молекул: объемноцентрированная, гранецентрированная, базоцентрированная, а также их деформированные аналоги. В-третьих, нанокристаллическая структура влияет на свойства раствора.

Суммируя вышесказанное, мы предлагаем гипотетическую ФД раствора белка в координатах температура – плотность упаковки для заданной (достаточно большой по отношению к растворимости) концентрации белка как параметра. На рисунке 2 она представлена в широком диапазоне температур, со спинодалями (малые дуги), бинадалями (большие дуги), критическими точками ВКТР и НКТР, замкнутой областью между ВКТР и НКТР для нативного белка (замкнутой областью между НКТР и ВКТР для денатурированного белка), а также кривыми растворимости в закритической области, соответствующими: (4) – молекулам белка с конформациями, близкими к D, способными формировать свой тип кристаллической ячейки и (5) – молекулам белка с конформациями, близкими к N, способными формировать другой тип кристаллической ячейки. Относительное расположение нижних и верхних дуг весьма условно, так как данные об изменении плотности упаковки микрокристаллических ячеек с температурой в литературе отсутствуют.

На рисунке 2 вертикальные отрезки 1 и 2 – это условные границы твердой фазы, образованной денатурированными гидратированными молекулами белка в результате их холодной (1) и тепловой (2) денатурации. Вероятно, в первом случае это кристаллогидраты, возникающие вследствие расклинивающего действия упорядоченной воды из-за взаимодействия с неполярными группами белка. Во втором случае денатурированный белок может образовывать фибриллы, благодаря чему плотность упаковки белка может быть высокой. Отрезок 3 характеризует кристаллическую фазу, сформированную молекулами белка в N-конформации.

Нижний горизонтальный отрезок соответствует равновесию фаз из **D и N молекул, в каждой из которых формируется соответствующая упаковка молекул, различающаяся по плотности.** При этом какая-то часть молекул при температуре выше температуры ФП 1 может оставаться в измененной, промежуточной между **D и N конформации** $\langle(DN)\rangle$ **в результате взаимодействия с растворителем, ионами солей, лигандами и т. п., в которой они способны образовывать нанокристаллическую суперрешетку из дефектных ячеек.** Дальнейшее поведение таких молекул с ростом температуры и концентрации характеризуется кривой растворимости (4). При определенной концентрации и температуре (по мере достижения бинодали) они образуют более плотную метастабильную фазу из $\langle(DN)\rangle$ молекул. **В этой плотной фазе в результате межмолекулярного взаимодействия конформация молекул и гидратация будет более близка к N [King et al., 2014], и в ней могут возникать зародыши твердой N-фазы.** По мере дальнейшего роста температуры в закритической зоне в области кривой растворимости (4) часть $\langle(DN)\rangle$ молекул может переходить в состав достаточно больших метастабильных мезоскопических кластеров (в соответствующих условиях они обнаружены экспериментально [Vekilov, 2012]), поскольку для D-белка эта область двухфазная. Это повышает коллоидную растворимость молекул белка. Наиболее вероятно, что природа таких кластеров – жидкокристаллическая, и обусловлена она остаточной гидратацией, существующей при пониженных температурах и дестабилизирующейся с ростом температуры или под действием электролита. Возможно, что в условиях краудинга (в мезоскопических кластерах) образуются кристаллосольватные структуры благодаря коллективной гидратации биомакромолекул, распространяющейся на расстоянии в несколько нанометров [King et al., 2014]. Можно также допустить, что исходная низкотемпературная

кристаллогидратная структура способна сохраняться при более высоких температурах в составе мезоскопических кластеров. В этих кластерах также могут появляться зародыши твердой фазы, которые, однако, имеют преимущественно иной тип кристаллической сингонии, по сравнению с теми, что создают N-молекулы. Вместе с тем в таких кластерах могут идти и процессы полимеризации вплоть до образования криволинейных фибрилл [Vekilov, 2012]. Таким образом, имеет место непрерывный закритический $D \leftrightarrow D^*$ фазовый переход с изменением параметра порядка.

Кривая (5) характеризует растворимость молекул в N-конформации или близкой к ней. Эти молекулы остаются после разрушения плотных мезоскопических фаз при температурах выше бинодали и критической температуры. Хотя белок в плотной фазе может сохранять признаки кристаллогидратов, его растворимость должна быстро уменьшаться с ростом температуры, поскольку он не способен образовывать метастабильные кластеры, так как для N-конформации закритическая область однофазна. Уменьшение же растворимости с ростом температуры указывает на образование димеров, тримеров и других небольших N-олигомеров [Stradner et al., 2006]. При определенной концентрации белка (граница верхней бинодали ниже $N \leftrightarrow D$ равновесия) N-олигомеры и искривленные фибриллы образуют метастабильные фазы, регистрируемые как L-L фазовый переход [Miti et al., 2015].

Оставшиеся в растворе N^* -мономеры, изменившие свою конформацию в результате непрерывного фазового перехода, при котором меняется параметр порядка, по достижении определенной температуры (рис. 2, верхняя горизонтальная линия) претерпевают ФП 1 с образованием плотных линейных фибрилл [Miti et al., 2015]. **Наличие спинодалей на ФД также подразумевает протекание в этих областях ФД неравновесных, обусловленных кинетикой, процессов гелеобразования и/или преципитации [Miti et al., 2015].**

Заключение

В настоящей работе на основе фазовой диаграммы дана термодинамическая интерпретация особенностей надмолекулярной организации раствора, включающих метастабильные жидкие фазы, кластеры белка, топологии надмолекулярных структур. ФД характеризуется тем, что содержит одновременно НКТР и ВКТР, а также закритическую зону, в которой фазовое состояние раствора белка

определяется его конформационным состоянием. Несмотря на большое значение, которое придается структурно-конформационным изменениям биомакромолекул при повышенных температурах и/или под действием денатурантов в связи с процессами фибриллогенеза, закритическая зона представляет особый интерес. Это область ФД между ВКТР и НКТР, где мономеры белка имеют преимущественно N-конформацию, а в составе мезоскопических кластеров могут быть ближе к D-конформации и формировать жидкокристаллические структуры. Это термодинамически устойчивая и макроскопически однофазная область, хотя термодинамическая устойчивость такой системы, например, по отношению к низко- и высокотемпературным фазам понижена, что проявляется в образовании мезоскопических динамических кластеров белковых молекул и олигомеров в растворе стабильных нативных молекул [Рожков, 2005]. Процессы, происходящие в этой зоне, могут служить моделью физико-химического состояния белковой части клеточной протоплазмы, которую следует рассматривать в сопряжении с состоянием межклеточной жидкости, в силу их совместных возможностей в регуляции гомеостаза в ответ на изменение температуры или состава системы.

Температурный диапазон критической и закритической области системы вода–белок–соль определяется величиной отношения концентрации биополимера к концентрации электролита, которая в рамках используемой модели зависит от числа мест сорбции ионов на белке, заряда белка, коэффициента активности электролита [Рожков, 2005; Rozhkov, Goryunov, 2010]. Закритическое состояние обладает локальным минимумом свободной энергии, поэтому система самопроизвольно достигает этого состояния при изменении состава, например, при увеличении концентрации белка. Система как бы фиксируется в этом состоянии, поскольку при кратковременных скачках внешних параметров среды (температуры, давления, солености) выход из него оказывается затруднен благодаря низким значениям кинетических коэффициентов, характерных для систем с пониженной устойчивостью. Кроме того, если длительное, но умеренное изменение температуры в ту или иную сторону выводит систему из закритического состояния, то возросшая диффузия компонентов раствора в соседнюю фазу может вызывать уже в ней возникновение критического состояния. Поскольку в критическом состоянии прекращается самодиффузия молекул, это не приводит к потере вещества в соседней фазе в окружении исходной системы из-за диффузии. Поэтому если

воздействие на такую сопряженную систему исчезает, то со временем содержимое исходной системы восстанавливается за счет соседней фазы и состояние исходной системы самопроизвольно возвращается в закритическое. При накоплении в исходной среде количества электролита и биополимеров, удовлетворяющего необходимому соотношению концентраций для образования закритического состояния, оно могло быть объектом запоминания, эволюции и отбора [Рожков, 2005]. В процессе отбора в закритическом состоянии могла оказаться «клеточная цитоплазма», а «межклеточная» жидкость – переходить в критическое состояние при изменении внешних условий, вызывающих перераспределение вещества между «клеткой» и средой [Рожков, Горюнов, 2014]. Такая самосопряженная система теоретически может эффективно реагировать на скачки температуры, солености и другие дестабилизирующие факторы, поддерживая необходимую гомеостатическую норму функции на единицу структуры, даже без затраты метаболической энергии. Появление же источников такой энергии и мест ее приложения – уже другой этап эволюции и, вероятно, мог быть обусловлен образованием мембраны на границе раздела фаз предкритической и закритической.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (№ 0221-2014-0010).

Литература

- Базаров И. П. Термодинамика. М.: Высшая школа, 1983. 344 с.
- Привалов П. Л. Стабильность белка и гидрофобные взаимодействия // Биофизика. 1987. Т. 32, № 5. С. 742–759.
- Пфайль В., Привалов П. Конформационные изменения в белках // Биохимическая термодинамика / Ред. М. Джоунс. Пер. с англ. М.: Мир, 1982. 440 с.
- Рожков С. П. Критические явления, фазовые равновесия и структурно-температурный оптимум гомеостаза в модельной системе вода–биополимер–электролит // Биофизика. 2005. Т. 50, № 2. С. 215–222.
- Рожков С. П., Горюнов А. С. Фазовые состояния системы вода–белок (полипептид)–соль и реакция на внешние факторы среды // Биофизика. 2014. Т. 59, № 1. С. 54–60.
- Рожков С. П., Горюнов А. С. Термодинамическое сродство к растворителю как критерий критических температур растворения белковых макромолекул // Труды КарНЦ РАН. 2015. № 12. С. 96–100. doi: 10.17076/eb234.
- Asherie N., Pande J., Pande A. et al. Enhanced crystallization of the Cys18 to Ser mutant of bovine gammaB

crystallin // *J. Mol. Biol.* 2001. Vol. 314. P. 663–669. doi: 10.1006/jmbi.2001.5155.

Bemporad F., Chiti F. Protein misfolded oligomers: experimental approaches, mechanism of formation, and structure-toxicity relationship // *Chemistry and Biology.* 2012. Vol. 19. P. 315–327. doi: 10.1016/j.chembiol.2012.02.003.

Berland C. R., Thurston G. M., Kondo M. et al. Solid-liquid phase boundaries of lens protein solutions // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1992. Vol. 89. P. 1214–1218.

Bromberg L., Rashba-Step J., Scott T. Insulin particle formation in supersaturated aqueous solutions of poly (ethylene glycol) // *Biophys. J.* 2005. Vol. 89. P. 3424–3433. doi: 10.1529/biophysj.105.062802.

Charache S., Conley C. L., Waugh D. F. et al. Pathogenesis of hemolytic anemia in homozygous hemoglobin C disease // *J. Clin. Invest.* 1967. Vol. 46. P. 1795–1811.

Dumetz A. C., Chockla A. M., Kaler E. W., Lenhoff A. M. Protein phase behavior in aqueous solutions: crystallization, liquid-liquid phase separation, gels, and aggregates // *Biophys. J.* 2008. Vol. 94. P. 570–583. doi: 10.1529/biophysj.107.116152.

Dodson G., Steiner D. The role of assembly in insulin's biosynthesis // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1998. Vol. 8. P. 189–194. doi: 10.1016/S0959-440X(98)80037-7.

Goodfellow B. W., Korgel B. A. Reversible solvent vapor-mediated phase changes in nanocrystal superlattices // *ACS Nano.* 2011. Vol. 5, No 4. P. 2419–2424. doi: 10.1021/nn201273c.

King J. T., Arthur E. J., Brooks III C. L., Kubarych K. J. Crowding induced collective hydration of biological macromolecules over extended distances // *J. Amer. Chem. Soc.* 2014. Vol. 136. P. 188–194. doi: 10.1021/ja407858c.

Miti T., Mulaj M., Schmidt J. D., Muschol M. Stable, metastable, and kinetically trapped amyloid aggregate phases // *Biomacromolecules.* 2015. Vol. 16. P. 326–335. doi: 10.1021/bm501521r.

Muschol M., Rozenberger F. Liquid-liquid phase separation in supersaturated lysozyme solutions and associated precipitate formation/crystallization

// *J. Chem. Phys.* 1997. Vol. 107, No 6. P. 1953–1962. doi: 10.1063/1.474547.

Nicolai T., Durand D. Controlled food protein aggregation for new functionality // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2013. Vol. 18. P. 249–256. doi: 10.1016/j.cocis.2013.03.001.

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Thermodynamic study of protein phases formation and clustering in model water-protein-salt solutions // *Biophys. Chem.* 2010. Vol. 151, No 1–2. P. 22–28. doi: 10.1016/j.bpc.2010.04.007.

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Dynamic protein clusterization in supercritical region of the phase diagram of water-protein-salt solutions // *J. Supercritical Fluids.* 2014. Vol. 95. P. 68–74. doi: 10.1016/j.supflu.2014.07.028.

Stradner A., Cardinaux F., Schurtenberger P. A small-angle scattering study on equilibrium clusters in lysozyme solutions // *J. Phys. Chem. B.* 2006. Vol. 110. P. 21222–21231. doi: 10.1021/jp0639804.

Vekilov P. G. Phase diagrams and kinetics of phase transitions in protein solutions // *J. Phys.: Condens. Matter.* 2012. Vol. 24. P. 193101. doi: 10.1088/0953-8984/24/19/193101.

Vekilov P. G., Vorontsova M. A. Nucleation precursors in protein crystallization // *Acta Cryst.* 2014. Vol. F70. P. 271–282. doi: 10.1107/S2053230X14002386.

Vorontsova M. A., Maes D., Vekilov P. G. Recent advances in the understanding of two-step nucleation of protein crystals // *Faraday Discuss.* 2015. Vol. 179. P. 27–40. doi: 10.1039/c4fd00217b.

Wang Z., Schliehe C., Bian K. et al. Correlating superlattice polymorphs to internanoparticle distance, packing density, and surface lattice in assemblies of pbs nanoparticles // *Nano Lett.* 2013. Vol. 13, No 3. P. 1303–1311. doi: 10.1021/nl400084k.

Zaccarelli E. Colloidal gels: equilibrium and non-equilibrium routes // *J. Phys.: Condens. Matter.* 2007. Vol. 19. P. 323101. doi: 10.1088/0953-8984/19/32/323101.

Поступила в редакцию 10.09.2015

References

Bazarov I. P. Termodinamika [Thermodynamics]. Moscow: Vysshaja shkola, 1983. 344 p.

Privalov P. L. Stabil'nost' belka i gidrofobnye vzaimodejstvija [Protein stability and hydrophobic interactions]. *Biofizika.* 1987. Vol. 32, No 5. P. 742–759.

Pfeil V., Privalov P. Konformacionnye izmenenija v belkah [Conformational changes in proteins]. In: *Biochemical Thermodynamics.* Ed. M. N. Jones. Amsterdam, Oxford, N. Y.: Elsevier Scientific Publ. Co., 1979. 440 p.

Rozhkov S. P. Kriticheskie javlenija, fazovye ravnovesija i strukturno-temperaturnyj optimum gomeostaza v model'noj sisteme voda-biopolimer-jelektrolit [Critical phenomena, phase equilibria, and structural temperature optimum of homeostasis in the water-biopolymer-electrolyte model system]. *Biofizika.* 2005. Vol. 50, No 2. P. 215–222.

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Fazovye sostojanija sistemy voda-belok (polipeptid)-sol' i reakcija na vneshnie faktory sredy [Phase states of water-protein (polypeptide)-salt system and reaction to external environment factors]. *Biophysics.* 2014. Vol. 59, No 1. P. 43–48. doi: 10.1134/S0006350914010175.

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Termodinamicheskoe srodstvo k rastvoritelju kak kriterij kriticheskikh temperatur rastvorenija belkovyh makromolekul [Thermodynamic affinity for solvent as a criterion of critical solution temperatures of protein macromolecules]. *Trudy KarNC RAN [Transactions of the KarRC RAS].* 2015. No 12. P. 96–100. doi: 10.17076/eb234.

Asherie N., Pande J., Pande A., Zarutskie J. A., Lomakin J., Lomakin A., Ogun O., Stern L. J., King J., Benedek G. B. Enhanced crystallization of the Cys18 to Ser mutant of bovine gammaB crystallin. *J. Mol. Biol.*

2001. Vol. 314. P. 663–669. doi: 10.1006/jmbi.2001.5155.

Bemporad F., Chiti F. Protein misfolded oligomers: experimental approaches, mechanism of formation, and structure-toxicity relationship. *Chemistry and Biology*. 2012. Vol. 19. P. 315–327. doi: 10.1016/j.chembiol.2012.02.003.

Berland C. R., Thurston G. M., Kondo M., Broide M. L., Pande J., Ogun O., Benedek G. B. Solid-liquid phase boundaries of lens protein solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. Vol. 89. P. 1214–1218.

Bromberg L., Rashba-Step J., Scott T. Insulin particle formation in supersaturated aqueous solutions of poly (ethylene glycol). *Biophys. J.* 2005. Vol. 89. P. 3424–3433. doi: 10.1529/biophysj.105.062802.

Charache S., Conley C. L., Waugh D. F., Ugoletz R. J., Spurrell J. R. Pathogenesis of hemolytic anemia in homozygous hemoglobin C disease. *J. Clin. Invest.* 1967. Vol. 46. P. 1795–1811.

Dumetz A. C., Chockla A. M., Kaler E. W., Lenhoff A. M. Protein phase behavior in aqueous solutions: crystallization, liquid-liquid phase separation, gels, and aggregates. *Biophys. J.* 2008. Vol. 94. P. 570–583. doi: 10.1529/biophysj.107.116152.

Dodson G., Steiner D. The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1998. Vol. 8. P. 189–194. doi: 10.1016/S0959-440X(98)80037-7.

Goodfellow B. W., Korgel B. A. Reversible solvent vapor-mediated phase changes in nanocrystal superlattices. *ACS Nano*. 2011. Vol. 5, No 4. P. 2419–2424. doi: 10.1021/nn201273c.

King J. T., Arthur E. J., Brooks III C. L., Kubarych K. J. Crowding induced collective hydration of biological macromolecules over extended distances. *J. Amer. Chem. Soc.* 2014. Vol. 136. P. 188–194. doi: 10.1021/ja407858c.

Miti T., Mulaj M., Schmidt J. D., Muschol M. Stable, metastable, and kinetically trapped amyloid aggregate phases. *Biomacromolecules*. 2015. Vol. 16. P. 326–335. doi: 10.1021/bm501521r.

Muschol M., Rozenberger F. Liquid-liquid phase separation in supersaturated lysozyme solutions and associated precipitate formation/crystallization.

J. Chem. Phys. 1997. Vol. 107, No 6. P. 1953–1962. doi: 10.1063/1.474547.

Nicolai T., Durand D. Controlled food protein aggregation for new functionality. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2013. Vol. 18. P. 249–256. doi: 10.1016/j.cocis.2013.03.001.

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Thermodynamic study of protein phases formation and clustering in model water-protein-salt solutions. *Biophys. Chem.* 2010. Vol. 151, No 1–2. P. 22–28. doi: 10.1016/j.bpc.2010.04.007.

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Dynamic protein clusterization in supercritical region of the phase diagram of water-protein-salt solutions. *J. Supercritical Fluids*. 2014. Vol. 95. P. 68–74. doi: 10.1016/j.supflu.2014.07.028.

Stradner A., Cardinaux F., Schurtenberger P. A small-angle scattering study on equilibrium clusters in lysozyme solutions. *J. Phys. Chem. B*. 2006. Vol. 110. P. 21222–21231. doi: 10.1021/jp0639804.

Vekilov P. G. Phase diagrams and kinetics of phase transitions in protein solutions. *J. Phys.: Condens. Matter*. 2012. Vol. 24. P. 193101. doi: 10.1088/0953-8984/24/19/193101.

Vekilov P. G., Vorontsova M. A. Nucleation precursors in protein crystallization. *Acta Cryst.* 2014. Vol. F70. P. 271–282. doi: 10.1107/S2053230X14002386.

Vorontsova M. A., Maes D., Vekilov P. G. Recent advances in the understanding of two-step nucleation of protein crystals. *Faraday Discuss.* 2015. Vol. 179. P. 27–40. doi: 10.1039/c4fd00217b.

Wang Z., Schliehe C., Bian K., Dale D., Bassett W. A., Hanrath T., Klinke C., Weller H. Correlating superlattice polymorphs to internanoparticle distance, packing density, and surface lattice in assemblies of pbs nanoparticles. *Nano Lett.* 2013. Vol. 13, No 3. P. 1303–1311. doi: 10.1021/nl400084k.

Zaccarelli E. Colloidal gels: equilibrium and non-equilibrium routes. *J. Phys.: Condens. Matter*. 2007. Vol. 19. P. 323101. doi: 10.1088/0953-8984/19/32/323101.

Received September 10, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Рожков Сергей Павлович

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

Горюнов Андрей Сергеевич

ведущий научный сотрудник, к. ф.-м. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: goryunov@krc.karelia.ru

CONTRIBUTORS:

Rozhkov, Sergey

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

Goryunov, Andrey

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

УДК 577.3

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКОЕ СРОДСТВО К РАСТВОРИТЕЛЮ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ КРИТИЧЕСКИХ ТЕМПЕРАТУР РАСТВОРЕНИЯ БЕЛКОВЫХ МАКРОМОЛЕКУЛ

С. П. Рожков, А. С. Горюнов

Институт биологии Карельского научного центра РАН

В связи с сопряженностью внутри- и межмолекулярных взаимодействий в белковых системах фазовые превращения белковых растворов, интерес к которым обусловлен их значением для биотехнологии и биомедицины, должны быть проанализированы с точки зрения их взаимосвязи с фазовыми превращениями структуры белковых молекул, в частности на основе данных о термодинамических функциях. Температурные тренды стандартных термодинамических функций нативного (N) и денатурированного (D) белка в растворе рассмотрены в рамках представлений об избыточных функциях смешения, характеризующих термодинамическое сродство молекул белка к растворителю. Построены термодинамические функции смешения белков в N и D состояниях на основе микрокалориметрических данных. Показано, что характер изменения с температурой энтальпии, энтропии и свободной энергии белка свидетельствует о теоретически возможном наличии в его растворе как верхней, так и нижней критических температур растворения (смешения). Для некоторых белков в специальных условиях (состав растворителя, pH и др.) на это ранее имелись только экспериментальные указания, но не было дано термодинамической интерпретации. При этом в области фазовой диаграммы между нижней и верхней критическими температурами растворения имеется закритическая зона. Она носит двухфазный или однофазный характер в зависимости от конформации белка – D или N соответственно. Это относится к диапазону температур, сопредельному с физиологическим, и открывает возможность для описания надмолекулярной организации белкового раствора в этих условиях. Значение зоны закритических фазовых состояний белковых растворов определяется ее возможной ролью в саморегуляции системы в ответ на изменение внешних условий среды (температуры, солёности, кислотности и др.).

К л ю ч е в ы е с л о в а: фазовая диаграмма; закритические состояния; термодинамические функции смешения; критические температуры растворения; конформационные состояния.

S. P. Rozhkov, A. S. Goryunov. THERMODYNAMIC AFFINITY FOR SOLVENT AS A CRITERION OF CRITICAL SOLUTION TEMPERATURES OF PROTEIN MACROMOLECULES

Phase transitions of protein solutions which are of interest for biotechnological and biomedical purposes should be analyzed from the point of view of their interrelation with phase transitions of the structure of protein molecules on the basis of the state thermodynamic functions. This is suggested by the coupling of intra- and intermolecular interactions in protein systems. Temperature trends of the standard thermodynamic functions of

native (N) and denatured (D) protein in a solution have been considered within the framework of the concept of excessive melting functions, which determine the thermodynamic affinity of protein molecules for solvent. Thermodynamic solution functions of protein in the native (N) and denatured (D) states were built on the basis of microcalorimetry data. The nature of temperature-related changes in enthalpy, entropy and free energy suggests a theoretical possibility of both higher and lower critical solution temperatures being present. Previously there were only experimental indications for some proteins under certain conditions (solvent composition, pH, etc.), but thermodynamic interpretation was lacking. Furthermore, there appears a supercritical zone between the low and the high critical solution temperatures in the phase diagram. This zone is of two-phase or one-phase type depending on the protein conformation – D or N, respectively. This applies to the range next to physiological temperatures and makes the description of supramolecular organization of a protein solution possible under such conditions. The significance of the supercritical zone of protein phase states is determined by its probable contribution to self-regulation of the system in response to changes in environmental conditions (temperature, salinity, acidity, etc.).

Keywords: phase diagram; supercritical states; thermodynamic melting functions; critical solution temperatures; conformational states.

Система внутримолекулярных взаимодействий (связей), определяющих конформацию белка в растворе, простирается за пределы собственно макромолекулы белка независимо от количества составляющих ее полипептидных цепей вплоть до надмолекулярного уровня организации, включая и образование кристаллов [Ламри, Билтонен, 1973; Финкельштейн, Птицын, 2002]. Это позволяет сопоставлять фазовые превращения самих белковых структур с фазовыми превращениями в растворах белка. В настоящее время исследование соотношения конформации белков с возникающей в белковых системах структурной организацией в предденатурационной области температур привлекает все большее внимание [Golub et al., 2007; Vemporad, Chiti, 2012; Nicolai, Durand, 2013; Miti et al., 2015] в связи с возрастающим интересом к проблемам кристаллизации белков, возникновения сложной гетерофазной организации растворов белков в широком диапазоне температур и составов, расшифровки физико-химических механизмов конденсационных заболеваний. Однако до сих пор как экспериментально, так и теоретически анализируются дисперсии белков с ВКТР (верхней критической температурой растворения (смешения) метастабильных жидких фаз, различающихся по концентрации белка). В то же время белковые дисперсии, исследованные на предмет построения фазовых диаграмм (ФД), в равной степени представлены системами как с ВКТР, так и с **нижней критической температурой растворения (НКТР)** [Muschol, Rozenberger, 1997; Grouazel et al., 2006]. Кроме того, в растворах белков (альбумина, лизоцима, инсулина), имеющих ВКТР в низкотемпературном диапазоне, в высокотемпературном диапазоне и/или при пониженных

значениях pH имеет место активное фазовое разделение, характерное для систем с НКТР [Juarez et al., 2009; Ravi et al., 2014]. Растворы различных гемоглобинов, в зависимости от лигандного состояния, степени насыщения кислородом, взаимодействия с фосфатами, могут изменять агрегатное (фазовое) состояние как при понижении, так и при повышении температуры [Рожков, 1996; Han, Herzfeld, 1998]. Поэтому есть основания полагать, что растворы молекул белка одного и того же типа в зависимости от состава растворителя, pH и/или других условий могут менять свое фазовое состояние как при нагревании, так и при охлаждении и иметь как НКТР, так и ВКТР. Теоретический термодинамический анализ таких систем показывает, что объяснение наличия одновременного НКТР и ВКТР требует тщательного учета свойства воды как растворителя [Рожков, 1996; Shiryaev et al., 2005], а именно термодинамического сродства белка к растворителю.

В работе ставится задача рассмотреть температурные тренды стандартных термодинамических функций нативного (N) и денатурированного (D) белка в растворе в рамках представлений об избыточных функциях смешения, используя известные данные о термодинамических функциях состояния молекул глобулярных белков, а на этой основе установить, теоретически исходя из представлений физической химии растворов биополимеров, возможность того, что ФД раствора макромолекул глобулярного белка содержит одновременно как НКТР, так и ВКТР. Это открывает путь для построения в дальнейшем обобщенной фазовой диаграммы водных растворов глобулярных белков путем совмещения двух типов ФД – с нормальной и ретроградной растворимостью белка.

Типичные экспериментальные зависимости разности энтальпии $\Delta H_N^D = H^D - H^N$, энтропии $\Delta S_N^D = S^D - S^N$ и энергии Гиббса $\Delta G_N^D = G^D - G^N$ денатурированного и нативного белка свидетельствуют о том, что тепловая и холодовая денатурация глобулярных белков – это ФП, близкие к ФП 1 рода, которые происходят при $\Delta G_N^D = 0$ [Привалов, 1987]. Максимум на кривой ΔG_N^D в промежутке между точками тепловой и холодовой денатурации характеризует максимальную стабилизацию нативной структуры белка в области температур, близких к физиологическим. Однако, в силу опосредованного растворителем сопряжения внутри- и межмолекулярных взаимодействий белковых молекул, аналогичные переходы должны присутствовать и на ФД белковых растворов. Это обусловлено и тем, что именно взаимодействие с водой определяет тепловые эффекты макромолекул и топологическую модель структуры раствора, где в конфигурациях случайных плотных упаковок молекул белка существуют элементы как кристаллографических, так и некристаллографических (кластеры, фибриллы) упаковок.

Поскольку вода является идеальным растворителем для неполярных органических жидкостей при температурах выше 112 °С, в том числе и для неполярных групп белка, считается, что в этих условиях они не должны взаимодействовать с водой [Привалов, 1987], т. е. компоненты раствора как бы не смешаны и находятся в своих основных состояниях. Микрокалориметрические данные о термодинамических функциях белков в нативном и денатурированном состояниях [Пфайль, Привалов, 1982; Привалов, 1987] могут быть использованы для построения термодинамических функций смешения, характеризующих термодинамическое сродство белка к растворителю:

$$\Delta H_M^N = H^N - H^C; \Delta S_M^N = S^N - S^C; \Delta G_M^N = G^N - G^C$$

и

$$\Delta H_M^D = H^D - H^C; \Delta S_M^D = S^D - S^C; \Delta G_M^D = G^D - G^C,$$

где H^C , S^C , G^C – термодинамические функции компонентов раствора в основных состояниях; индекс М обозначает функцию смешения. Тогда избыток изменения термодинамической функции раствора для нативного белка (энтальпии и энтропии) может быть записан как

$$\Delta H_E^N = \Delta H_M^N - \Delta H_M^D = H^N - H^D;$$

$$\Delta S_E^N = \Delta S_M^N - \Delta S_M^D = S^N - S^D,$$

и для раствора денатурированного белка:

$$\Delta H_E^D = \Delta H_M^D - \Delta H_M^N = H^D - H^N$$

и

$$\Delta S_E^D = \Delta S_M^D - \Delta S_M^N = S^D - S^N.$$

Индекс Е обозначает избыточное изменение функции.

Поскольку температура фазового перехода Т определяется из условия $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = 0$, то фазовый переход в растворе нативного белка будет иметь место при температуре:

$$T = \Delta H_E^N / \Delta S_E^N \sim (H^N - H^D) / (S^N - S^D), \quad (1)$$

и в растворе денатурированного белка при температуре:

$$T = \Delta H_E^D / \Delta S_E^D \sim (H^D - H^N) / (S^D - S^N). \quad (2)$$

С другой стороны, способы экспериментального определения и расчета термодинамических функций нативного и денатурированного состояний белка в растворе, так же как и содержание этих понятий, позволяют считать, что приводимые значения [Пфайль, Привалов, 1982] близки по смыслу и величине термодинамическим функциям растворения (смешения) для этих состояний [Гросберг, Хохлов, 1989; Тагер, 2007]. Это позволяет судить о характере изменений термодинамических функций, и в частности ΔG_M растворения нативного и денатурированного белка по зависимостям, известным для G_D и G_N [Привалов, 1987]: кривые располагаются полностью (N) или преимущественно (D) в отрицательной области значений с максимумом при близких к нулю положительных температурах. Исходя из положений физической химии растворов полимеров, если ΔG_M в области более низких температур возрастает по абсолютной величине, а в области более высоких температур убывает с ростом температуры, то на фазовой диаграмме раствора полимера имеем как ВКТР, так и НКТР, причем ВКТР < НКТР. Сама фазовая диаграмма при этом представляет собой две кривые с экстремумами: верхняя – с минимумом в НКТР, нижняя – с максимумом в ВКТР. Именно такой характер изменений мы и наблюдаем как для G_N , так и для G_D : свободная энергия как нативного, так и денатурированного состояний снижается в диапазоне выше 20 °С; в диапазоне ниже 10 °С наблюдается лишь небольшое снижение свободной энергии, хотя сам ход зависимостей не оставляет сомнений в том, что свободная энергия обоих состояний в этом и более низкотемпературном диапазоне уменьшается по абсолютной величине с ростом температуры.

Это, конечно же, ни в коем случае не означает, что область НКТР и соответствующего фазового разделения отвечает холодовой денатурации белка, а область ВКТР – тепловой денатурации.

Энтальпия и энтропия нативного состояния белка при достаточно низких температурах

превышают энтальпию и энтропию денатурированного состояния [Пфайль, Привалов, 1982; Привалов, 1987]. Экспериментальные температурные зависимости функций стандартной энтропии и энтальпии денатурированного и нативного белка свидетельствуют, что по мере роста температуры эти функции меняют знак, причем энтальпия переходит через ноль при более низкой температуре.

Из уравнения (1) следует, что температуры фазового перехода определены при условии: (1) $\Delta H_E^N > 0$; $\Delta S_E^N > 0$ и (2) $\Delta H_E^N < 0$; $\Delta S_E^N < 0$. Анализ показывает, что условие (1) выполняется при температурах ниже точки пересечения функций H^D и H^N , т. е. при низких температурах, а условие (2) выполняется при температурах выше точки пересечения S^D и S^N – при высоких температурах. Поскольку характер изменения избыточных энтальпии и энтропии с температурой указывает на тип критической температуры растворения [Тагер, 2007], то в рассматриваемом случае ВКТР должна иметь место при низких температурах, а НКТР – при высоких, а между ВКТР и НКТР, в области физиологических температур, однофазная область.

Из уравнения (2) следует, что температуры фазового перехода определены при условии: (1) $\Delta H_E^D > 0$; $\Delta S_E^D > 0$ и (2) $\Delta H_E^D < 0$; $\Delta S_E^D < 0$. Анализ показывает, что ВКТР в этом случае будет при высоких температурах, а НКТР при низких, т. е. двухфазная область должна быть замкнутой и захватывать область физиологических температур.

Таким образом, фазовые диаграммы могут содержать НКТР и ВКТР для растворов как нативного, так и денатурированного белка, однако их взаиморасположение различается для двух состояний белка. Область ФД между НКТР и ВКТР является открытой закритической зоной в случае раствора нативного белка и замкнутой закритической зоной для раствора денатурированного белка в диапазоне температур, сопредельном физиологическому. Биологическое значение этой зоны определяется тем, что именно в этой области ФД, которая сопряжена с зоной критических фазовых переходов, система вода–белок–соль в наибольшей степени способна к саморегуляции в ответ на изменения температуры и/или солёности среды, что могло бы служить моделью установления механизмов взаимодействия протеиноидной системы клетки с окружающей средой в реализации основополагающих принципов гомеостаза.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (№ 0221-2014-0010).

Литература

Гросберг А. Ю., Хохлов А. Р. Статистическая физика макромолекул. М.: Наука, 1989. 344 с.

Ламри Р., Билтонен Р. Термодинамические и кинетические аспекты конформации белков в связи с физиологическими функциями // Структура и стабильность биологических макромолекул / Ред. Н. Тимашевф, Г. Д. Фасман. Пер. с англ. М.: Мир, 1973. 584 с.

Привалов П. Л. Стабильность белка и гидрофобные взаимодействия // Биофизика. 1987. Т. 32, № 5. С. 742–759.

Пфайль В., Привалов П. Конформационные изменения в белках // Биохимическая термодинамика / Ред. М. Джоунс. Пер. с англ. М.: Мир, 1982. 440 с.

Рожков С. П. Критические явления в водно-солевых растворах биополимеров // Журн. физ. химии. 1996. Т. 70, № 11. С. 1982–1986.

Тагер А. А. Физико-химия полимеров. М.: Научный мир, 2007. 576 с.

Финкельштейн А. В., Птицын О. Б. Физика белка. М.: Университет, 2002. 376 с.

Vemporad F., Chiti F. Protein misfolded oligomers: experimental approaches, mechanism of formation, and structure-toxicity relationship // Chemistry and Biology. 2012. Vol. 19. P. 315–327. doi: 10.1016/j.chembiol.2012.02.003.

Golub N., Meremyanin A., Markossian K. et al. Evidence for the formation of start aggregates as an initial stage of protein aggregation // FEBS Letters. 2007. Vol. 581. P. 4223–4227. doi: 10.1016/j.febslet.2007.07.066.

Grouazel S., Bonnet F., Astier J.-P. et al. Exploring bovine pancreatic trypsin inhibitor phase transitions // J. Phys. Chem. B. 2006. Vol. 110. P. 19664–19670. doi: 10.1021/jp0627123.

Han J., Herzfeld J. Interpretation of the osmotic behavior of sickle cell hemoglobin solutions: different interactions among monomers and polymers // Biopolymers. 1998. Vol. 45. P. 299–306. doi: 10.1002/(SICI)1097-0282(19980405)45:4<299::AID-BIP4>3.0.CO;2-G.

Juarez J., Taboada P., Goy-Lopez S. et al. Additional supra-self-assembly of human serum albumin under amyloid-like-forming solution conditions // J. Phys. Chem. B. 2009. Vol. 113. P. 12391–12399. doi: 10.1021/jp904167e.

Miti T., Mulaj M., Schmidt J. D., Muschol M. Stable, metastable, and kinetically trapped amyloid aggregate phases // Biomacromolecules. 2015. Vol. 16. P. 326–335. doi: 10.1021/bm501521r.

Muschol M., Rozenberger F. Liquid-liquid phase separation in supersaturated lysozyme solutions and associated precipitate formation/crystallization // J. Chem. Phys. 1997. Vol. 107, No 6. P. 1953–1962. doi: 10.1063/1.474547.

Nicolai T., Durand D. Controlled food protein aggregation for new functionality // Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2013. Vol. 18. 249–256 p. doi: 10.1016/j.cocis.2013.03.001.

Ravi V. K., Swain T., Chandra N., Swaminathan R. On the characterization of intermediates in the isodemic aggregation pathway of hen lysozyme at alkaline pH

// PLOS One. 2014. Vol. 9, No 1. 87256 p. doi: 10.1371/journal.pone.0087256.

Shiryayev A., Pagan D. L., Gunton J. D. et al. Role of solvent for globular proteins in solution

// J. Chem. Phys. 2005. Vol. 122. 234911 p. doi: 10.1063/1.1931655.

Поступила в редакцию 04.09.2015

References

Finkel'stein A. V., Ptitsyn O. B. Fizika belka [Protein physics]. Moscow: Mir, 2002. 376 p.

Grosberg A. Y., Khokhlov A. R. Statisticheskaya fizika makromolekul [Statistical physics of macromolecules]. Moscow: Nauka, 1989. 344 p.

Lamri R., Biltonen R. Termodinamicheskie i kineticheskie aspekty konformatsii belkov v svyazi s fiziologicheskimi funktsiyami [Thermodynamic and kinetic aspects of protein conformation in physiological functions]. In: Structure and stability of biological macromolecules. Eds. N. Timasheff, G. D. Fasman. N. Y.: Marcel Dekker, 1969. 584 p.

Privalov P. L. Stabil'nost' belka i gidrofobnye vzaimodejstviya [Protein stability and hydrophobic interactions]. Biofizika. 1987. Vol. 32, No 5. P. 742–759.

Pfeil V., Privalov P. Konformacionnye izmeneniya v belkah [Conformational changes in proteins]. In: Biochemical Thermodynamics. Ed. M. N. Jones. Amsterdam, Oxford, N. Y.: Elsevier Scientific Publ. Co., 1979. 440 p.

Rozhkov S. P. Kriticheskie javleniya v vodno-solevykh rastvorah biopolimerov [Critical phenomena in water-salt biopolymer solutions]. Zhurn. fiz. himii. 1996. Vol. 70, No 11. P. 1982–1986.

Tager A. A. Fiziko-himija polimerov [Physical Chemistry of Polymers]. Moscow: Nauchnyi Mir, 2007. 576 p.

Bemporad F., Chiti F. Protein misfolded oligomers: experimental approaches, mechanism of formation, and structure-toxicity relationship. Chemistry and Biology. 2012. Vol. 19. P. 315–327. doi: 10.1016/j.chembiol.2012.02.003.

Golub N., Meremyanin A., Markossian K., Eronina T., Chebotareva N., Asryants R., Mironets V., Kurganov B. Evidence for the formation of start aggregates as an initial stage of protein aggregation. FEBS Letters. 2007. Vol. 581. P. 4223–4227. doi: 10.1016/j.febslet.2007.07.066.

Grouazel S., Bonnete F., Astier J.-P., Ferte N., Perez J., Veessler S. Exploring bovine pancreatic

trypsin inhibitor phase transitions. J. Phys. Chem. B. 2006. Vol. 110. P. 19664–19670. doi: 10.1021/jp0627123.

Han J., Herzfeld J. Interpretation of the osmotic behavior of sickle cell hemoglobin solutions: different interactions among monomers and polymers. Biopolymers. 1998. Vol. 45. P. 299–306. doi: 10.1002/(SICI)1097-0282(19980405)45:4<299::AID-BIP4>3.0.CO;2-G.

Juarez J., Taboada P., Goy-Lopez S., Cambon A., Madec M.-B., Yeates S. G., Mosquera V. Additional supra-self-assembly of human serum albumin under amyloid-like-forming solution conditions. J. Phys. Chem. B. 2009. Vol. 113. P. 12391–12399. doi: 10.1021/jp904167e.

Miti T., Mulaj M., Schmidt J. D., Muschol M. Stable, metastable, and kinetically trapped amyloid aggregate phases. Biomacromolecules. 2015. Vol. 16. P. 326–335. doi: 10.1021/bm501521r.

Muschol M., Rozenberger F. Liquid-liquid phase separation in supersaturated lysozyme solutions and associated precipitate formation/crystallization. J. Chem. Phys. 1997. Vol. 107, No 6. P. 1953–1962. doi: 10.1063/1.474547.

Nicolai T., Durand D. Controlled food protein aggregation for new functionality. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2013. Vol. 18. P. 249–256. doi: 10.1016/j.cocis.2013.03.001.

Ravi V. K., Swain T., Chandra N., Swaminathan R. On the characterization of intermediates in the isodemic aggregation pathway of hen lysozyme at alkaline pH. PLOS One. 2014. Vol. 9, No 1. 87256 p. doi: 10.1371/journal.pone.0087256.

Shiryayev A., Pagan D. L., Gunton J. D., Rhen D. S., Saxena A., Lookman T. Role of solvent for globular proteins in solution. J. Chem. Phys. 2005. Vol. 122. 234911 p. doi: 10.1063/1.1931655.

Received September 4, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Рожков Сергей Павлович

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

Горюнов Андрей Сергеевич

ведущий научный сотрудник, к. ф. -м. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: goryunov@krc.karelia.ru

CONTRIBUTORS:

Rozhkov, Sergey

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

Goryunov, Andrey

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

УДК 574.2

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ УСТРОЙСТВА ТЕМПЕРАТУРНОЙ КОМПЕНСАЦИИ В САДКОВОМ ФОРЕЛЕВОДСТВЕ

И. М. Дзюбук, А. Е. Курицын, С. А. Ефремов, Т. А. Макарова

Петрозаводский государственный университет

Приведены результаты исследования биологической эффективности использования Устройства температурной компенсации (УТК) в садках при выращивании молоди радужной форели (2-летки) в условиях повышенных температур воды в Ладожском озере. Исследование проводили в летний период в двух садках объемом 125 м³, в которых содержалась форель средней навески 225 г. Выявлено, что при повышенных температурах 20,0–22,7 °С верхних слоев воды и содержании в них кислорода 9,6–9,9 мг/л молодь форели, выращиваемая в садке без УТК, сосредотачивалась на глубине 5 м при температуре воды 15,0–18,0 °С и содержании кислорода 6,0–7,0 мг/л. Рыба двигалась по кругу, не реагировала на приближение рыбоводов. В садке, оборудованном УТК, молодь форели находилась в зоне оптимальных температур (12,7–14,0 °С) и невысокого содержания кислорода 5,9–6,6 мг/л. Выживаемость молоди форели составила в садке с УТК 93,8 %, а в садке без устройства – 54,9 %. К концу исследований в среднем масса рыбы в садке с УТК составляла 455 г, в контрольном садке – 320 г. Показана целесообразность использования технологий, позволяющих уменьшить температуру воды и увеличить концентрацию кислорода в воде до оптимальных значений при выращивании молоди форели в садках с УТК. Доказана биологическая эффективность использования УТК при выращивании молоди радужной форели в садках в условиях повышенных температур воды.

Ключевые слова: радужная форель; молодь; садок; Ладожское озеро; температура воды; содержание кислорода в воде; выживаемость.

I. M. Dzyubuk, A. E. Kuritsyn, S. A. Efremov, T. A. Makarova. BIOLOGICAL EFFICIENCY OF THE DEVICE FOR TEMPERATURE COMPENSATION IN CAGE TROUT FARMING

The results of a study of the biological effect of a «device for temperature compensation» (DTC) in cages used for rearing juvenile rainbow trout (2 yrs) in high temperature water in Lake Ladoga are reported. Two 125 m³ experimental cages with trout (*Parasalmo (Oncorhynchus) mykiss* Walbaum) weighing on average 225 grams were prepared for the summer study. We found that when the water temperature at the surface was as high as 20.0–22.7 °C and pure oxygen saturation there was 9.6–9.9 mg/l, juvenile trout in the cage without DTC stayed at a 5 m depth, where the temperature was 15.0–18.0 °C and oxygen saturation was 6–7 mg/l. The fish swam in circles and did not respond to the arrival of farmers. In the cage equipped with DTC trout was found throughout the water column, because the temperature (12.7–14.0 °C) was optimal and oxygen concentration (5.9–6.6 mg/l) was relatively low. The survival rates were 93.8 % and 54.9 %, respectively.

By the end of the experiment (day 90), the average body weight of the fish in cage with DTC was 455 g versus 320 g in the cage without DTC. The difference in the growth performance and survival rate illustrated the expediency of using this technology to reduce water temperature and raise the concentration of oxygen in the water to the values optimal for cage rearing of trout. The results of the study prove that DTC can be used in fish farms.

Key words: rainbow trout; juveniles; cage; Lake Ladoga; water temperature; oxygen saturation; survival rate.

Введение

В настоящее время одним из наиболее благоприятных регионов России для развития индустриального садкового рыбоводства является Республика Карелия. На внутренних водоемах республики в садках выращивается порядка 23 тыс. тонн рыбной продукции, что составляет 2/3 общего объема рыбы, выращиваемой в садковых хозяйствах России.

Интенсивное развитие садкового форелеводства на водоемах республики идет двумя основными путями: увеличение количества форелевых хозяйств и наращивание объемов товарной продукции в функционирующих хозяйствах. Для этого есть все необходимые условия, одним из которых является наличие большого количества глубоководных водоемов с водой высокого качества. Основными озерами, задействованными в садковом рыбоводстве, являются Онежское и Ладожское, где выращивается свыше 40 % рыбной продукции.

Однако, даже имея максимально благоприятные природные условия для развития садкового форелеводства, необходимо совершенствовать технологический процесс выращивания, что будет способствовать сохранению выживаемости рыб на высоком уровне и увеличению объемов рыбного производства. При осуществлении технологии выращивания рыб в садках важным является сохранение температурного и кислородного режима в оптимальной зоне при изменении естественных условий содержания (резкие колебания температур и содержания кислорода в воде в течение суток, в разные сезоны и др.).

С 2010 по 2014 год перед форелеводами Северо-Западного федерального округа возникла проблема критического подъема температуры воды в летний период (до 25,0 °С, длительностью в среднем 20–35 дней) и стремительного понижения ее осенью. Это привело к увеличению отхода и, соответственно, снижению объемов производства (в Республике Коми, во Владимирской, Новгородской, Псковской, Тверской и Вологодской областях).

В связи с этим было разработано «Устройство оптимизации водной среды для садков», которое должно сохранять температуру воды в садке в оптимальном для форели диапазоне в периоды критических изменений (и таким образом, повышенной летней) температуры воды в водоеме [Ефремов и др., 2014]. Применение такого устройства в садковом хозяйстве может способствовать сохранению высокой выживаемости форели и обеспечивать максимально возможный прирост ее при садковом выращивании в нестабильных условиях окружающей среды.

Целью работы было исследование биологической эффективности использования УТК в садках при выращивании молоди радужной форели в условиях повышенных температур воды.

Материалы и методы

Исследования проводились в полносистемном форелевом хозяйстве, расположенном на Ладожском озере в районе деревни Лумиваара, с июня по август 2014 года.

Объектом исследования были двухлетние самки радужной форели (*Parasalmo (Oncorhynchus) mykiss* Walbaum). Для проведения исследований рыбы в количестве по 2,5 тыс. шт. содержались в двух садках объемом 125 м³, которые располагались на равном удалении от берега и на одинаковой глубине. Один из садков был оборудован УТК с системой автоматизированного контроля температуры. Контроллер был настроен в таких пределах, чтобы температура воды в садке поддерживалась на уровне от 12,0 до 15,0 °С, с погрешностью ±0,5 °С.

Навеска молоди рыб в среднем была 225 г. До начала эксперимента рыбу не кормили в течение 5 дней, затем в ходе исследований для кормления рыб в обоих садках использовали корма марки BioMar. Кормление молоди форели в обоих садках проводили согласно рекомендациям фирмы-производителя кормов. Расчет дневной нормы кормления выполняли в зависимости от температуры воды. Масса рыбы определялась при помощи лабораторных

весов ВК-1500. При изучении линейных характеристик был использован электронный штангенциркуль марки Stainless Hardened.

В конце июня (с 20 по 26), когда температура воды достигла максимальных значений (20,0–22,7 °С), исследовали распределение и поведение рыб в двух садках (с УТК и без него) при помощи видеокамеры. В этот период проводили измерение температуры воды и содержания растворенного в воде кислорода при помощи термо-оксиметра Oxуguard внутри каждого садка на глубинах 1, 4 и 6 м. Было рассчитано потребление кислорода форелью в условиях повышения температуры воды при использовании УТК. На протяжении летнего периода ежемесячно оценивали выживаемость рыб в опытном и контрольном садках.

Результаты и обсуждение

Радужная форель хорошо переносит суточный перепад температур до +5,0 °С, но на каждом этапе развития предпочитает определенную температуру водной среды. Оптимальный диапазон летних температур для наилучшего роста радужной форели в садках составляет 14,0–18,0 °С, что характерно для водоемов Карелии [Рыжков, Кучко, 2008; Рыжков и др., 2014]. В Мурманской и Архангельской областях температура воды в этот период несколько ниже, что не позволяет максимально использовать потенциал роста форели. В Ленинградской области и в более южных регионах, Псковской, Новгородской и Тверской областях, температура воды летом может достигать предельного для форели уровня 22,0–24,0 °С [Рекордная жара..., 2010; Веселов, 2014].

Однако и в Карелии стали отмечаться аномально теплые погодные условия, при этом в летние месяцы наблюдался прогрев воды

озер выше 20,0 °С. Так, в июне 2014 года в Ладожском озере в районе исследований температура верхних слоев воды изменялась в пределах 14,0–22,7 °С. В начале месяца температура воды была 14,0–15,0 °С, во второй декаде выросла до 17,0–18,0 °С и к концу июня достигла максимальных значений 20,0–22,7 °С.

Изменения температуры в садке, оснащенном УТК, и в контрольном садке без устройства отмечены на рисунке 1. Температура поверхностных слоев воды в период исследований находилась в пределах 20,4–22,7 °С. На то, что радужная форель может жить и расти при температуре 22,0 °С и высоком содержании кислорода, указывает С. Н. Александров [Садковое рыбоводство..., 2005]. Однако по данным В. В. Здановича с соавт. [2013], увеличение температуры воды до 21,0 °С вызывает снижение средней удельной скорости роста на 22,8 % и величины среднесуточного прироста на 41,1 % по сравнению с аналогичными показателями при 17,0 °С. На глубине 4 м отмечалось однократное (22.06) снижение температуры воды до 17,9 °С, но затем она держалась на том же уровне, что и на поверхности (22,7 °С). На глубине 6 м отмечались значения температуры воды близкие к 13,0 °С. В садке с УТК на глубинах от 1 до 6 м температура оставалась в оптимальных для форели пределах – 12,7–14,0 °С, что, по данным В. К. Голованова [2013], является нижней границей окончательно избираемой этой возрастной группой рыб температуры.

По рекомендациям производителей кормов при повышении температуры воды норму кормления для молоди форели в садке без УТК снизили, а затем кормление было полностью прекращено. Для форели в садке с УТК в соответствии с температурой воды количество дневного рациона не уменьшали.

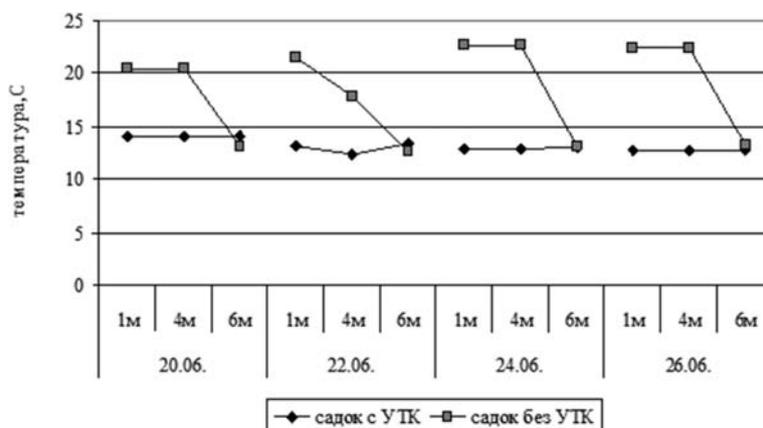


Рис. 1. Изменение температуры в садках (с УТК и без него) при выращивании молоди форели, Ладожское озеро, 20–26 июня 2014 года

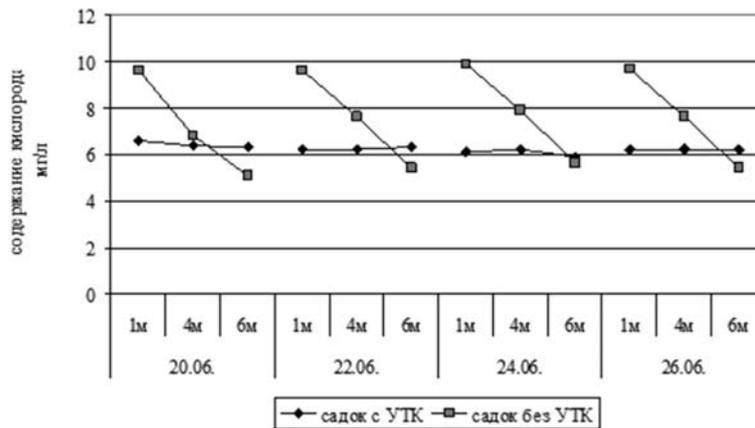


Рис. 2. Изменение содержания кислорода в садках (с УТК и без него) при выращивании молоди форели, Ладожское озеро, 20–26 июня 2014 года

При помощи видеокамер были получены данные о поведении молоди в условиях повышения температуры воды на поверхности. Рыба, находившаяся в контрольном садке (без УТК), опустилась на большую глубину (около 5 м). Это подтверждает литературные данные, согласно которым при резком потеплении рыба пытается уйти вглубь садка, где температура воды от 15,0 до 18,0 °С [Новоженин, Галасун, 1977]. Весь период повышенных температур молодь форели держалась на глубине, двигаясь по кругу (по часовой стрелке), не реагировала на приближение рыбоводов. В садке с УТК форель находилась у поверхности, поведение ее было типичное (нормальное), она реагировала на приближение людей (поднималась к поверхности) и активно хватала корм.

В ходе исследований содержание растворенного кислорода в поверхностных слоях воды (в садке без УТК) находилось в пределах 9,6–9,9 мг/л (рис. 2). На глубине 6 м отмечено снижение кислорода до 5,6–5,1 мг/л. Известно, что оптимальное содержание кислорода в воде для молоди форели составляет 8,0–11,0 мг/л. При уменьшении его до значений ниже 7,0 мг/л форель перестает питаться, не реализует потенциальные возможности роста, происходит увеличение отхода. При понижении концентрации кислорода до 4,0 мг/л рыба погибает от гипоксии [Рыжков, Кучко, 2008; Рыжков и др., 2014]. В садке, оборудованном УТК, содержание кислорода сохранялось на одном уровне, в пределах 5,9–6,6 мг/л, во всей толще воды.

УТК выполнено из термостатичного материала, который ограждает рыбу в садке от неблагоприятных температурных условий окружающей среды, но при этом препятствует свободному поступлению извне воды, более насыщенной кислородом. Учитывая, что во

время кормления у рыб на 30 % увеличивается потребление кислорода, а молодь радужной форели необходимо кормить 8–12 раз в день, возникает потребность в поддержании концентрации растворенного в воде кислорода на оптимальном уровне [Бабий, 1997]. Следовательно, при использовании УТК в садковом рыбоводстве целесообразно применять технологии, позволяющие увеличивать концентрацию кислорода (принудительная аэрация, оксигенация и др.) до оптимальных значений для выращивания молоди форели. При этом необходимо контролировать содержание O_2 в закачиваемой воде и внутри садка с УТК.

В период летнего выращивания проводили ежемесячный контроль выживаемости в двух садках (с УТК и в контрольном). Выявлено, что на протяжении лета отход в садке с УТК держался на одном уровне (1,9–2,4 % в месяц) и был невысок по сравнению с таковым в контрольном садке (4,0–32,2 %) (табл.). В целом к концу лета этот показатель для садка без УТК составил 45,1 %. К концу исследований в среднем масса молоди форели в садке с УТК составляла 455 г, а в контрольном садке – 320 г.

Количество отхода радужной форели в летний период (%)

Месяц	Садок с УТК	Садок без УТК
Июнь	2,4	4,0
Июль	2,1	32,2
Август	1,9	15,6
Всего	6,2	45,1

Заключение

Выполненные исследования показали, что в период повышенных температур верхних слоев воды (20,4–22,7 °С) в Ладожском озере молодь форели, выращиваемая в садке

без УТК, сосредотачивалась на глубине около 5 м, где температура воды была в диапазоне 15,0–18,0 °С. Таким образом молодь избегала воздействия высоких температур. Однако на этой глубине отмечалось низкое (6,0–7,0 мг/л) содержание кислорода в воде. Сочетание выявленных температурных и кислородных условий выращивания форели в садке без УТК в целом негативно влияло на молодь, что проявлялось в движении ее по часовой стрелке и отсутствии реакции на приближение рыбоводов.

В садке, оборудованном УТК, форель находилась в зоне оптимальных температур воды 12,7–14,0 °С. При этом низкое содержание кислорода до 6,0–7,0 мг/л не отразилось на жизнедеятельности молоди, она поднималась к поверхности и активно хватала корм. Однако это не исключает необходимости использования технологий, позволяющих увеличивать концентрацию кислорода до оптимальных значений при садковом (с УТК) выращивании молоди форели в условиях повышенной температуры воды.

Исследование показало биологическую эффективность использования УТК при выращивании молоди радужной форели в садках в условиях критических изменений температуры воды. Выживаемость молоди форели в садке с УТК была высокая – 93,8 %, тогда как в садке без устройства она составила 54,9 %. К концу исследований в среднем масса рыбы в садке с УТК составляла 455 г, а без него – 320 г.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания базовой части в сфере научной деятельности, проект № 1381.

References

Babij A. A. Rost raduzhnoj foreli v sadkah v podlednyj period [Growth of rainbow trout in cages in the ice period]. Pervyj kongr. ihtologov Rossii: tez. dokl. [The first congress of ichthyologists of Russia. Abstr. rept.]. Moscow, 1997. 264 p.

Efremov S. A., Kuricyn A. E., Tihonov E. A., Makarova T. A. Ustrojstvo optimizacii vodnoj sredy dlja sadkov [Optimization device for aquatic environment in cages]. Zajavka na poleznuju model' RF No. 2014149512 28.12.2014

Golovanov V. K. Jekologo-fiziologicheskie zakonomernosti raspredelenija i povedenija presnovodnyh ryb v termogradientnyh uslovijah [Ecological-physiological regularities of distribution and behavior of freshwater fishes under thermogradient conditions]. *Voprosy ihtologii* [Journal of ichthyology]. 2013. Vol. 53, No 3. P. 286–314.

Литература

Бабий А. А. Рост радужной форели в садках в подледный период // Первый конгр. ихтиологов России: тез. докл. М.: ВНИРО, 1997. 264 с.

Веселов В. В. Вред природным ресурсам Волги в результате гибели рыбы в Твери. 2014. URL: <http://tvernews.ru/news/186246> (дата обращения: 01.08.2014).

Голованов В. К. Эколого-физиологические закономерности распределения и поведения пресноводных рыб в термоградиентных условиях // Вопросы ихтиологии, 2013. Т. 53, № 3. С. 286–314.

Ефремов С. А., Курицын А. Е., Тихонов Е. А., Макарова Т. А. Устройство оптимизации водной среды для садков // Заявка на полезную модель РФ № 2014149512 28.12.2014.

Зданович В. В., Панов В. П., Келехсаев М. З. Рост и продукционные показатели молоди радужной форели *Oncorhynchus mykiss walbaum* при постоянных температурах и в условиях температурного градиента // Известия ТСХА. 2013. Вып. 1. С. 97–103.

Новоженин Н. П., Галасун П. Т. Рекомендации по садковому выращиванию товарной форели. М.: ВНИИПРХ, 1977. 32 с.

Рыжков Л. П., Кучко Т. Ю. Садковое рыбоводство. Петрозаводск: ПетрГУ, 2008. 164 с.

Рыжков Л. П., Дзюбук И. М., Коренев О. Н., Полина А. В. Нормирование выращивания посадочного материала радужной форели в садках. Учебное пособие. Петрозаводск: ПетрГУ, 2014. 41 с.

Рекордная жара стала причиной гибели форели в рыбоводных хозяйствах Псковской области. 2010. URL: <http://pravdapskov.ru/news/1231> (дата обращения: 22.07.2010).

Садковое рыбоводство / Авт.-сост. С. Н. Александров. М.: АСТ; Донецк: Сталкер, 2005. 270 с.

Поступила в редакцию 26.06.2015

Novozhenin N. P., Galasun P. T. Rekomendacii po sadkovomu vyrashhivaniju tovarnoj foreli [Recommendations for cage cultivation of commodity trout]. Moscow: VNIIPRH, 1977. 32 p.

Ryzhkov L. P., Kuchko T. Ju. Sadkovoje rybovodstvo [Cage culture fishery]. Petrozavodsk: PetrGU, 2008. 164 p.

Ryzhkov L. P., Dzubuk I. M., Korenev O. N., Polina A. V. Normirovanie vyrashhivanija posadochnogo materiala raduzhnoj foreli v sadkah. Uchebnoje posobie [Rationing of cultivation of landing material of rainbow trout in cages. Textbook for students]. Petrozavodsk: PetrGU, 2014. 41 p.

Рекордная жара стала причиной гибели форели в рыбоводных хозяйствах Псковской области [Record heat caused death of trout in fish-breeding farms of the Pskov area]. 2010. URL: <http://pravdapskov.ru/news/1231> (accessed 22.07.2010).

Sadkovoe rybovodstvo [Cage culture fishery]. Ed. S. N. Aleksandrov. Moscow: ACT; Doneck: Stalker, 2005. 270 p.

Veselov V. V. Vred prirodnykh resursam Volgi v rezul'tate gibeli ryby v Tveri [Damage to natural resources of the Volga River as a result of fish kill in Tver]. 2014. URL: <http://tvernews.ru/news/186246> (accessed 01.08.2014).

Zdanovich V. V., Panov V. P., Kelehsaev M. Z. Rost i produkcionnye pokazateli molodi raduzhnoj foreli

Oncorhynchus mykiss walbaum pri postojannykh temperaturah i v uslovijah temperaturnogo gradienta [Growth and production characteristics of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss walbaum* under constant temperature conditions and under thermal gradient]. *Izvestija TSHA* [Transactions of RSAU – MAA named after K. A. Timiryazev]. 2013. Iss. 1. P. 97–103.

Received June 26, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Дзюбук Ирина Михайловна

научный сотрудник лаборатории экологических проблем Севера, доцент кафедры зоологии и экологии, к. б. н. Петрозаводский государственный университет пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: ikrup@petsu.ru
тел.: (8142) 781741

Курицын Антон Евгеньевич

специалист лаборатории экологических проблем Севера, к. б. н. Петрозаводский государственный университет пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: akuri3@rambler.ru

Ефремов Сергей Александрович

специалист лаборатории экологических проблем Севера, аспирант кафедры зоологии и экологии Петрозаводский государственный университет пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: efremov_sergeu@bk.ru

Макарова Татьяна Алексеевна

аспирант кафедры зоотехнии, рыбоводства и товароведения Петрозаводский государственный университет пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: fish_res@mail.ru
тел.: (8142) 711086

CONTRIBUTORS:

Dzyubuk, Irina

Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: ikrup@petsu.ru
tel.: (8142) 781741

Kuritsyn, Anton

Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: akuri3@rambler.ru

Efremov, Sergey

Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: efremov_sergeu@bk.ru

Makarova, Tatyana

Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: fish_res@mail.ru
tel.: (8142) 711086

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННЫХ ЕЖЕСУТОЧНЫХ ПОНИЖЕНИЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ ОГУРЦА РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Т. Г. Шибаетова, Е. Г. Шерудило, Е. Н. Икконен, А. Ф. Титов

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Изучали влияние кратковременного (2 ч в конце ночного периода) ежесуточного понижения температуры до 12 °С (ДРОП-воздействие) на активность антиоксидантных (АО) ферментов в листьях огурца (*Cucumis sativus* L.) разного возраста. Действию ДРОП в течение 6 суток подвергали растения, находящиеся в фазе активно растущего второго листа (ДРОП 1) и заканчивающего рост зрелого второго листа (ДРОП 2). Растения варианта ДРОП 3 подвергались ДРОП-воздействию в течение 12 суток, в период от фазы активного роста до фазы зрелого состояния второго листа.

Воздействие ДРОП на зрелые листья (ДРОП 2) не вызывало изменений в активности АО-ферментов и интенсивности перекисного окисления липидов, оцениваемого по содержанию малонового диальдегида (МДА). Под влиянием ДРОП на растущие листья (ДРОП 1 и ДРОП 3) отмечено снижение активности супероксиддисмутазы и аскорбатпероксидазы и кратковременное повышение с последующим снижением активности каталазы и гваякол-зависимой пероксидазы. Увеличение холодоустойчивости листьев относительно контроля наблюдали во всех трех вариантах опыта. Таким образом, установлено, что ежесуточные кратковременные понижения температуры (ДРОП) до закалывающих значений вызывают изменение активности АО ферментов в активно растущих листьях, но не влияют на активность этих ферментов в зрелых листьях. Изменения активности изученных ферментов при этом не коррелируют с изменениями холодоустойчивости. По-видимому, механизм повышения устойчивости растений к низким закалывающим температурам, основанный на увеличении антиоксидантной активности, описанный для теплолюбивых видов, не участвует в реакциях растений огурца на ДРОП-воздействия, а наблюдаемое в этом случае повышение холодоустойчивости обусловлено иными механизмами. Разный отклик зрелых и растущих листьев на ДРОП указывает на то, что индукция защитно-приспособительных реакций растений на кратковременные неблагоприятные температурные воздействия зависит от возраста листа.

Ключевые слова: *Cucumis sativus* L.; низкая температура; ДРОП-воздействия; антиоксидантная активность; холодоустойчивость.

T. G. Shibaeva, E. G. Sherudilo, E. N. Ikkonen, A. F. Titov. THE EFFECT OF A DAILY SHORT-TERM TEMPERATURE DROP ON THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN CUCUMBER LEAVES OF VARIOUS AGES

We studied the effect of short-term (2 hours at the end of the night) daily temperature reductions to 12 °С (DROP treatment) on the activity of antioxidant (AO) enzymes in cucumber (*Cucumis sativus* L.) leaves of various ages. Plants were DROP-treated for 6 days

during the exponential growth of the second true leaf (DROP 1) or when the second leaf was mature (DROP 2). DROP 3 plants were DROP-treated for 12 days during the DROP 1+DROP 2 period.

In mature leaves (DROP 2) DROP treatment did not cause any changes in the activity of AO enzymes or lipid peroxidation rates, as estimated by the content of malondialdehyde (MDA). In young leaves (DROP 1 and DROP 3) DROP treatment reduced the activity of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase and induced a short-term increase followed by a decrease in the activity of catalase and guaiacol-dependent peroxidase. Chilling tolerance was higher in all DROP-treated plants compared to untreated plants. Thus, we found that a daily short-term temperature drop (DROP) modified the activity of AO enzymes in young leaves, but did not affect the activity of the studied enzymes in mature leaves. Changes in the activity of AO enzymes did not correlate with changes in chilling tolerance. Apparently, the increased antioxidant activity in low temperature-treated plants described in the literature for chilling-sensitive species is not involved in cucumber response to temperature DROP, and some other mechanism is responsible for the higher chilling tolerance in DROP-treated plants. The differential response of young and mature leaves points to some developmental controls in the induction of plant adaptations to short-term chilling.

Key words: *Cucumis sativus* L.; low temperature; DROP treatment; antioxidant activity; chilling tolerance.

Введение

Одно из основных различий между чувствительными и устойчивыми к холоду растениями заключается в способности последних уменьшать повреждающее действие холода и индуцированное охлаждением образование активных форм кислорода благодаря повышению активности ферментов антиоксидантной системы [Zhang et al., 1995]. Показано, что изменения активности антиоксидантных (АО) ферментов при охлаждении теплолюбивых растений имеют сходный характер и выражаются в резком спаде активности в начальный момент холодового воздействия и ее постепенном возрастании при удлинении периода охлаждения [Лукаткин, 2002]. Предположительно, эти изменения носят защитный характер и направлены на снятие окислительного стресса и тем самым предотвращение холодового повреждения.

Ранее было показано, что применение ДРОП-обработок (ежесуточного понижения температуры на 2 ч в конце ночного периода до 12 °С; от англ. *drop* – падение) приводит к повышению холодоустойчивости растений огурца [Марковская и др., 2008]. Также на растениях огурца была показана связь между холодоустойчивостью и активностью АО ферментов [Omran, 1980; Shen et al., 1999]. Однако анализ литературы показывает, что большинство данных для растений этого вида были получены с использованием повреждающих температур (2–5 °С) [Shen et al., 1999; Лукаткин, 2002; Kuk, Shin, 2007]. Поэтому остается не вполне ясным, как изменяется активность АО ферментов при

кратковременном действии на растения низких закаливающих температур.

Известно, что степень развития листа значительно влияет на его способность адаптироваться к условиям окружающей среды, в том числе к температуре. В последние годы широко обсуждается вопрос о разных откликах зрелых и незрелых тканей листьев теплолюбивых растений на изменения температуры [Armstrong et al., 2006; Atkin et al., 2006; Campbell, 2007; Zhang et al., 2014], однако литературные данные относительно того, молодые или зрелые листья обладают большей способностью к температурной адаптации, носят противоречивый характер.

В связи с этим целью данной работы было изучить влияние ежесуточных кратковременных снижений температуры (ДРОП) до закаливающих значений на активность АО ферментов и оценить, влияет ли возраст листьев на их чувствительность к данному типу воздействий.

Материалы и методы

Растения огурца (*Cucumis sativus* L., гибрид Зозуля) выращивали в камере искусственного климата (Vötsch, Германия) на песчаном субстрате при поливе полным питательным раствором (рН 6,2–6,4), температуре воздуха 23 °С, фотосинтетически активной радиации 150 мкмоль/(м²·с), фотопериоде 12 ч, влажности воздуха 60–70 %.

Часть растений подвергали 2-часовому действию температуры 12 °С в конце ночи (ДРОП-воздействие) в течение 6 суток в период с 12-х по 17-е сутки после замачивания

семян – развернувшийся второй настоящий лист в это время находился в фазе активного роста и достигал 60–70 % от окончательной площади (вариант ДРОП 1). Другая часть растений подвергалась ДРОП-воздействиям в период с 18-х по 23-е сутки, когда второй лист находился уже в зрелом состоянии, заканчивая рост (вариант ДРОП 2). Третья часть растений подвергалась ДРОП-воздействиям в течение 12 суток в период с 12-х по 23-е сутки; за это время развернувшийся второй лист достигал своих окончательных размеров (вариант ДРОП 3). Контролем служили растения, не подвергавшиеся низкотемпературным воздействиям.

Биомассу растений и площадь листьев измеряли на 24-е сутки после замачивания семян, а определение параметров флуоресценции хлорофилла, активности АО ферментов, содержания МДА и холодоустойчивости листьев проводили на 18-е и 24-е сутки.

Площадь листовых пластин определяли с помощью программы AreaS 2.1 (автор Пермяков А. Н.) [Пермяков и др.].

Для измерений параметров флуоресценции хлорофилла использовали анализатор фотосинтеза с импульсно-модулированным освещением (MINI-PAM, Walz, Германия). Потенциальный квантовый выход фотохимической активности ФС II (F_v / F_m) определяли после 20-минутной темновой адаптации листьев.

Холодоустойчивость клеток листа оценивали по температуре (LT_{50}), вызывающей гибель 50 % палисадных клеток листовых высечек после их 5-минутного промораживания в термоэлектрическом термостате ТЖР («Интерм», Россия) при последовательном изменении температур с шагом 0,4 °С [Дроздов и др., 1976]. Жизнеспособность клеток определяли с помощью светового микроскопа Микмед-2 (ЛОМО, Россия) по коагуляции цитоплазмы и деструкции хлоропластов.

Анализировали активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.1.5.1.1), каталазы (КАТ, КФ 1.11.1.6), аскорбатпероксидазы (АПО, КФ 1.11.1.11) и гваякол-зависимой пероксидазы (ПО, КФ 1.11.1.7). Листья гомогенизировали в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,8). Гомогенат центрифугировали при 15 000 г в течение 10 мин при 4 °С; в супернатанте определяли активность ферментов. Активность АПО определяли спектрофотометрически в присутствии 0,5 мМ аскорбиновой кислоты и 0,5 мМ H_2O_2 по снижению оптической плотности при 290 нм [Nakano, Asada, 1981]. Активность КАТ определяли по ферментативному разложению H_2O_2 при 240 нм [Beers, Sizer, 1952]; активность

СОД – по способности ингибировать фотохимическую реакцию тетразолия нитросинего [Giannopolitis, Ries, 1977]. Анализ гваякол-зависимой ПО основывался на окислении гваякола в присутствии H_2O_2 [Srivastava, van Huystee, 1977]. Реакционная среда содержала 2,5 мл 50 мМ калий-фосфатного буфера (рН 6,1), 1 мл 1% H_2O_2 , 1 мл 1% гваякола и 10 мкл ферментативного препарата. Измеряли оптическую плотность при 420 нм. Активность ферментов рассчитывали на 1 г сухой массы листьев, а удельную активность – на 1 мг белка. Общее содержание белка определяли методом Бредфорда [Bradford, 1976].

Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли по Heath, Parker [1968]. Листья растирали в 2 мл 20% трихлоруксусной кислоте (ТХУ). Гомогенат центрифугировали при 15 000 г в течение 10 мин; 1 мл надосадочной жидкости смешивали с 1 мл 20% ТХУ, содержащей 0,5 % тиобарбитуровой кислоты (ТБК). Смесь нагревали в течение 30 мин при 95 °С и затем центрифугировали 5 мин при 10 000 г. Концентрацию МДА определяли спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность при 532 нм и неспецифичное поглощение при 600 нм. Для расчета содержания МДА использовали коэффициент экстинкции, равный 155/(мм см). Концентрацию МДА выражали в мкмоль/г сухой массы листьев.

Опыт повторяли дважды. На рисунках и в таблице представлены средние значения и их стандартные ошибки ($n \geq 6$). В таблице представлены относительные (к контролю) данные, рассчитанные по средним арифметическим значениям, полученным при измерении активности ферментов в не менее трех биологических и аналитических повторностях. Достоверность различий между средними определена на основе LSD теста при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Действие ДРОП в течение 6 суток на растения в первом (ДРОП 1) и во втором (ДРОП 2) вариантах опыта не оказало значительного влияния на накопление их биомассы и площадь листьев, тогда как растения, листья которых подвергались действию ДРОП в течение всего периода роста листа (ДРОП 3), имели меньшие сухой вес и площадь листьев по сравнению с растениями других вариантов опыта (рис. 1, А, Б).

Значения максимального квантового выхода фотохимической активности ФС II (F_v / F_m) в вариантах ДРОП 1 и ДРОП 3 были ниже, чем

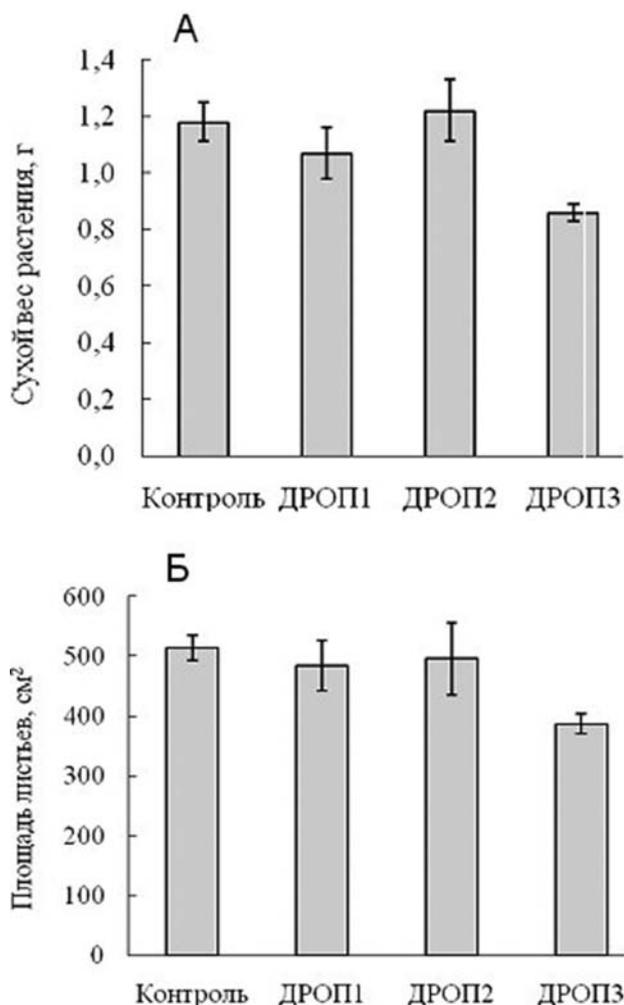


Рис. 1. Влияние ДРОП на сухой вес (А) и площадь листьев (Б) растений огурца (*Cucumis sativus* L.)

у контрольных растений, но во всех вариантах опыта они превышали $0,8 \pm 0,05$ (рис. 2). Последнее указывает на высокую эффективность использования энергии в фотохимических процессах [Bolhär-Nordenkampf et al., 1989] и отсутствие стрессового воздействия на фотосинтетический аппарат растений.

У клеток листьев растений в варианте ДРОП 2 по окончании ДРОП-воздействия (24 сут) наблюдалось значительное (на $1,6\text{ }^{\circ}\text{C}$) повышение устойчивости к 5-минутному промораживанию (рис. 3), что согласуется с полученными ранее результатами [Sysoeva et al., 2005; Марковская и др., 2008]. Холодоустойчивость активно растущих листьев (ДРОП 1), измеренная по окончании ДРОП-воздействий (18 сут), также увеличилась, хотя и в значительно меньшей степени (на $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Однако по мере дальнейшего роста листьев уже в оптимальных условиях их холодоустойчивость продолжала возрастать и по достижении листом зрелого состояния (24 сут) достигла уровня

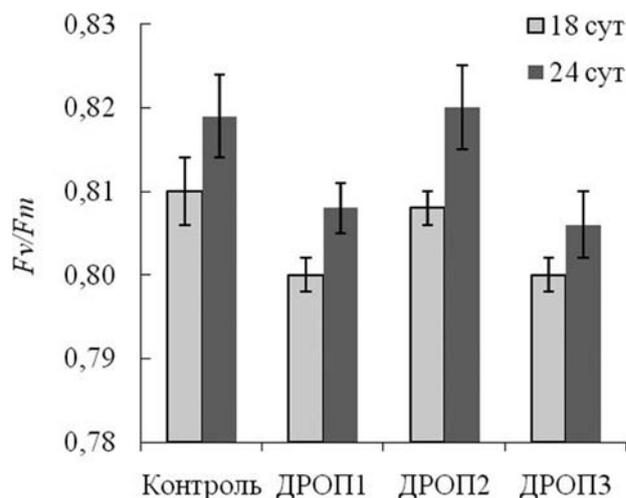


Рис. 2. Влияние ДРОП на максимальный квантовый выход фотохимической активности ФС II (F_v/F_m) в листьях огурца (*Cucumis sativus* L.).

Здесь и далее: на 18-е сут измерения проводили на молодых листьях, испытывавших ДРОП-воздействия в предыдущие 6 сут в вариантах ДРОП 1 и ДРОП 3 и не подвергавшихся ДРОП-воздействиям в вариантах Контроль и ДРОП 2. На 24-е сут измерения проводили на зрелых листьях в последствии ДРОП (через 6 сут) в варианте ДРОП 1 и по окончании ДРОП-воздействия в вариантах ДРОП 2 и ДРОП 3.

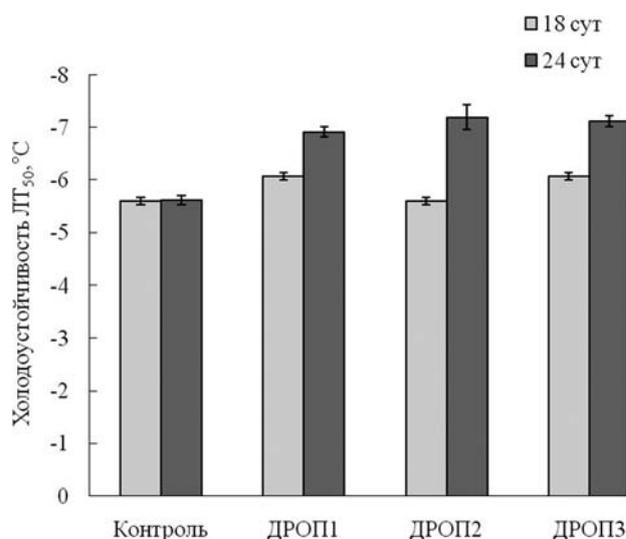


Рис. 3. Влияние ДРОП на холодоустойчивость листьев огурца (*Cucumis sativus* L.) на 18-е и 24-е сут

устойчивости растений в варианте ДРОП 2. ДРОП-воздействие в течение всего периода роста листьев (вариант ДРОП 3) индуцировало постепенное повышение холодоустойчивости до уровня, зафиксированного в варианте ДРОП 2 (см. рис. 3).

Интересно, что в листьях варианта ДРОП 2 не отмечено достоверных изменений активности антиоксидантных ферментов и интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ), определяемого по накоплению реагирующих с ТБК соединений (МДА) (табл.).

Влияние ДРОП на активность каталазы (КАТ), супероксиддисмутазы (СОД), аскорбатпероксидазы (АПО), гваякол-пероксидазы (ПО), содержание малонового диальдегида (МДА) в листьях растений огурца (*Cucumis sativus* L.) (% от контроля)

Вариант	Активность фермента								Содержание МДА	
	КАТ		СОД		АПО		ПО		18 сут	24 сут
	18 сут	24 сут	18 сут	24 сут	18 сут	24 сут	18 сут	24 сут		
ДРОП 1	121	90	46*	40*	89	79*	151*	47*	131*	137*
ДРОП 2	105	100	100	98	110	96	97	103	93	98
ДРОП 3	121	76*	46*	43*	89	73*	151*	54*	131*	126*

Примечание. *Значимые различия с контролем. Активность ферментов и содержание МДА в тканях контрольных растений приняты за 100 %. Абсолютные значения контрольных образцов: КАТ_{18 сут} = 30,5 ± 0,8 мкмоль Н₂О₂/(мг белка·мин), КАТ_{24 сут} = 36,0 ± 1,5 мкмоль Н₂О₂/(мг белка·мин); СОД_{18 сут} = 2,2 ± 0,4 ед. акт./мг белка, СОД_{24 сут} = 5 ± 0,6 ед. акт./мг белка; АПО_{18 сут} = 90 ± 4 мкмоль/(мг белка·мин), АПО_{24 сут} = 86 ± 5 мкмоль/(мг белка·мин); ПО_{18 сут} = 63 ± 2 мкмоль/(мг белка·мин), ПО_{24 сут} = 120 ± 11 мкмоль/(мг белка·мин); МДА_{18 сут} = 75 ± 3 мкмоль/г сух. массы, МДА_{24 сут} = 71 ± 4 мкмоль/г сух. массы.

В вариантах ДРОП 1 и ДРОП 3 наблюдалась тенденция повышения активности КАТ после воздействия ДРОП на молодые растущие листья, но измерения, проведенные на 24-е сут уже на зрелых листьях, указывали на тенденцию к снижению активности этого фермента в варианте ДРОП 1 и более значимое снижение в варианте ДРОП 3. Активность СОД в вариантах ДРОП 1 и ДРОП 3 уменьшалась на 50–60 % по сравнению с контролем уже после первых 6 сут действия ДРОП и, оставаясь низкой, не различалась между вариантами ДРОП 1 и ДРОП 3 на 24-е сут. Активность АПО начала понижаться после воздействия ДРОП на молодые листья (ДРОП 1 и ДРОП 3) и к 24-м сут снизилась на 20–25 % по отношению к контролю. Уровень МДА в вариантах ДРОП 1 и ДРОП 3 был выше по сравнению с контролем на 30 % на 18-е и 24-е сут (табл.).

Обсуждение

Индукцированное ДРОП-воздействиями снижение активности АО ферментов либо первоначальное увеличение активности с последующим ее снижением и усиление образования МДА в листьях огурца было наиболее выражено в наших опытах в тех случаях, когда действию низкой температуры подвергались молодые, активно растущие листья. Обычно интенсивность процессов ПОЛ в клетках при охлаждении прямо пропорциональна холодовым нарушениям и обратно пропорциональна холодоустойчивости растений [Лукаткин, 2002]. Известно, что у листьев огурца устойчивость к охлаждению минимальна в ранние фазы развития и максимальна в поздние [Генкель, Кушниренко, 1966; Белик, 1970]. В наших опытах холодоустойчивость, измеренная сразу после серии ежесуточных 2-часовых снижений температуры, у зрелых листьев была выше, чем при действии ДРОП на молодые листья. Однако

в последствии ДРОП холодоустойчивость листьев, заканчивающих рост уже в нормальных температурных условиях, была на уровне той, которую развивали зрелые листья под влиянием ДРОП. Отметим, что увеличение числа ДРОП-воздействий с 6 до 12 не привело к дополнительному приросту холодоустойчивости.

Отсутствие стрессовой реакции, оцениваемой по содержанию МДА и величине F_v/F_m у листьев, подвергавшихся действию ДРОП в зрелом состоянии, возможно, объясняется более быстрыми по сравнению с молодыми листьями процессами восстановления вызванных холодом нарушений и/или повреждений, так как известно, что активация ПОЛ обратима и нормализация состояния липидов протекает наиболее медленно в ранние фазы развития и быстрее на более поздних фазах развития [Лукаткин, 2002]. Инактивация реакционного центра (РЦ) ФС II, приводящая к снижению значений F_v/F_m , может быть также обратной [Gomez et al., 1998]. В наших опытах ДРОП-воздействие включало 2-часовое охлаждение с последующим 22-часовым периодом оптимальной температуры, в течение которого происходит восстановление повреждений в РЦ. Поэтому можно предположить, что причиной меньшего содержания МДА и высоких значений F_v/F_m у зрелых листьев является не их высокая устойчивость к охлаждению, а способность быстрее, по сравнению с молодыми листьями, обеспечивать нормализацию состояния липидов и РЦ ФС II в суточном цикле.

Снижение активности АО ферментов в листьях огурца, испытывавших ДРОП-воздействия в молодом возрасте, согласуется с литературными данными о том, что чувствительные к охлаждению виды часто имеют пониженную антиоксидантную способность (особенно по активности АО ферментов) по сравнению с устойчивыми видами [Hodges et al., 1997a]. Хотя даже в отношении теплолюбивых видов

в литературе имеются довольно противоречивые данные об изменении у них активности АО ферментов при охлаждении. Отмечают как резкое снижение активности этих ферментов (обычно в начальные периоды охлаждения), так и ее возрастание (чаще после длительного охлаждения) или отсутствие видимых изменений. Наши результаты совпадают с данными о снижении активности СОД [Wang et al., 1986; Jahnke et al., 1991; Gianinetti et al., 1993; Wang et al., 1995; Pinhero et al., 1997] и АПО [Hodges et al., 1997a, b; Hull et al., 1997] при охлаждении теплолюбивых видов. В ряде работ показано, что АПО принимает активное участие в защите растительной клетки от холодового повреждения при длительном (4 ч и более) выдерживании растений в условиях пониженных температур, что связано со временем, которое требуется для накопления H_2O_2 до уровня, необходимого для индукции синтеза цитозольной АПО [Prasad et al., 1994; Morita et al., 1999; Лукаткин, 2002]. Что касается КАТ, то ее активность у растений огурца обычно снижается при охлаждении [Hodges et al., 1997a, b; Shen et al., 1999; Лукаткин, 2002], хотя имеются также данные о практически полном восстановлении исходной активности КАТ у теплолюбивых видов растений в последствии охлаждения [Лукаткин, 2002]. У теплолюбивых видов, в отличие от холодоустойчивых, отмечается и снижение активности ПО при действии низких температур [Rivero et al., 2001; Lu et al., 2008]. Не исключено, что подобные противоречия могут быть объяснены не только различной интенсивностью охлаждения и характером (постоянное или периодически повторяющееся) холодового воздействия, но и, возможно, использованием в работах в качестве объекта листьев, находящихся в разных возрастных состояниях и характеризующихся неодинаковой реакцией антиоксидантной системы на холод. При этом интересно отметить, что накопление АФК в клетках теплолюбивого растения огурца было одинаковым после 9 ч низкотемпературного воздействия (6 °С) в темноте у молодых и зрелых листьев [Zhang et al., 2014].

В целом можно резюмировать, что ежесуточные кратковременные понижения температуры до закаливающих значений (ДРОП) вызывают в активно растущих листьях снижение активности СОД и АПО и кратковременное повышение с последующим снижением активности КАТ и ПО, но не оказывают влияния на активность этих ферментов в зрелых листьях. Особо подчеркнем, что изменения активности АО ферментов при этом не коррелируют с динамикой холодоустойчивости. По-видимому,

механизм повышения устойчивости растений к низким температурам, основанный на увеличении антиоксидантной активности, описанный для теплолюбивых видов [Kuk, Shin, 2007], не принимает непосредственного участия в реакциях растений огурца на ДРОП-воздействия. Наблюдаемое же в этом случае повышение холодоустойчивости обусловлено иными механизмами из широкого спектра защитно-приспособительных реакций, которыми располагают растения.

Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП НО Института биологии КарНЦ РАН при финансовой поддержке из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (№ темы 0221-2014-0002) и РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-00840 а.

Литература

- Белик В. Ф. Устойчивость растений к неблагоприятным температурным условиям // Физиология с.-х. растений. М.: Моск. ун-т, 1970. Т. 8. С. 292–330.
- Генкель П. А., Кушниренко С. В. Холодостойкость растений и термические способы ее повышения. М.: Наука, 1966. 223 с.
- Дроздов С. Н., Будыкина Н. П., Курец В. К., Балагурова Н. И. Определение устойчивости растений к заморозкам // Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды. Л.: Колос, 1976. С. 222–228.
- Лукаткин А. С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. Саранск: Мордов. ун-т, 2002. 208 с.
- Марковская Е. Ф., Сыроева М. И., Шерудило Е. Г. Феномен ежесуточного кратковременного влияния низких закаливающих температур на жизнедеятельность растения // Онтогенез. 2008. Т. 39, № 5. С. 323–332.
- Пермяков А. Н., Дулов М. И., Васин В. Е. и др. Методика определения площади листьев с помощью программы «AreaS» [Электронный ресурс] // ФЕБОУ ВПО Самарская ЕСХА: [сайт]. URL: www.ssaa.ru (дата обращения: 15.02.2014).
- Armstrong A. F., Logan D. C., Atkin O. W. On the developmental dependence of leaf respiration: responses to short- and long-term changes in growth temperature // Amer. J. Bot. 2006. Vol. 93, No 11. P. 1633–1639.
- Atkin O. K., Loveys B. R., Atkinson L. J., Pons T. L. Phenotypic plasticity and growth temperature: understanding interspecific variability // J. Exp. Bot. 2006. Vol. 57, No 2. С. 267–281.
- Beers R. F. Jr., Sizer I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase // J. Biol. Chem. 1952. Vol. 195. P. 133–140.
- Bolhàr-Nordenkamp H. R., Long S. P., Baker N. R. et al. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review

of current instrumentation // *Funct. Ecol.* 1989. Vol. 3. P. 497–514.

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.

Campbell C., Atkinson L., Zaragoza-Castells J. et al. Acclimation of photosynthesis and respiration is asynchronous in response to changes in temperature regardless of plant functional group // *New Phytol.* 2007. Vol. 176, No 2. P. 375–389.

Gianinetti A., Lorenzoni C., Marocco A. Changes in superoxide dismutase and catalase activities in response to low temperature in tomato mutants // *J. Genet. Breed.* 1993. Vol. 47, No 4. P. 353–356.

Giannopolitis C. N., Ries S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants // *Plant Physiol.* 1977. Vol. 59, No 2. P. 309–314. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.59.2.309>.

Gómez I., Pérez-Rodríguez E., Viñeola B. et al. Effects of Solar Radiation on Photosynthesis, UV-Absorbing Compounds and Enzyme Activities of the Green Alga *Dasycladus vermicularis* from Southern Spain // *J. Photochem. Photobiol. B.: Biol.* 1998. Vol. 47. P. 46–57. doi: [10.1016/S1011-1344\(98\)00199-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00199-7).

Heath R. L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // *Arch. Biochem. Biophys.* 1968. Vol. 125, No 1. P. 189–198. doi: [10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1).

Hodges D. M., Andrews C. J., Johnson D. A., Hamilton R. I. Sensitivity of maize hybrids to chilling and their combining abilities at two developmental stages // *Crop Sci.* 1997a. Vol. 37, No 3. P. 850–856. doi: [10.2135/cropsci1997.0011183X003700030026x](http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1997.0011183X003700030026x).

Hodges D. M., Andrews C. J., Johnson D. A., Hamilton R. I. Antioxidant enzyme and compound responses to chilling stress and their combining abilities in differentially sensitive maize hybrids // *Crop Sci.* 1997b. Vol. 37, No 3. P. 857–863. doi: [10.2135/cropsci1997.0011183X003700030027x](http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1997.0011183X003700030027x).

Hull M. R., Long S. P., Jahnke L. S. Instantaneous and developmental effects of low temperature on the catalytic properties of antioxidant enzymes in two *Zea* species // *Austral. J. Plant Physiol.* 1997. Vol. 24, No 3. P. 337–343. doi: [10.1071/PP96041](http://dx.doi.org/10.1071/PP96041).

Jahnke L. S., Hull M. R., Long S. P. Chilling stress and oxygen metabolizing enzymes in *Zea mays* and *Zea diploperennis* // *Plant Cell Envir.* 1991. Vol., 14, No 1. P. 97–104. doi: [10.1111/j.1365-3040.1991.tb01375.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.1991.tb01375.x).

Kuk Y. I., San Shin J. Mechanisms of low-temperature tolerance in cucumber leaves of various ages // *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 2007. Vol. 132. P. 294–301.

Lu P., Sang W. G., Ma K. P. Different responses of the activities of antioxidant enzymes to thermal stresses between two invasive *Eupatorium* species in China // *J. Integr. Plant Biol.* 2008. Vol. 50, No 4. P. 393–401. doi: [10.1111/j.1744-7909.2007.00583.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00583.x).

Morita S., Kaminaka H., Masumura T., Tanaka K. Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress. The involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signaling // *Plant Cell Physiol.* 1999. Vol. 40, No 4. P. 417–422. doi: [10.1093/oxfordjournals.pcp.a029557](http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029557).

Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts // *Plant Cell Physiol.* 1981. Vol. 22, No 5. P. 867–880.

Omran R. G. Peroxide levels and the activities of catalase, peroxidase, and indoleacetic acid oxidase during and after chilling cucumber seedlings // *Plant Physiol.* 1980. Vol. 65, No 2. P. 407–408. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.65.2.407>.

Pinhero R. G., Rao M. V., Paliyath G. et al. Changes in activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings // *Plant Physiol.* 1997. Vol. 114, No 2. P. 695–704. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.114.2.695>.

Prasad T. K., Anderson M. D., Martin B. A., Stewart C. R. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide // *Plant Cell.* 1994. Vol. 6, No 1. P. 65–74. doi: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.6.1.65>.

Rivero R. M., Ruiz J. M., García P. C. et al. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants // *Plant Sci.* 2001. Vol. 157. P. 315–321. doi: [10.1016/S0168-9452\(00\)00395-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00395-2).

Shen W. Y., Nada K., Tachibana S. Effects of cold treatment on enzymatic and nonenzymatic antioxidant activities in leaves of chilling-tolerant and chilling-sensitive cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars // *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 1999. Vol. 68, No 5. P. 967–973. doi: [10.2503/jjshs.68.967](http://dx.doi.org/10.2503/jjshs.68.967).

Srivastava O. P., van Huystee R. B. An interrelationship among peroxidase, IAA oxidase and polyphenol oxidase from peanut cells // *Can. J. Bot.* 1977. Vol. 55. P. 2630–2635. doi: [10.1139/b77-301](http://dx.doi.org/10.1139/b77-301).

Sysoeva M. I., Sherudilo E. G., Markovskaya E. F. et al. Temperature drop as a tool for cold tolerance increment in plants // *Plant Growth Regul.* 2005. Vol. 46. P. 189–191. doi: [10.1007/s10725-005-7357-2](http://dx.doi.org/10.1007/s10725-005-7357-2).

Wang Y., Liu H.-W., Li P. et al. The effect of chilling stress on membrane-lipid peroxidation of photosynthetic apparatus in rice seedlings in the dark and light // *Acta Phytophysiol. Sin.* 1986. Vol. 12, No 3. P. 244–251. (In Chinese, with English abstract).

Wang Y.-R., Zeng S.-X., Liu H.-X. Effect of cold hardening on SOD and glutathione reductase activities and on contents of the reduced form of glutathione and ascorbic acid in rice and cucumber seedlings // *Acta Bot. Sin.* 1995. Vol. 37. P. 776–780. (In Chinese, with English abstract).

Zhang J. X., Cui S. P., Li J. M. et al. Protoplasmic factors, antioxidant responses, and chilling resistance in maize // *Plant Physiol. Biochem.* 1995. Vol. 33, No 5. P. 567–575.

Zhang Z.-S., Yang C., Gao H.-Y. et al. The higher sensitivity of PSI to ROS results in lower chilling-light tolerance of photosystems in young leaves of cucumber // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* 2014. Vol. 137. P. 127–134.

Поступила в редакцию 13.09.2015

References

- Belik V. F. Ustoichivost' rastenii k neblagopriyanyam temperaturnym usloviyam [Plant resistance to adverse temperature conditions]. *Fiziologiya s.-kh. Rastenii* [Crop physiology]. Moscow: Mosk. un-t, 1970. Vol. 8. P. 292–330.
- Drozhdov S. N., Budykina N. P., Kurets V. K., Balagurova N. I. Opredelenie ustoichivosti rastenii k zamorozkam [Determination of plant resistance to light frost]. Metody otsenki ustoichivosti rastenii k neblagopriyanyam usloviyam sredy [Methods for the assessment of plant tolerance to unfavorable environments]. Leningrad: Kolos, 1976. P. 222–228.
- Genkel' P. A., Kushnirenko C. B. Kholodostoikost' rastenii i termicheskie sposoby ee povysheniya [Cold resistance in plants and thermal methods of its improvement]. Moscow: Nauka, 1966. 223 p.
- Lukatkin A. S. Kholodovoe povrezhdenie teplolyubivyykh rastenii i oksitel'nyi stress [Cold damage to heat-loving plants and oxidative stress]. Saransk: Mordov. un-t, 2002. 208 p.
- Markovskaya E. F., Sysoeva M. I., Sherudilo E. G. Fenomen ezhesutochnogo kratkovremennogo vliyaniya nizkikh zakalivayushchikh temperatur na zhiznedeyatel'nost' rasteniya [Phenomenon of daily short-time effect of low hardening temperatures on plant vital activity]. *Ontogenez* [Ontogenesis]. 2008. Vol. 39, No 5. P. 323–332.
- Permyakov A. N., Dulov M. I., Vasin V. E., Tolpekin A. A., Zuev E. V. Metodika opredeleniya ploshchadi list'ev s pomoshch'yu programmy "AreaS" [Method for leaf area estimation using the program "AreaS"]. *FEBOU VPO Samarskaya ESKhA*. URL: www.ssaa.ru (accessed: 15.02.2014).
- Armstrong A. F., Logan D. C., Atkin O. W. On the developmental dependence of leaf respiration: responses to short- and long-term changes in growth temperature. *Amer. J. Bot.* 2006. Vol. 93, No 11. P. 1633–1639.
- Atkin O. K., Loveys B. R., Atkinson L. J., Pons T. L. Phenotypic plasticity and growth temperature: understanding interspecific variability. *J. Exp. Bot.* 2006. Vol. 57, No 2. P. 267–281.
- Beers R. F. Jr., Sizer I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 1952. Vol. 195. P. 133–140.
- Bolhàr-Nordenkamp H. R., Long S. P., Baker N. R., Öquist G., Schreiber U., Lechner E. G. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Funct. Ecol.* 1989. Vol. 3. P. 497–514.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.
- Campbell C., Atkinson L., Zaragoza-Castells J., Lundmark M., Atkin O., Hurry V. Acclimation of photosynthesis and respiration is asynchronous in response to changes in temperature regardless of plant functional group. *New Phytol.* 2007. Vol. 176, No 2. P. 375–389.
- Gianinetti A., Lorenzoni C., Marocco A. Changes in superoxide dismutase and catalase activities in response to low temperature in tomato mutants. *J. Genet. Breed.* 1993. Vol. 47, No 4. P. 353–356.
- Giannopolitis C. N., Ries S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 1977. Vol. 59, No 2. P. 309–314. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.59.2.309>.
- Gómez I., Pérez-Rodríguez E., Viñegla B., Figueroa F., Karsten U. Effects of Solar Radiation on Photosynthesis, UV-Absorbing Compounds and Enzyme Activities of the Green Alga *Dasycladus vermicularis* from Southern Spain. *J. Photochem. Photobiol. B.: Biol.* 1998. Vol. 47. P. 46–57. doi: [10.1016/S1011-1344\(98\)00199-7](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00199-7).
- Heath R. L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1968. Vol. 125, No 1. P. 189–198. doi: [10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1).
- Hodges D. M., Andrews C. J., Johnson D. A., Hamilton R. I. Sensitivity of maize hybrids to chilling and their combining abilities at two developmental stages. *Crop Sci.* 1997a. Vol. 37, No 3. P. 850–856. doi: [10.2135/cropsci1997.0011183X003700030026x](https://doi.org/10.2135/cropsci1997.0011183X003700030026x).
- Hodges D. M., Andrews C. J., Johnson D. A., Hamilton R. I. Antioxidant enzyme and compound responses to chilling stress and their combining abilities in differentially sensitive maize hybrids. *Crop Sci.* 1997b. Vol. 37, No 3. P. 857–863. doi: [10.2135/cropsci1997.0011183X003700030027x](https://doi.org/10.2135/cropsci1997.0011183X003700030027x).
- Hull M. R., Long S. P., Jahnke L. S. Instantaneous and developmental effects of low temperature on the catalytic properties of antioxidant enzymes in two *Zea* species. *Austral. J. Plant Physiol.* 1997. Vol. 24, No 3. P. 337–343. doi: [10.1071/PP96041](https://doi.org/10.1071/PP96041).
- Jahnke L. S., Hull M. R., Long S. P. Chilling stress and oxygen metabolizing enzymes in *Zea mays* and *Zea diploperennis*. *Plant Cell Envir.* 1991. Vol., 14, No 1. P. 97–104. doi: [10.1111/j.1365-3040.1991.tb01375.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1991.tb01375.x).
- Kuk Y. I., San Shin J. Mechanisms of low-temperature tolerance in cucumber leaves of various ages. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 2007. Vol. 132. P. 294–301.
- Lu P., Sang W. G., Ma K. P. Different responses of the activities of antioxidant enzymes to thermal stresses between two invasive Eupatorium species in China. *J. Integr. Plant Biol.* 2008. Vol. 50, No 4. P. 393–401. doi: [10.1111/j.1744-7909.2007.00583.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00583.x).
- Morita S., Kaminaka H., Masumura T., Tanaka K. Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress. The involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signaling. *Plant Cell Physiol.*, 1999. Vol. 40, No 4. P. 417–422. doi: [10.1093/oxfordjournals.pcp.a029557](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029557).
- Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 1981. Vol. 22, No 5. P. 867–880.
- Omran R. G. Peroxide levels and the activities of catalase, peroxidase, and indoleacetic acid oxidase during and after chilling cucumber seedlings. *Plant Physiol.* 1980. Vol. 65, No 2. P. 407–408. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.65.2.407>.

Pinhero R. G., Rao M. V., Paliyath G., Murr D. P., Fletcher R. A. Changes in activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiol.* 1997. Vol. 114, No 2. P. 695–704. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.114.2.695>.

Prasad T. K., Anderson M. D., Martin B. A., Stewart C. R. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell.* 1994. Vol. 6, No 1. P. 65–74. doi: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.6.1.65>.

Rivero R. M., Ruiz J. M., García P. C., López-Lefebvre L., Sánchez E., Romero L. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Sci.* 2001. Vol. 157. P. 315–321. doi: [10.1016/S0168-9452\(00\)00395-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00395-2).

Shen W. Y., Nada K., Tachibana S. Effects of cold treatment on enzymatic and nonenzymatic antioxidant activities in leaves of chilling-tolerant and chilling-sensitive cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 1999. Vol. 68, No 5. P. 967–973. doi: [10.2503/jjshs.68.967](http://dx.doi.org/10.2503/jjshs.68.967).

Srivastava O. P., van Huystee R. B. An interrelationship among peroxidase, IAA oxidase and polyphenol oxidase from peanut cells. *Can. J. Bot.* 1977. Vol. 55. P. 2630–2635. doi: [10.1139/b77-301](http://dx.doi.org/10.1139/b77-301).

Sysoeva M. I., Sherudilo E. G., Markovskaya E. F., Obshatko L. A., Matveeva E. M. Temperature drop as a tool for cold tolerance increment in plants. *Plant Growth Regul.* 2005. Vol. 46. P. 189–191. doi: [10.1007/s10725-005-7357-2](http://dx.doi.org/10.1007/s10725-005-7357-2).

Wang Y., Liu H.-W., Li P., Zeng Sh., Zhen L., Guo J. The effect of chilling stress on membrane-lipid peroxidation of photosynthetic apparatus in rice seedlings in the dark and light. *Acta Phytophysiol. Sin.* 1986. Vol. 12, No 3. P. 244–251. (In Chinese, with English abstract).

Wang Y.-R., Zeng S.-X., Liu H.-X. Effect of cold hardening on SOD and glutathione reductase activities and on contents of the reduced form of glutathione and ascorbic acid in rice and cucumber seedlings. *Acta Bot Sin.* 1995. Vol. 37. P. 776–780. (In Chinese, with English abstract).

Zhang J. X., Cui S. P., Li J. M., Wei J. K., Kirkham M. B. Protoplasmic factors, antioxidant responses, and chilling resistance in maize. *Plant Physiol. Biochem.* 1995. Vol. 33, No 5. P. 567–575.

Zhang Z.-S., Yang C., Gao H.-Y., Zhang L.-T., Fan X.-L., Liu M.-J. The higher sensitivity of PSI to ROS results in lower chilling-light tolerance of photosystems in young leaves of cucumber. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* 2014. Vol. 137. P. 127–134.

Received September 13, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Шибяева Татьяна Геннадиевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: shibaeva@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 762706, +79214611116

Шеруди́ло Елена Георгиевна

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

Икконен Елена Николаевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: likkonen@gmail.com

Титов Александр Федорович

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

CONTRIBUTORS:

Shibaeva, Tatyana

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: shibaeva@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 762706, +79214611116

Sherudilo, Elena

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

Ikkonen, Elena

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: likkonen@gmail.com

Titov, Alexandr

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

УДК 597-154.31.017.3.

ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ И ВОДОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ РЫБ ПРИ РАЗНЫХ СКОРОСТЯХ НАГРЕВА В ЛЕТНИЙ СЕЗОН ГОДА

**В. К. Голованов, Г. М. Чуйко, В. А. Подгорная,
Е. И. Головкина, Н. С. Некрутов**

Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН

В летний сезон года изучен критический термический максимум (КТМ) у молоди речного окуня и карпа. Диапазон скоростей нагрева составил от 0,08 до 46 °С/ч. Значения КТМ у двухлетков карпа при всех скоростях нагрева были выше, чем у двухлетков окуня, а максимальные значения температуры переверота и потери координации движения отмечены у карпа при самой медленной скорости, у окуня – при самой медленной и быстрой скоростях нагрева. Определены активность фермента ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и содержание водорастворимой фракции белка (ВРБ) в мозге подвергнутых нагреву рыб. Обсуждается динамика изменений активности АХЭ и содержания ВРБ при разных скоростях нагрева. Исходя из данных по активности АХЭ и содержанию ВРБ, можно заключить, что в диапазоне скоростей нагрева до 8 °С/ч организм рыб достаточно легко адаптируется к возрастающей температуре среды. Однако дальнейшее повышение скорости нагрева приводит к усилению холинергических биосинтетических процессов в мозге рыб, что отражается на увеличении активности АХЭ и содержания белка. Предполагается, что возрастание значений обоих показателей при скорости нагрева 16 и 32 °С/ч является стрессорной реакцией рыб в ответ на изменение температуры среды. В перспективе показатели АХЭ и ВРБ могут быть использованы в качестве биологического маркера теплового воздействия разного типа (естественная среда, предварительная акклимация, а также нагрев или охлаждение). Таким образом, исследование активности АХЭ и содержания ВРБ в мозге рыб при разной скорости нагрева воды позволяет по-новому оценить как адаптационные возможности, так и физиолого-биохимические механизмы реакций водных животных в процессе температурных адаптаций.

Ключевые слова: рыбы; температура акклимации; термоустойчивость; нагрев воды; верхняя летальная температура; критический термический максимум; активность фермента; ацетилхолинэстераза; содержание водорастворимой фракции белка; мозг рыб.

**V. K. Golovanov, G. M. Chuiko, V. A. Podgornaya, E. I. Golovkina,
N. S. Nekrutov. DYNAMICS OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY
AND WATER-SOLUBLE PROTEINS IN THE BRAIN OF FISH AT DIFFERENT
HEATING RATES IN THE SUMMER SEASON**

The critical thermal maximum (CTM) for the young of river perch and common carp were investigated. The range of heating rates was 0.08 to 46 °C/h. The CTM values for carp

yearlings at all heating rates were higher than those for perch. The maximum temperature for the loss of righting response and loss of coordination were observed in the carp at the slowest rate and in the perch – at the slowest and fastest heating rates. The brain enzyme acetylcholinesterase activity (AChE) and soluble protein content (SPC) of the fishes subjected to heat were determined. The changes in AChE activity and SPC are discussed for different heating rates. On the basis of the data on AChE activity and SPC, one can conclude that in the range of heating rates up to 8 °C/h fish body quite easily adapts to the increasing ambient temperature. However, further increase in the heating rate leads to intensification of cholinergic biosynthetic processes in the brain of fish, which results in an increased activity of AChE and protein content. It is assumed that the increase in the values of both parameters at a heating rate of 16 and 32 °C/h is the stress response of fish to the changing ambient temperature. It is possible that the performance of AChE and SPC could be used as a biological marker of thermal exposure of different types (natural environment, pre-acclimation, and heating or cooling). Thus, the research of AChE activity and SPC in the brain of fish at different rates of water heating allows us to reevaluate both adaptation possibilities, and physiological and biochemical mechanisms of aquatic animal reactions during temperature adaptations.

Key words: fish; temperature acclimation; temperature resistance; water heating; upper lethal temperature; critical thermal maximum; enzyme activity; acetylcholinesterase; soluble protein content; fish brain.

Введение

Известно, что потепление климата влияет на условия обитания пресноводных рыб, в результате чего изменяется их популяционная численность, структура и видовое разнообразие [Клиге и др., 1998; Кляшторин, Любушин, 2005]. Несмотря на то что направленность долгосрочных климатических трендов находится в процессе обсуждения [Пузаченко, 2004; Кляшторин, Любушин, 2005; Farmer, Cook, 2013], существующая тенденция к потеплению климата и планируемый ввод в эксплуатацию крупных энергетических и промышленных объектов в России и за рубежом неизбежно приводят к повышению уровня температуры в летние и зимние периоды года в местах непосредственного обитания рыб [Мордухай-Болтовской, 1975; Алабастер, Ллойд, 1984; Голованов, 2013б]. Именно поэтому изучение верхних температурных границ жизнедеятельности рыб в последнее время становится все более актуальным и своевременным.

К числу возможных причин и механизмов гибели рыб в зоне высоких температур относят изменения структуры мембран, денатурацию белков и их коагуляцию в результате нагрева, термическую инактивацию ферментов (со скоростью, превышающей скорость их синтеза), недостаток кислорода, а также различия в температурном коэффициенте (Q_{10}) для взаимосвязанных метаболических реакций и нарушения водно-солевого баланса у рыб [Шмидт-Нильсен, 1982; Капшай, Голованов, 2012]. В то же время физиолого-биохимические явления и процессы, происходящие непосредственно

в зоне сублетальных значений температуры, обычно выше 30 °C, у границы жизнедеятельности гидробионтов, во многом остаются малоизученными. Также мало данных и о том, каким образом ферментные системы рыб реагируют на быстрое повышение температуры в диапазоне от оптимальной до летальной. Известно всего несколько работ, в которых исследовано влияние скорости нагрева воды на активность пищеварительных ферментов в разные сезоны года [Голованова и др., 2002; Голованов и др., 2011; Golovanova et al., 2013].

Цель работы – определить уровень критического термического максимума (КТМ) и изучить динамику активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и содержания водорастворимой фракции белка (ВРБ) в мозге молоди речного окуня и карпа при разных режимах нагрева воды в летний сезон года.

Материалы и методы

Для оценки КТМ использованы стандартные методы, применявшиеся ранее [Beitinger et al., 2000; Голованов, Смирнов, 2007; Голованов и др., 2012; Голованов, 2013а, б]. В качестве объектов исследования выбраны двухлетки речного окуня *Perca fluviatilis* L. (длина тела рыб от 5,7 до 14,0 см, масса тела от 8,4 до 36,4 г) и карпа *Cyprinus carpio* L. (длина тела от 5,6 до 19,6 см, масса тела от 7,4 до 28,3 г). Окунь отловлен в прибрежье Рыбинского водохранилища 30-м волокушей, карп выращен в прудах стационара полевых и экспериментальных работ «Сунога» ИБВВ РАН. Температура предварительной акклимации

рыб равнялась 20 °С, их количество в каждом опыте составляло 6 экз. Общее число исследованных рыб составило 42 экз. окуня и 42 экз. карпа. Повышение температуры воды производили в экспериментальном аквариуме (объемом 60 л) при скоростях: 0,08 °С/ч (или 2 °С/сут); 4,3; 8,3; 16,0; 32,6 и 46,7 °С/ч. За критерий КТМ принимали значение температуры, при которой происходил переворот каждой особи на бок или вверх брюшком. При перевороте 1-й, 2-й и последующих рыб они сразу же осторожно изымались из аквариума и переносились в морозильную камеру холодильника. Отдельная группа рыб в количестве 6 экз. использована в качестве физиолого-биохимического контроля.

Для определения активности АХЭ и содержания ВРБ использованы стандартные методы и процедуры, описанные ранее [Chuiiko et al., 2003; Чуйко, 2004; Чуйко, Подгорная, 2007]. Рыб обезглавливали, вскрывали черепную коробку, перерезали черепно-мозговые нервы и спинной мозг в области перехода его в продолговатый. Затем извлекали целый головной мозг и отмывали в 0,1 М фосфатном буфере рН 7,5. Лишнюю влагу удаляли фильтровальной бумагой. Мозг гомогенизировали при помощи диспергатора IKA T10 basic в течение 3 мин. Затем гомогенаты центрифугировали в рефрижераторной центрифуге Mikro 22 R при 10000 г и t 0 °С в течение 15 мин. Для дальнейшего анализа использовали супернатант.

Активность АХЭ определяли колориметрическим методом Дж. Л. Элмана [1961] в модификации М. Н. Масловой и Н. Резника [1976]. Для этого в три пробирки вносили по 3 мл 0,1 М фосфатного буфера рН 7,5; по 0,02 мл пробы, содержащей фермент; 0,5 мл смеси 0,001 М раствора 5,5-дителиобис-2-нитробензойной кислоты (ДТНБ) и 0,006 М раствора субстрата ацетилтиохолина иодида в соотношении 1 : 1. При этом конечное разведение проб (г ткани/мл раствора) равнялось 1 : 3000, а конечные концентрации субстратов и ДТНБ – $4,3 \times 10^{-4}$ и $7,1 \times 10^{-5}$ М. Содержимое пробирок быстро перемешивали и пробы инкубировали в водяном термостате TWA-2 (ELMI Ltd., Riga, Latvia) при 30 °С в течение 10–30 мин. Гидролиз субстрата останавливали добавлением 2–3 капель 0,01 % раствора ингибитора АХЭ прозерина. В контрольную пробирку ингибитор вносили перед добавлением смеси ДТНБ и субстрата. После инкубации пробы фотометрировали при длине волны 412 нм в кюветах с длиной оптического пути 1 см. Из двух значений экстинкции находили среднее. Активность АХЭ выражали соответственно в мкмоль или

нмоль гидролизованного субстрата на г ткани или мг белка за мин.

Содержание белка в пробах определяли методом М. М. Брэдфорда [1976]. Для этого в две пробирки помещали по 0,1 мл исследуемого раствора, в контрольную пробирку – 0,1 мл дистиллированной воды. Во все пробирки прибавляли по 2,5 мл откалиброванного раствора Кумасси бриллиантового голубого G-250 (Serva, USA), приготовленного на этаноле и орто-фосфорной кислоте (конечная концентрация реагентов (вес/объем) в смеси составляет соответственно 0,01; 4,7 и 8,5 %). Избегая вспенивания, осторожно перемешивали содержимое пробирок и оставляли при комнатной температуре. Через 10 мин пробы фотометрировали относительно контроля при длине волны 595 нм. Фотометрирование проводили на спектрофотометре СФ-26 (Ломо, Санкт-Петербург) в кюветах с толщиной слоя 1 см. Из двух значений экстинкции находили среднее.

Данные биохимического анализа обработаны статистически и представлены в виде средних значений и их ошибок ($\bar{x} \pm SE$). Достоверность различий между средними оценивали методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с оценкой достоверности различий при помощи LSD-теста при $p < 0,05$ [Sokal, Rohlf, 1995]. Статистический анализ проводили с помощью пакета программ MS Excel 2010 и Statistica 8.

Результаты и обсуждение

Значения КТМ у двухлетков окуня при нагреве с разной скоростью (0,08; 4,3; 8,3; 16,0; 32,6 и 46,7 °С/ч) составили в среднем 33,5; 33,2; 33,0; 32,8; 32,5 и 33,7 °С, у двухлетков карпа – 40,2; 37,7; 36,2; 35,4; 35,5 и 36,1 °С соответственно. Значения КТМ у двухлетков карпа при всех скоростях нагрева были выше, чем у двухлетков окуня, а максимальные значения температуры переворота и потери координации движения отмечены у карпа при самой медленной скорости, у окуня – при самой медленной и быстрой скоростях нагрева.

Средние значения активности АХЭ и содержания ВРБ целого мозга окуня и карпа при разных (округленных) скоростях нагрева приведены в таблице. Как следует из приведенных данных, характер зависимости активности АХЭ в мозге двух видов рыб от скорости нагрева в целом одинаков. С увеличением интенсивности нагрева активность фермента немного снижается (достоверно лишь у карпа) по сравнению с контролем, но в целом в интервале 0,08–8 °С/ч остается примерно на одном уровне.

Активность ацетилхолинэстеразы и содержание водорастворимого белка в мозге рыб при разной скорости нагрева воды (n = 6 экз.)

Скорость нагрева, °С/ч	Активность АХЭ		Содержание белка, мг/г ткани
	Мкмоль/г/мин	нмоль/мг/мин	
	На 1 г ткани	На 1 мг белка	
Двухлетки окуня			
0 (контроль)	3,88 ± 0,20 ^a	59,1 ± 2,8 ^a	65,7 ± 1,2 ^a
0,08	3,12 ± 0,35 ^a	50,3 ± 5,1 ^{a,б}	62,3 ± 1,3 ^a
4	3,41 ± 0,54 ^a	40,2 ± 5,3 ^{б,в}	45,2 ± 1,8 ^б
8	3,52 ± 0,09 ^a	76,2 ± 2,4 ^г	46,3 ± 0,3 ^б
16	6,09 ± 0,60 ^б	73,2 ± 6,8 ^г	83,9 ± 4,3 ^в
32	5,27 ± 0,24 ^б	53,2 ± 2,6 ^{а,б}	99,3 ± 2,8 ^г
46	3,94 ± 0,29 ^a	35,8 ± 3,1 ^в	110,5 ± 2,3 ^д
Двухлетки карпа			
0 (контроль)	3,98 ± 0,18 ^a	41,4 ± 1,8 ^в	96,6 ± 3,6 ^в
0,08	3,03 ± 0,04 ^б	36,4 ± 0,4 ^б	83,4 ± 1,4 ^б
4	3,59 ± 0,07 ^в	81,7 ± 1,1 ^е	44,1 ± 0,4 ^а
8	3,54 ± 0,09 ^в	76,3 ± 2,4 ^д	46,4 ± 0,3 ^а
16	5,47 ± 0,06 ^г	57,6 ± 0,7 ^г	95,0 ± 1,0 ^в
32	5,79 ± 0,04 ^д	37,3 ± 0,6 ^б	155,5 ± 2,2 ^г
46	3,06 ± 0,10 ^б	16,8 ± 0,5 ^а	182,1 ± 1,2 ^д

Примечание. Разные индексы указывают на статистические достоверности показателей в столбцах, p < 0,05.

Начиная со скорости 16 °С/ч она достоверно выше в 1,5–2 раза контрольных значений, сохраняясь на этом уровне и при 32 °С/ч, но при скорости 46 °С/ч снова падает до уровня контроля. Характер изменений ВРБ у обоих видов также сходный: его значения сначала медленно, а затем заметно снижаются при скорости нагрева от 0,08 до 8 °С/ч. При дальнейшем увеличении скорости нагрева содержание ВРБ растет и при скорости 32 и 46 °С/ч становится достоверно выше контрольных значений примерно в 2 раза.

Исходя из данных по активности АХЭ и содержанию ВРБ можно заключить, что в диапазоне скоростей нагрева до 8 °С/ч организм рыб достаточно легко адаптируется к возрастающей температуре среды. При этом уровень активности фермента поддерживается за счет снижения синтеза белка. Однако дальнейшее повышение скорости нагрева приводит к усилению холинергических биосинтетических процессов в мозге рыб, что отражается на увеличении активности АХЭ и содержания белка. Прямая зависимость интенсивности синтеза белка в мозге карася [Lajtha, Shershen, 1975] и АХЭ в мозге окуня [Чуйко, Козловская, 1989] от температуры акклимации рыб была показана ранее. Можно предположить, что возрастание значений обоих показателей при скорости нагрева 16 и 32 °С/ч является стрессорной реакцией рыб в ответ на изменение температуры среды, поскольку известно, что такие же изменения наблюдаются у окуня при стрессе, индуцированном адреналином [Pavlov et al., 1994].

Снижение активности АХЭ и резкое повышение содержания ВРБ, возможно, связаны с начальными этапами термоиндуцированных деструктивных процессов в мозге рыб, в результате которых происходит разрушение клеточных мембран и самих клеток, выход мембранных и плазматических белков в межклеточное пространство и нарушение функционирования ферментных комплексов. Скорее всего, данные процессы носят необратимый характер, однако для выяснения этого необходимы дополнительные исследования.

В опытах И. Л. Головановой с соавт. [2002] на молоди серебряного карася *Carassius auratus* L. и В. К. Голованова с соавт. [2011] на молоди карпа отмечен последовательный рост амилитической активности при повышении температуры воды в диапазоне скорости нагрева от 0,04–0,08 до 50 °С/ч в летний период. Следует отметить, что в данном случае при определении активности фермента использовали суммарную навеску слизистой оболочки кишечника от 6 особей, использованных в каждом варианте опыта по определению КТМ. В то же время, по данным М. С. Ахтара [Ahtar et al., 2013], у молоди индийского солнечного махира *Tor putitora* (Hamilton, 1822) при содержании рыб в течение 30 дней в диапазоне температуры от 20 до 32 °С с повышением температуры акклимации активность АХЭ постепенно снижалась. Если в первом случае [Голованова и др., 2002; Голованов и др., 2011] была изучена активность ферментов в условиях роста температуры среды с разной скоростью, то во

втором [Achtar et al., 2013] изучали влияние разной температуры акклимации рыб. Эксперименты, проведенные ранее на окуне, показали, что активность АХЭ мозга рыб растет прямо пропорционально повышению температуры акклимации, проведенной в диапазоне 17–30 °С в течение 26 дней [Чуйко, Козловская, 1989]. Противоположные результаты, полученные в двух сходных экспериментах [Чуйко, Козловская, 1989; Achtar et al., 2013], показывают сложный характер влияния температуры на активность АХЭ мозга рыб. К настоящему времени экспериментальных данных, характеризующих активность АХЭ и содержание ВРБ непосредственно при нагреве с различной скоростью вплоть до сублетального и летального уровня температуры, в доступной нам научной литературе не обнаружено.

В последнее время показатель АХЭ достаточно часто используют в качестве биологического маркера воздействия фосфорорганическими и карбаматными пестицидами [Ghazala et al., 2014] и ртутью [Yao Kun et al., 2014]. Не исключено, что показатели АХЭ и ВРБ в перспективе могут быть использованы в качестве биологического маркера теплового воздействия разного типа (естественная среда, предварительная акклимация, а также нагрев или охлаждение).

Заключение

Таким образом, исследование активности АХЭ и содержания ВРБ в мозге рыб при разной скорости нагрева воды позволяет по-новому оценить как адаптационные возможности, так и физиолого-биохимические механизмы реакций водных животных в процессе температурных адаптаций.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Отделения биологических наук РАН «Биологические ресурсы России» и Программы Президента РФ «Ведущие научные школы», НШ-2666.2014.4 «Экологические аспекты адаптаций и популяционная организация у рыб».

Литература

Алабастер Дж., Ллойд Р. Критерии качества воды для пресноводных рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. 384 с.

Голованов В. К. Эколого-физиологические закономерности распределения и поведения пресноводных рыб в термоградиентных условиях // *Вопр.*

ихтиол. 2013а. Т. 53, № 3. С. 286–314. doi: 10.1134/S0032945213030016.

Голованов В. К. Температурные критерии жизнедеятельности пресноводных рыб. М.: Полиграф-Плюс, 2013б. 300 с.

Голованов В. К., Смирнов А. К. Влияние скорости нагрева на термоустойчивость карпа *Cyprinus carpio* в различные сезоны года // *Вопр. ихтиол.* 2007. Т. 47, № 4. С. 555–561. doi: 10.1134/S0032945207070089.

Голованов В. К., Смирнов А. К., Голованова И. Л. Влияние скорости нагрева воды на термоустойчивость и пищеварительные карбогидразы карпа *Cyprinus carpio* (L.) в различные сезоны года // *Вестник АГТУ. Серия Рыбное хозяйство.* 2011. № 1. С. 82–86.

Голованов В. К., Смирнов А. К., Капшай Д. С. Сравнительный анализ окончательного избираемого и верхней летальной температуры у молодежи некоторых видов пресноводных рыб // *Труды КарНЦ РАН.* 2012. № 2. С. 70–75.

Голованова И. Л., Кузьмина В. В., Голованов В. К. Воздействие высоких температур на пищеварительные гидролазы серебряного караса *Carassius auratus* L. // *Вопр. ихтиологии.* 2002. Т. 42, № 1. С. 121–128. doi: 10.13140/RG.2.1.4080.4966.

Капшай Д. С., Голованов В. К. Эколого-физиологические и биохимические механизмы адаптаций рыб в сублетально высоких температурах // *Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптаций гидробионтов: материалы Всероссийской конференции с международным участием (Борок, 22–27 сентября 2012 г.).* Кострома: Костромской печатный дом, 2012. С. 170–172. doi: 10.13140/RG.2.1.3928.8485.

Клиге Р. К., Данилов И. Д., Конищев В. Н. История гидросферы. М.: Научный мир, 1998. 368 с.

Кляшторин Л. Б., Любушин А. А. Циклические изменения климата и рыбопродуктивности. М.: ВНИРО, 2005. 235 с.

Маслова М. Н., Резник Н. Угнетение холинэстеразной активности в мозге крыс фосфорорганическими ингибиторами с различной степенью гидрофобности // *Укр. биохим. журнал.* 1976. Т. 48, № 4. С. 450–454.

Мордухай-Болтовской Ф. Д. Проблема влияния тепловых и атомных электростанций на гидробиологический режим водоемов (обзор) // *Экология организмов водохранилищ-охладителей.* Л.: Наука, 1975. С. 7–69.

Пузаченко Ю. Г. Математические методы в экологических и географических исследованиях. М.: Академия, 2004. 416 с.

Чуйко Г. М. Сравнительно-биохимическое исследование холинэстераз пресноводных костистых рыб бассейна Рыбинского водохранилища: автореф. дис. ... докт. биол. наук. СПб., 2004. 40 с.

Чуйко Г. М., Козловская В. И. Сезонные изменения активности ацетилхолинэстеразы мозга окуна (*Perca fluviatilis* L.) // *Физиология и токсикология гидробионтов.* Ярославль: ЯрГУ, 1989. С. 27–38.

Чуйко Г. М., Подгорная В. А. Холинэстеразы пресноводных костистых рыб // *Физиология и токсикология пресноводных животных.* Сборн. статей. Рыбинск: Рыбинский дом печати, 2007. С. 100–139.

Шмидт-Ниельсен К. Физиология животных. При-
способление и среда. Кн. 1. М.: Мир, 1982. 416 с.

Achtar M. S., Pal A. K., Sahu N. P. et al. Thermal toler-
ance, oxygen consumption and haemato-biochemical
variables of *Tor putitora* juveniles acclimated to five tem-
peratures // *Fish Physiol. Biochem.* 2013. Vol. 39, No 6.
P. 1387–1398. doi: 10.1007/s10695-013-9793-7.

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the
quantitation of microgram quantities of protein utilizing
the principal of protein-dye binding // *Analytic. Bio-
chem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.

Beitinger T. L., Bennet W. A., McCauley R. W. Tem-
perature tolerances of North American freshwater fish-
es exposed to dynamic changes in temperature // *En-
viron. Biol. Fish.* 2000. Vol. 58, No 3. P. 237–275. doi:
10.1023/A:1007676325825.

Chuiko G. M., Podgornaya V. A., Zhelnin Y. Y. Ace-
tylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in
brain and plasma of freshwater teleosts: cross-species
and cross-family differences // *Comp. Biochem. Physiol.*
2003. Part B. Vol. 135B, No 1. P. 55–61. doi: 10.1016/
S1096-4959(03)00048-4.

Ellmann G. L., Courtney K. D., Andres V. et al.
A new and rapid colorimetric determination of acetyl-
choline-esterase activity // *Biochem. Pharmacol.* 1961.
Vol. 7, iss. 2. P. 91–95.

Farmer G. T., Cook J. *Climate Change Science:
A Modern Synthesis.* Vol. 1. The Physical Climate.

Springer Dordrecht Heidelberg New York London, 2013.
564 p. doi: 10.1007/978-94-007-5757-8.

Ghazala S., Mahboob S., Sultana T. et al. Cholin-
esterases: cholinergic biomarkers for the detection of sub-
lethal effects of organophosphorous and carbamates
in *Catla catla* // *Int. J. Agricul. Biol.* 2014. Vol. 16, No 2.
P. 406–410.

Golovanova I. L., Golovanov V. K., Smirnov A. K.,
Pavlov D. D. Effect of ambient temperature increase
on intestinal mucosa amylolytic activity in freshwater
fish // *Fish Physiology and Biochemistry.* 2013. Vol. 39,
iss. 6. P. 1497–1504. doi: 10.1007/s10695-013-9803-9.

Lajtha A., Shershen H. Changes in the rates of pro-
tein synthesis in the brain of goldfish at various tempera-
tures // *Life Sciences.* 1975. Vol. 1. P. 1861–1868.

Pavlov D. F., Chuiko G. M., Shabrova A. G. Adrena-
line induced changes of acetylcholinesterase activity
in the brain of perch (*Perca fluviatilis* L.) // *Comp. Bio-
chem. Physiol.* 1994. Vol. 108C, No 1. P. 113–115.

Sokal R. R., Rolf F. J. *Biometry. The principals and
practice of statistics in biological research.* New York:
W. H. Freeman and Co., 1995. 887 p.

Yao Kun, Li Yan, Zhu Xiaoshan, Zhu Lin. Individual
and joint effects of lead and mercury on acetylcholin-
esterase activity in goldfish brain // *Fresenius Environm.
Bull.* 2014. Vol. 23, No 10. P. 2514–2519.

Поступила в редакцию 12.10.2015

References

Alabaster Dzh., Llojd R. Kriterii kachestva vody dlja
presnovodnyh ryb [Water quality criteria for freshwater
fish]. Moscow: Legkaja i pishhevaja promyshlennost',
1984. 384 p.

Chuiko G. M. Sravnitel'no-biokhimicheskoe issle-
dovanie kholinesteraz presnovodnykh kostistyxh ryb
basseina Rybinskogo vodokhranilishcha [Comparative
biochemical study of cholinesterase of freshwater bony
fish of the Rybinsk Reservoir basin]: DSc Diss. (Biol.).
St. Petersburg, 2004. 40 p.

Chujko G. M., Kozlovskaja V. I. Sezonnnye izmene-
nija aktivnosti acetilholinjesterazy mozga okunja (*Perca
fluviatilis* L.) [Seasonal changes in brain acetylcholin-
esterase activity of perch (*Perca fluviatilis* L.)]. *Fiziologija
i toksikologija gidrobiontov [Physiology and toxicology of
aquatic organisms]*. Jaroslavl': JarGU, 1989. P. 27–38.

Chujko G. M., Podgornaja V. A. Holinjesterazy pres-
novodnyh kostistyxh ryb [Cholinesterase of freshwater
bony fishes]. *Fiziologija i toksikologija presnovodnyh
zhivotnyh. Sborn. Statej [Physiology and toxicology of
freshwater animals. Collect. papers]*. Rybinsk: Rybinskij
dom pečhati, 2007. P. 100–139.

Golovanov V. K. Ecophysiological Patterns of Dis-
tribution and Behavior of Freshwater Fish in Thermal
Gradients. *Journal of Ichthyology.* 2013a. Vol. 53, No 4.
P. 252–280. doi: 10.1134/S0032945213030016.

Golovanov V. K. Temperaturnye kriterii zhiznedeja-
tel'nosti presnovodnyh ryb [Temperature criteria of
freshwater fish life activity]. Moscow: Poligraf-Pljus,
2013b. 300 p.

Golovanov V. K., Smirnov A. K. Influence of the wa-
ter heating rate upon thermal tolerance in common carp
(*Cyprinus carpio* L.) during different seasons. *Journal
of Ichthyology.* 2007. Vol. 47, No 7. P. 538–543. doi:
10.1134/S0032945207070089.

Golovanov V. K., Smirnov A. K., Golovanova I. L.
Vlijanie skorosti nagreva vody na termoustojchi-
vost' i pishhevaritel'nye karbogidrazy karpa *Cypri-
nus carpio* (L.) v razlichnye sezony goda [Influence
of the water heating rate upon thermal resistance
and digestive carbohydrase of carp *Cyprinus carpio* (L.)
during different seasons]. *Vestnik AGTU. Serija Rybnoe
hozjajstvo [Vestnik of ASTU. Series Fishing industry]*.
2011. No 1. P. 82–86.

Golovanov V. K., Smirnov A. K., Kapshaj D. S.
Sravnitel'nyj analiz okonchatel'no izbiraemoj i verhnej
letal'noj temperatury u molodi nekotoryh vidov presno-
vodnyh ryb [Final thermopreferendum and upper lethal
temperature in juveniles of some freshwater fish spe-
cies]. *Trudy KarNC RAN [Trans. of KarRC of RAS]*. 2012.
No 2. P. 70–75.

Golovanova I. L., Kuz'mina V. V., Golovanov V. K.
Vozdejstvie vysokih temperatur na pishhevaritel'nye gi-
drolazy serebrjanogo karasja *Carassius auratus* L. [In-
fluence of high temperature on the digestive hydrolases
of goldfish carp *Carassius auratus* L.]. *Vopr. Ihtologii
[J. Ichthyol.]*. 2002. Vol. 42, No 1. P. 121–128.

Kapshaj D. S., Golovanov V. K. Jekologo-fizio-
logicheskie i biokhimicheskie mehanizmy adaptacij
ryb v subletal'no vysokih temperaturah [Ecological,

physiological and biochemical mechanisms for adaptations of fishes in sublethal high temperatures]. fiziologicheskie, biohimicheskie i molekularno-geneticheskie mehanizmy adaptacij gidrobiontov: materialy Vserossijskoj konferencii s mezhdunarodnym uchastiem (Borok, 22–27 sentjabrja 2012 g.) [Physiological, biochemical and molecular genetic mechanisms of adaptation of aquatic organisms: proc. of All-Russian conf. with international participation (Borok, September 22–27, 2012)]. Kostroma: Kostromskoj pechatnyj dom, 2012. P. 170–172. doi: 10.13140/RG.2.1.3928.8485.

Klige R. K., Danilov I. D., Konishhev V. N. Istorija gidrosfery [The history of hydrosphere]. Moscow: Nauchnyj mir, 1998. 368 p.

Kljashtorin L. B., Ljubushin A. A. Ciklicheskie izmenenija klimata i ryboproduktivnosti [Cyclic climate changes and fish productivity]. Moscow: VNIRO, 2005. 235 p.

Maslova M. N., Reznik N. Ugnetenie holinjesteraznoj aktivnosti v mozge krysa fosfororganicheskimy ingibitorami s razlichnoj stepen'ju gidrofobnosti [Inhibition of cholinesterase activity in the brain of rats by phosphoorganic inhibitors with different degrees of hydrophobicity]. *Ukr. biohim. zhurnal [Ukr. Biochem. J.]*. 1976. Vol. 48, No 4. P. 450–454.

Morduhaj-Boltovskoj F. D. Problema vlijanija teplovyh i atomnyh jelektrostancij na gidrobiologicheskij rezhim vodoemov (obzor) [The effect of thermal and nuclear electric power stations on a biological regime of reservoirs (Review)]. *Jekologija organizmov vodohranilishh-ohladiatelej [Ecology of reservoirs-coolers]*. Leningrad: Nauka, 1975. P. 7–69.

Puzachenko Ju. G. Matematicheskie metody v jekologicheskix i geograficheskix issledovanijah [Mathematical methods in ecological and geographical studies]. Moscow: Akademija, 2004. 416 p.

Shmidt-Niel'sen K. Fiziologija zhivotnyh. Prispoblenie i sreda [Animal physiology. Adaptation and environment]. B. 1. Moscow: Mir, 1982. 416 p.

Achtar M. S., Pal A. K., Sahu N. P., Ciji A., Mahanta P. C. Thermal tolerance, oxygen consumption and haemato-biochemical variables of *Tor putitora* juveniles acclimated to five temperatures. *Fish Physiol. Biochem.* 2013. Vol. 39, No 6. P. 1387–1398. doi: 10.1007/s10695-013-9793-7.

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing

the principal of protein-dye binding. *Analytic. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.

Beitinger T. L., Bennet W. A., McCauley R. W. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environ. Biol. Fish.* 2000. Vol. 58, No 3. P. 237–275. doi: 10.1023/A:1007676325825.

Chuiko G. M., Podgornaya V. A., Zhelnin Y. Y. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in brain and plasma of freshwater teleosts: cross-species and cross-family differences. *Comp. Biochem. Physiol.* 2003. Part B. Vol. 135B, No 1. P. 55–61. doi: 10.1016/S1096-4959(03)00048-4.

Ellmann G. L., Courtney K. D., Andres V. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholine-esterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961. Vol. 7, iss. 2. P. 91–95.

Farmer G. T., Cook J. Climate Change Science: A Modern Synthesis. Vol. 1. The Physical Climate. Springer Dordrecht Heidelberg New York London, 2013. 564 p. doi: 10.1007/978-94-007-5757-8.

Ghazala S., Mahboob S., Sultana T., Sultana L., Ahmad L., Asi M. R. Cholinesterases: cholinergic biomarkers for the detection of sublethal effects of organophosphorous and carbamates in *Catla catla*. *Int. J. Agricul. Biol.* 2014. Vol. 16, No 2. P. 406–410.

Golovanova I. L., Golovanov V. K., Smirnov A. K., Pavlov D. D. Effect of ambient temperature increase on intestinal mucosa amyloid activity in freshwater fish. *Fish Physiology and Biochemistry.* 2013. Vol. 39, iss. 6. P. 1497–1504. doi: 10.1007/s10695-013-9803-9.

Lajtha A., Shershen H. Changes in the rates of protein synthesis in the brain of goldfish at various temperatures. *Life Sciences.* 1975. Vol. 1. P. 1861–1868.

Pavlov D. F., Chuiko G. M., Shabrova A. G. Adrenaline induced changes of acetylcholinesterase activity in the brain of perch (*Perca fluviatilis* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 1994. Vol. 108C, No 1. P. 113–115.

Sokal R. R., Rolf F. J. Biometry. The principals and practice of statistics in biological research. New York: W. H. Freeman and Co., 1995. 887 p.

Yao Kun, Li Yan, Zhu Xiaoshan, Zhu Lin. Individual and joint effects of lead and mercury on acetylcholinesterase activity in goldfish brain. *Fresenius Environm. Bull.* 2014. Vol. 23, No 10. P. 2514–2519.

Received October 12, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Голованов Владимир Константинович
ведущий научный сотрудник, д. б. н.
Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН (ИБВВ РАН)
Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл.,
Россия, 152742
эл. почта: vkgolovan@mail.ru
тел.: (485) 4724484

CONTRIBUTORS:

Golovanov, Vladimir
I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters,
Russian Academy of Sciences
152742 Borok, Yaroslavl Region, Russia
e-mail: vkgolovan@mail.ru
tel.: (485) 4724484

Чуйко Григорий Михайлович

заведующий лабораторией, д. б. н.
Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН (ИБВВ РАН)
Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл.,
Россия, 152742
эл. почта: gchuiko@mail.ru
тел.: (485) 4724116

Подгорная Вера Александровна

научный сотрудник
Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН (ИБВВ РАН)
Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл.,
Россия, 152742
эл. почта: aloe@ibiw.yaroslavl.ru
тел.: (48547) 24116

Головкина Елена Ивановна

старший лаборант
Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН (ИБВВ РАН)
Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл.,
Россия, 152742
эл. почта: lena.golowckina@mail.ru
тел.: (48547) 24116

Некрутов Никита Сергеевич

студент
Ярославский государственный университет
им. П. Г. Демидова
ул. Советская, 14, Ярославль, Россия, 150000
эл. почта: nikita.nekrutov@mail.ru
тел.: 89201224087

Chuiko, Grigory

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

Podgornaya, Vera

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

Golovkina, Elena

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

Nekrutov, Nikita

P. G. Demidov Yaroslavl State University
14 Sovetskaya St., 150000 Yaroslavl, Russia
e-mail: nikita.nekrutov@mail.ru

УДК 631.467.2:504.5

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК НЕМАТОД-ФИТОТРОФОВ В ТЕЧЕНИЕ ВЕГЕТАЦИОННОГО ПЕРИОДА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Е. М. Матвеева, А. А. Сущук, Д. С. Калинкина

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Экспериментально изучено влияние солей тяжелых металлов (цинка и свинца) на таксономическое разнообразие и популяционные характеристики (плотность популяций, сезонная динамика численности, возрастная и эколого-трофическая структура) нематод-фитотрофов. Выявлены показатели, чувствительные и устойчивые к воздействию металлов. Установлено снижение таксономического разнообразия в опытных вариантах в отдельные сроки наблюдений. Наибольшие изменения под влиянием цинка и свинца происходили в общей численности нематод-фитотрофов. В опытных вариантах выявлено увеличение количества особей по сравнению с контролем в начале вегетационного периода (май–июнь), в основном за счет группы паразитических нематод, вследствие чего временно изменялось соотношение *Asp/Pr*. В конце сезона (август–сентябрь) наблюдалось снижение плотности популяций нематод. Такие популяционные характеристики, как сезонная динамика численности и возрастная структура, не изменялись под воздействием *ТМ*. Установлено, что изменения популяционных характеристик нематод-фитотрофов под воздействием *ТМ* носили кратковременный характер. С использованием метода главных компонент показано, что нематоды-фитотрофы менее зависимы от воздействия тестируемых поллютантов, однократно вносимых в почву, чем от абиотических факторов.

Ключевые слова: нематоды-фитотрофы; таксономическое разнообразие; сезонная динамика; плотность популяций; возрастная структура; эколого-трофическая структура; тяжелые металлы; свинец; цинк.

E. M. Matveeva, A. A. Sushchuk, D. S. Kalinkina. EXPERIMENTAL STUDY OF POPULATION PARAMETERS OF PHYTOTROPHIC NEMATODES DURING THE GROWING SEASON UNDER THE INFLUENCE OF HEAVY METALS

The effect of zinc and lead salts on the taxonomic diversity and population characteristics (population density, seasonal dynamics, age and eco-trophic structure) of phytotrophic nematodes was experimentally studied. The parameters sensitive and resistant to heavy metals were detected. The taxonomic composition of nematodes was found to decrease in heavy metal treatments in certain periods of observations. The most considerable changes were revealed for the total number of phytotrophic nematodes. After addition of heavy metals to the soil (May–June) the total number of nematodes increased mostly due plant parasitic nematodes. Afterwards the *Asp/Pr* ratio temporarily changed. In the

end of the season (August–September) a decrease in nematode population density was established in zinc and lead treated soils in comparison with the control. Such population characteristics as seasonal population dynamics and age structure were pollutant independent. It was found that the changes in the population characteristics of phytotrophic nematodes under heavy metal pollution were short-term. Based on the principal component analysis it was shown that phytotrophic nematodes were less susceptible to the effect of heavy metals once applied to the soil than to natural fluctuations of abiotic factors.

Key words: phytotrophic nematodes; taxonomic diversity; seasonal dynamics; population density; age structure; eco-trophic structure; heavy metals; lead; zinc.

Введение

В последние десятилетия в связи с возрастающим антропогенным прессом на биосферу трансформация почв является актуальной экологической проблемой. Одним из существенных факторов деградации почв является техногенное загрязнение, обусловленное воздействием промышленности, транспорта, а также другими видами хозяйственной деятельности человека. Тяжелые металлы, как основные вещества-загрязнители, попадая в почву, вовлекаются в биологический круговорот, передаются по трофическим цепям и могут вызывать целый ряд негативных последствий [Строганова и др., 1997]. Известно, что среди металлов выделяют необходимые для функционирования растений, животных и человека микроэлементы (медь, цинк, никель, железо и другие), которые при повышении их уровня в окружающей среде становятся токсичными. Тяжелые металлы, не являющиеся микроэлементами, негативно влияют на живые организмы даже в относительно невысоких концентрациях (свинец, кадмий, ртуть) [Титов и др., 2014]. Для мониторинга любых антропогенных изменений почвенных экосистем необходимо выявление видов-индикаторов состояния окружающей среды. Почвообитающие нематоды в силу биологических и экологических особенностей (широкое распространение, высокая численность, богатый видовой состав, разнообразие типов питания и непосредственный контакт с почвенными растворами) рассматриваются в качестве удобного тест-объекта различных нарушений среды [Bongers, 1990; Ettema, Bongers, 1993; Yeates et al., 1994; Wasilewska, 1997; Bongers et al., 2001; Ferris et al., 2001]. Под воздействием тяжелых металлов изменяется численность, разнообразие фауны и экологотрофическая структура сообществ нематод [Yeates et al., 1994; Georgieva et al., 2002; Груздева и др., 2003; Sánchez-Moreno, Navas, 2007; Pen-Mouratov et al., 2008], половая и возрастная структура популяций [Vranken, Heip, 1986;

Kammenga et al., 1996; Camargo et al., 1998; Anderson et al., 2001].

Часть видов нематод являются фитопаразитами (облигатными или факультативными). Питаясь за счет живых тканей, они влияют на рост, развитие, продуктивность растений. Обычно численность паразитических организмов в природных ненарушенных экосистемах не вызывает заметного угнетения хозяев. Однако в условиях значительной антропогенной трансформации окружающей среды наблюдается повышение численности паразитических организмов по сравнению с естественным фоном. Проведенные ранее исследования выявили структурные перестройки в сообществах нематод, проявляющиеся в возрастании численности популяций паразитических видов в условиях сильного загрязнения почвы свинцом (превышение ПДК в 60 раз) [Сущук, Груздева, 2011, 2012]. Данная тенденция была отмечена и в агроценозах: при повышенном содержании тяжелых металлов в пахотных почвах возрастала численность узкоспециализированного паразита – картофельной цистообразующей нематоды [Сущук, 2009].

Целью данной работы является экспериментальное изучение таксономического разнообразия и сезонной динамики некоторых популяционных характеристик нематод-фитотрофов под воздействием высоких доз солей тяжелых металлов (цинка и свинца).

Материалы и методы

Эксперимент по изучению влияния солей тяжелых металлов на группу нематод-фитотрофов проводился в условиях вегетационного опыта на территории Агробиологической станции Института биологии КарНЦ РАН (окрестности г. Петрозаводска, 61°45'07,06" с. ш., 34°21'11,85" в. д.). Бетонные кольца (d = 120 см, глубина 50 см) были разделены на две половины: контроль I и опыт I, Zn; контроль II и опыт II, Pb. Почва дерново-подзолистая легкосуглинистая, слабокислая (pH_{KCl} 5,23),

содержание P_2O_5 – 37,1 мг/100 г почвы, K_2O – 1,47 мг/100 г почвы, обеспеченность гумусом – 2,85 %. В опытные варианты (начало мая) вносили соли тяжелых металлов (серноокислый цинк и азотнокислый свинец) в высоких дозах. Уровень смоделированного загрязнения на порядок превышал ПДК элементов: опыт I, $ZnSO_4$ – 2500 мг/кг почвы (или 1012 мг/кг цинка); опыт II, $Pb(NO_3)_2$ – 500 мг/кг почвы (313 мг/кг свинца). ПДК Zn – 100 мг/кг, фон по РК – 38 мг/кг; ПДК Pb – 32 мг/кг, фон по РК – 5 мг/кг [Федорец, Медведева, 2005; Соколова и др., 2006; Семенова и др., 2015]. Остаточная концентрация цинка и свинца в почве была определена в июне и сентябре. После внесения в почву тяжелых металлов был произведен посев семян многолетнего злака – овсяницы красной (*Festuca rubra* L.). Отбор почвенных образцов на нематофауну проводили ежемесячно в течение вегетационного периода (апрель–сентябрь) в 5-кратной повторности. Нематод выделяли по модифицированному методу Бермана с экспозицией 48 ч, фиксация – ТАФом (триэтаноламин : формалин : вода в соотношении 2 : 7 : 91). Идентификацию нематод до рода проводили на временных глицериновых микропрепаратах с учетом количества личинок, самок и самцов. Каждый таксон нематод относили к одной из шести эколого-трофических групп согласно классификации Йейтса с соавт. [Yeates et al., 1993]. В рамках данной работы изучены две трофические группы: нематоды, ассоциированные с растениями (*Аср*), способные питаться как за счет эпидермальных клеток корней, так и содержимым гифов грибов, и паразиты растений (*Пр*), имеющие более тесный контакт с растениями и использующие растительную ткань для прохождения жизненного цикла. Нематоды *Аср* и *Пр* были объединены под термином «фитотрофы» как факультативные и облигатные фитотрофы соответственно.

В качестве оценочных показателей в данной работе использованы: 1) численность (плотность популяций) нематод-фитотрофов в целом и по отдельным группам, экз./100 г почвы; 2) соотношение численности нематод, ассоциированных с растениями, к численности нематод – паразитов растений, *Аср/Пр*; 3) таксономическое разнообразие нематод-фитотрофов (количество родов, встречаемость); 4) возрастная структура популяций нематод на основе соотношения личинок и половозрелых особей (самок и самцов). Для определения статистически значимых различий между исследованными параметрами использовали непараметрический тест (Краскел–Уоллис). Различия считались достоверными при 95-процентном

уровне значимости ($p < 0,05$). Для оценки взаимодействия факторов среды (соли тяжелых металлов и сроки анализа фауны) и их влияния на признаки нематод-фитотрофов (численность таксонов) проводили ординацию проб методом главных компонент. Все статистические анализы выполнены при помощи программы PAST 1.68 [Hammer et al., 2001].

Определение тяжелых металлов (*ТМ*) в почвенных образцах выполнено методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии в аналитической лаборатории Института леса КарНЦ РАН. Для выполнения исследования использовано оборудование (микроскоп стереоскопический МСП-2, микроскоп Olympus серии CX41) Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН «Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера».

Результаты и обсуждение

Сезонная динамика общей численности нематод-фитотрофов и отдельных трофических групп

В течение вегетационного периода в контроле наблюдались изменения общей численности нематод, которые выражались в колебаниях значений с двумя пиками: весной (май) и в конце вегетационного периода (сентябрь) (рис. 1), связанные как с флуктуациями температуры и влажности почвы, так и с периодами физиологической активности растений-хозяев. Сходные данные по сезонной динамике плотности популяций фитотрофов были получены отечественными исследователями для фитопаразитических нематод Московской области [Романенко, 2000; Козырева, 2008] и для сообществ почвообитающих нематод в целом на примере Республики Коми [Кудрин, 2012]. По данным зарубежных исследователей (экспериментальные участки сельскохозяйственных полей, КНР), пики численности фитопаразитических нематод отмечались в июле [Jiang et al., 2013] и августе [Fan-Xiang et al., 2006].

Загрязнение среды обитания тяжелыми металлами не оказывало влияния на сезонный характер динамики численности нематод-фитотрофов; изменения коснулись только количественных показателей: в начале вегетационного периода наблюдалось повышение численности нематод, а в конце сезона – ее снижение по сравнению с контролем (см. рис. 1). Это обусловлено различной реакцией групп нематод на загрязнение. В условиях

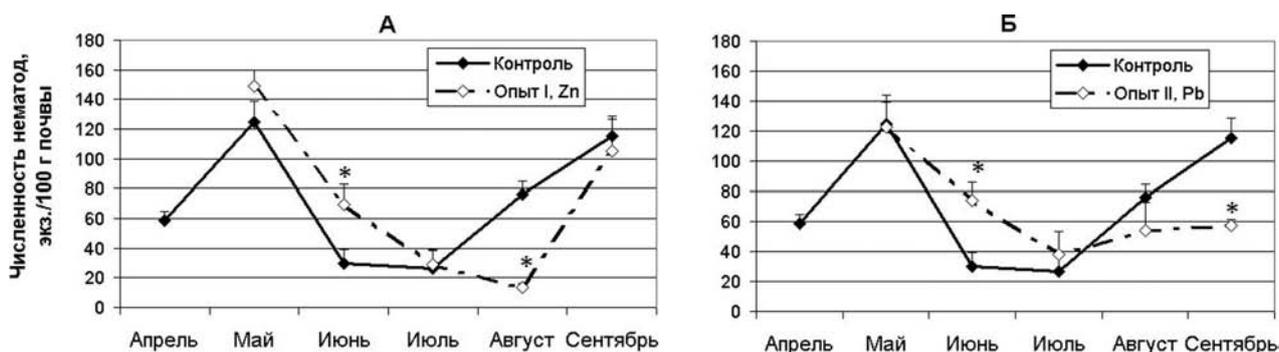


Рис. 1. Динамика численности нематод-фитотрофов в контроле и при внесении солей цинка (А) и свинца (Б) (сплошная линия – контроль, пунктирная линия – опыт).

* Здесь и на рис. 2 и 3: различия статистически значимы по отношению к контролю ($p < 0,05$).

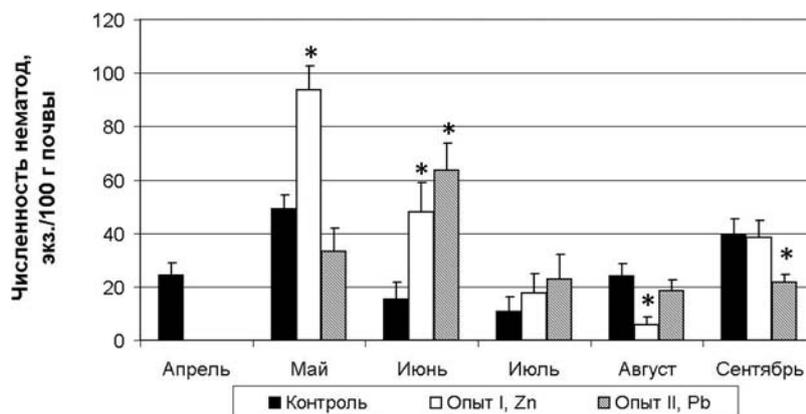


Рис. 2. Динамика численности нематод – паразитов растений в контроле и при внесении солей цинка и свинца в течение вегетационного периода.

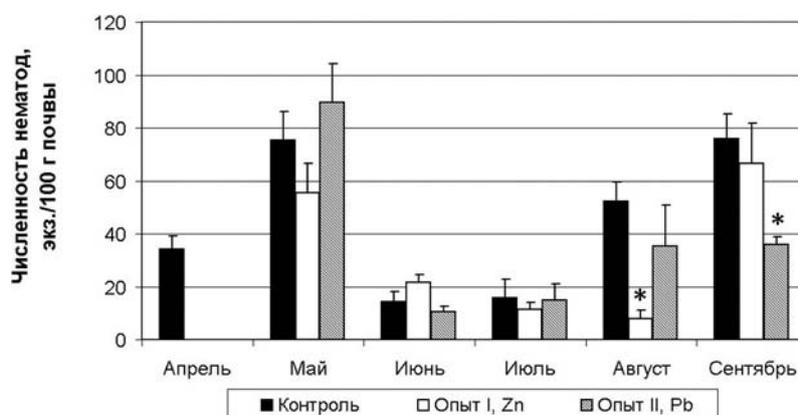


Рис. 3. Динамика численности нематод, ассоциированных с растениями, в контроле и при внесении солей цинка и свинца в течение вегетационного периода.

опыта нематоды – паразиты растений *Pr* показали как достоверное увеличение, так и снижение плотности популяций по сравнению с контролем (рис. 2). Для нематод, ассоциированных с растениями, *Asp*, статистически значимым оказалось только снижение численности в конце вегетационного периода (рис. 3).

Особенности действия солей тяжелых металлов выражались в различных сроках

наступления максимальной и минимальной численности фитотрофов. Так, пик численности *Pr* приходился на май в опыте с цинком и на июнь в опыте со свинцом (см. рис. 2). Минимальная плотность популяций обеих групп фитотрофов наблюдалась в августе в опыте с цинком и в сентябре в опыте со свинцом (см. рис. 2 и 3).

Учитывая изменения, происходящие в комплексе нематод-фитотрофов под действием

Таблица 1. Влияние ТМ на соотношение численности нематод, ассоциированных с растениями, к численности нематод – паразитов растений (*Аср/Пр*) в течение вегетационного периода

Вариант	Сроки отбора проб					
	Апрель	Май	Июнь	Июль	Август	Сентябрь
Контроль	1,3	1,6	1,5	1,7	2,8	2,0
Опыт I, Zn	–	0,7	0,4	0,5	1,3	1,8
Опыт II, Pb	–	2,8	0,2	0,7	1,9	1,6

Таблица 2. Начальная и остаточная концентрация тяжелых металлов в течение вегетационного периода (мг/кг почвы)

Вариант	Концентрация ТМ в почве, мг/кг		
	Начало мая	Июнь	Сентябрь
Контроль, Zn	35,0 ± 8,4	33,0 ± 7,9	39,0 ± 9,4
Контроль, Pb	14,0 ± 4,5	16,0 ± 5,1	7,0 ± 2,2
Опыт I, Zn	1012,0 ± 242,9 (2500*)	1040,0 ± 249,6	1320,0 ± 316,8
Опыт II, Pb	313,0 ± 100,2 (500*)	146,0 ± 46,7	127,0 ± 40,6

Примечание. Погрешность методики выполнения измерений для цинка – 24 %, для свинца – 32 % (при $p < 0,05$). * Концентрации солей цинка и свинца, вносимых в почву в начале опыта.

солей ТМ, было проанализировано соотношение численности нематод *Аср/Пр* в контроле и опыте. Установлено, что в контроле *Аср* преобладали над *Пр*: значения соотношения варьировали от 1,3 до 2,8 (табл. 1). Повышение плотности популяций паразитических нематод через 3–7 недель после внесения поллютантов в почву (см. рис. 2) приводило к изменению данного соотношения: цифровые значения становились меньше единицы, что указывает на преобладание паразитов растений *Пр* над *Аср*. Исключение составляет вариант опыта со свинцом (май): на значении соотношения отразилось статистически недостоверное повышение численности нематод *Аср* и снижение *Пр* по сравнению с контролем. В августе–сентябре соотношение *Аср/Пр* увеличивалось, возвращаясь к показателям, свойственным контролю (см. табл. 1). Это свидетельствует о кратковременном влиянии однократного внесения тяжелых металлов на нематод-фитотрофов. Таким образом, наиболее заметная ответная реакция на ТМ проявилась у группы нематод – паразитов растений и в сроки, наиболее близкие к датам внесения веществ в почву. Как показал анализ содержания цинка и свинца, после максимальных начальных доз концентрация элементов снижалась (свинец) или оставалась на постоянном уровне (цинк) до конца сезона вегетации (табл. 2).

В литературе имеются сведения, указывающие на явное преобладание фитопаразитов в сообществах нематод при хроническом загрязнении почв ТМ. Так, в ходе мониторинговых наблюдений выявлено возрастание численности рода *Paratylenchus* в условиях сильного загрязнения почвы промышленной зоны свинцом (превышение ПДК в 60 раз) [Суцук,

Груздева, 2011, 2012]. Сходные закономерности наблюдались в пахотных почвах: на картофельных полях в черте города Петрозаводска было показано доминирование нематод – паразитов растений (40,9 %) при загрязнении почвы Pb (1,6 ПДК). Среди данной трофической группы особенно выделялся род *Paratylenchus*, который имел самый высокий процент в фауне (21,1 %) [Diyeva et al., 2013].

Таксономическое разнообразие нематод-фитотрофов. Оценка влияния взаимодействующих факторов среды (тяжелые металлы и сроки отбора проб) на численность отдельных таксонов нематод

Разнообразие нематод-фитотрофов в контрольных и опытных почвенных образцах представлено 11 таксонами, среди которых 5 родов являются нематодами, ассоциированными с растениями, и 6 – фитопаразитами (табл. 3). В списке паразитов растений выявлены полигостальные корневые эктопаразиты (нематоды рр. *Paratylenchus*, *Tylenchorhynchus*, *Helicotylenchus*, сем. Trichodoridae), мигрирующие (*Pratylenchus*) и седентарные (*Heterodera*) эндопаразиты.

В контрольных пробах встречаемость нематод-фитотрофов составляла 100 %, независимо от месяца отбора, за исключением р. *Lelenchus* (*Аср*) и представителей семейства Trichodoridae (*Пр*). В опытных вариантах наблюдалось исчезновение таксонов нематод в отдельные сроки наблюдений, и в большей степени снижение таксономического разнообразия отмечено для нематод *Аср*, чем для *Пр* (табл. 3).

Таблица 3. Таксономическое разнообразие нематод-фитотрофов в эксперименте с внесением соли цинка и свинца в течение вегетационного периода

Таксон	Исходная фауна, апрель	Контроль*	Опыт I, Zn*	Опыт II, Pb*
Нематоды, ассоциированные с растениями				
<i>Aglenchus</i>	+	+++++	+++++	+++++
<i>Filenchus</i>	+	+++++	+++ - +	+++ - +
<i>Coslenchus</i>	+	+++++	+ - - + +	+++++
<i>Lelenchus</i>	-	- + + + -	- - - - -	- - - - -
<i>Tylenchus</i>	+	+++++	- + + + +	- - + + +
	4	4/5/5/5/4	3/3/3/3/4	3/3/4/3/4
Нематоды – паразиты растений				
<i>Pratylenchus</i>	+	+++++	+++++	+++++
<i>Paratylenchus</i>	+	+++++	- + + + +	+ - - + +
<i>Tylenchorhynchus</i>	+	+++++	+ + - + +	- + + - +
<i>Helicotylenchus</i>	+	+++++	- + + - +	+++++
<i>Heterodera</i>	+	+++++	+ + + - +	+ + + - +
Trichodoridae	+	+ - - - -	- - - - -	- + - - -
	6	6/5/5/5/5	3/5/4/3/5	4/5/4/3/5

Примечание. «+/-» – присутствие/отсутствие таксона в пробе; *данные о присутствии/отсутствии таксонов в течение вегетационного периода в следующей последовательности: май, июнь, июль, август, сентябрь.

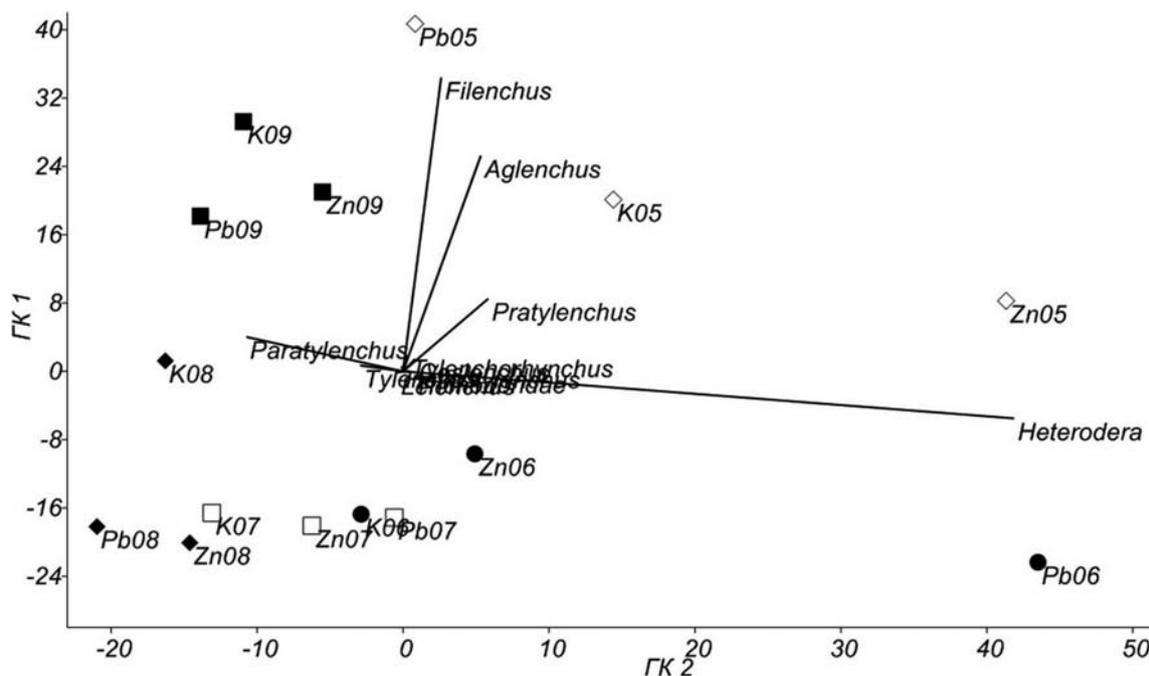


Рис. 4. Ординация почвенных проб, отобранных в контроле и в вариантах опыта с солями свинца и цинка, на основе численности выявленных таксонов нематод-фитотрофов с учетом сезонной динамики.

Первая и вторая главные компоненты (ГК1 и ГК2) объясняют 84,9 % различий. Обозначения проб: Pb – эксперимент с солью свинца, Zn – с солью цинка, K – контрольный вариант; сроки отбора проб – май (05, ◇), июнь (06, ●), июль (07, □), август (08, ◆), сентябрь (09, ■)

Низкая встречаемость нематод семейства Trichodoridae в контроле, и в опыте может быть обусловлена рядом причин. Во-первых, триходориды предпочитают более глубокие (30–40 см) слои почвы по сравнению с другими паразитическими видами. Во-вторых, как более крупные нематоды, они характеризуются малой двигательной активностью, и в процессе

выделения из почвы методом, основанным на подвижности особей, они могли быть не обнаружены [van Bezooijen, 2006].

Ординация проб методом главных компонент для оценки взаимодействия факторов среды и их влияния на численность нематод-фитотрофов позволила выявить таксоны, численность которых претерпевала наибольшие

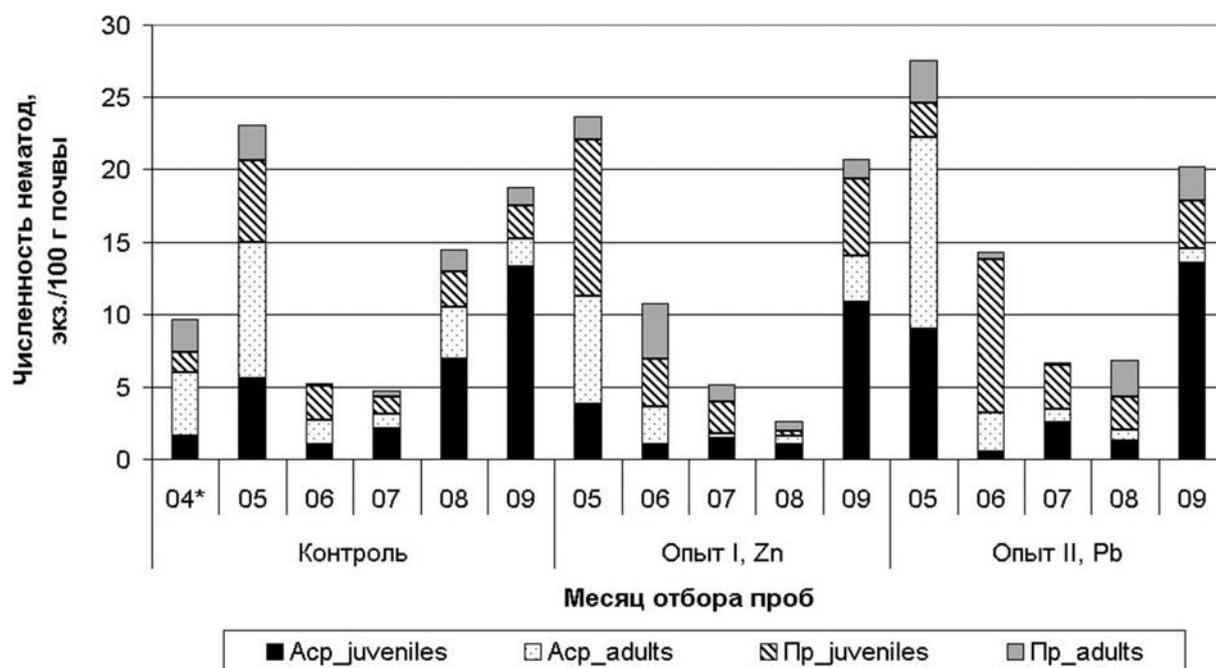


Рис. 5. Изменения численности ювенильных (juveniles) и половозрелых (adults) особей нематод-фитотрофов в контроле и эксперименте под воздействием солей тяжелых металлов с учетом сезонной динамики. Аср – нематоды, ассоциированные с растениями, Пр – паразиты растений; * – исходная фауна нематод.

колебания в зависимости от воздействия солей ТМ и сезона отбора почвенных образцов. Вдоль первой главной компоненты (45,9 % дисперсии) контрольные и опытные пробы, отобранные в мае и сентябре, сформировали отдельную группу на основе высокой численности нематод родов *Aglenchus* и *Filenchus* (Аср) (рис. 4). С другой стороны, в пробах июня, июля и августа резких колебаний численности нематод Аср не выявлено. Различия между пробами вдоль второй главной компоненты обусловлены плотностью популяций паразитических нематод родов *Heterodera* и *Paratylenchus* (39,0 % дисперсии). В отношении гетеродерид показано, что фактор загрязнения почвы ТМ наряду со сроком отбора проб определяет высокую численность таксона (варианты Zn05 и Pb06 объединены в обособленную группу). Такая сезонная динамика численности характерна для группы седентарных эндопаразитов, к которой относится *Heterodera*. Пробы контроля и опыта, собранные в августе и сентябре, группируются в связи с высокой численностью представителей р. *Paratylenchus* (см. рис. 4).

Таким образом, данные компонентного анализа показали, что особенности колебаний численности таксонов нематод-фитотрофов зависят в большей степени от сроков отбора проб, чем от воздействия солей тяжелых металлов.

Сезонная динамика возрастной структуры популяций нематод-фитотрофов в условиях загрязнения почвы тяжелыми металлами

Расчет средних значений численности личинок и половозрелых особей таксонов нематод двух трофических групп, Аср и Пр, позволил проанализировать возрастную структуру популяций фитотрофов. Различия численности всех возрастных групп между контролем и вариантами опыта статистически незначимы в связи с высоким уровнем варьирования значений. Однако данные позволили выявить некоторые тенденции сезонной динамики возрастных групп. В популяциях нематод Аср весной (май) преобладали взрослые особи, а в сентябре – личинки (рис. 5). Полученный тренд формируют представители родов *Aglenchus* и *Filenchus*, наиболее многочисленные в почве. Среди паразитов растений Пр пик численности ювенильных особей отмечен в мае (контроль, опыт I, Zn) и июне (опыт II, Pb) благодаря нематодам рода *Heterodera* (см. рис. 5), седентарным эндопаразитам, у которых наблюдается массовый выход личинок из цист в начале жизненного цикла. В августе и сентябре в почве встречаются личинки фитопаразитов других таксонов: *Paratylenchus*, *Pratylenchus*, *Tylenchorhynchus*. Взрослые особи фитопаразитических нематод были представлены в основном двумя родами (*Paratylenchus*, *Pratylenchus*) и имели низкую

численность в почве. Полученные результаты соответствуют литературным данным, согласно которым популяционный рост видов нематод-эктопаразитов сопровождается высокой долей взрослых особей в весенний и раннелетний период и увеличением плотности личинок в конце лета [Verschoor et al., 2001]. В нашем исследовании данная закономерность отмечена и для ассоциированных с растениями нематод (см. рис. 5). Анализ возрастной структуры фитотрофов дает основания полагать, что колебания численности популяций нематод разных возрастных групп связаны в большей степени с естественной сезонной динамикой, присущей видам, чем с воздействием солей тяжелых металлов.

Заключение

Результаты эксперимента с однократным внесением в почву солей свинца и цинка показали, что *ТМ* оказывали наибольшее воздействие на общую численность нематод-фитотрофов: наблюдалось повышение количества особей в краткосрочный период после внесения *ТМ* в почву, в основном за счет группы *Пр*, и снижение численности *Аср* и *Пр* в конце вегетационного периода. Установлено небольшое снижение таксономического разнообразия в опытных вариантах в отдельные сроки наблюдений. Такие популяционные характеристики, как сезонная динамика численности и возрастная структура, не изменялись под воздействием *ТМ*.

Увеличение численности *Пр* в опытных вариантах обусловлено рядом причин. Вероятно, это связано с фактором загрязнения опосредованно, через растение: фитопаразиты зависят от корней растений, поэтому нельзя ожидать их быстрой реакции на нарушение среды обитания. Кроме того, виды отряда Tylenchida характеризуются низкой проницаемостью кутикулы [Парамонов, 1962]. По другой гипотезе, увеличение численности паразитов растений связано с подавлением или полной элиминацией некоторых их антагонистов (симбиотических бактерий и грибов-микоризообразователей) либо большей уязвимостью растений для нематод в условиях загрязнения почвы [Georgieva et al., 2002]. В литературе имеются сведения, указывающие на высокую устойчивость трофической группы нематод – паразитов растений к загрязнению целым рядом тяжелых металлов (*As*, *Pb*, *Cd*, *Cu*, *Ni*, *Zn*, *Cr*), которая выражается в доминировании фитопаразитов в структуре сообществ почвенных нематод [Хотько и др., 1982; Yeates et al., 1994; Georgieva et al., 2002;

Sánchez-Moreno, Navas, 2007; Pen-Mouratov et al., 2008]. В нашем исследовании это подтверждается значениями соотношения *Аср/Пр* в летний период. К концу сезона показатели становились сходными с контролем, что указывает на кратковременный характер последствий внесения солей *ТМ*. Снижение численности *Аср* и *Пр* под воздействием *ТМ* в конце вегетационного периода указывает на необходимость анализа фауны нематод-фитотрофов на следующий сезон для определения долгосрочного влияния однократного загрязнения почвы тяжелыми металлами.

Установлены особенности действия солей тяжелых металлов: опытные варианты различались между собой сроками наступления пиков численности *Пр*, минимальной плотности *Аср* и обилием отдельных таксонов. Так, в опыте с *Zn* максимальная численность личинок р. *Heterodera* приходилась на май, в опыте с *Pb* – на июнь.

Использование метода главных компонент позволило выразить силу влияния взаимодействующих факторов среды (*ТМ* и вегетационный период) на численность нематод-фитотрофов. Установлено, что только для одного таксона *Пр* (*Heterodera*) загрязнение почвы *ТМ* было более значимым фактором, чем сезон отбора проб. В остальных случаях таксоны показали группирование по срокам отбора почвенных образцов, что свидетельствует о меньшей зависимости нематод-фитотрофов от воздействия тестируемых поллютантов, чем от абиотических (колебания температуры и влажности почвы) и биотических (физиологическая активность растений-хозяев) факторов.

Таким образом, изменения популяционных характеристик нематод-фитотрофов под воздействием однократного внесения *ТМ* в почву носили кратковременный характер. Климатический фактор является ведущим в распределении и активности нематод-фитотрофов.

Исследования выполнены в рамках государственного задания (тема № 0221-2014-0004) и частично поддержаны РФФИ (№ 15-04-07675_a).

Литература

Груздева Л. И., Матвеева Е. М., Коваленко Т. Е. Влияние солей тяжелых металлов на сообщества почвенных нематод // Почвоведение. 2003, № 5. С. 596–606.

Козырева Н. И. Нематоды семейства Trichodoridae и их роль в распространении вирусных болезней

на картофеле в Московской области: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2008. 24 с.

Кудрин А. А. Разнообразие и экология почвенных нематод в пойменных экосистемах подзон средней и северной тайги Республики Коми: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Сыктывкар, 2012. 23 с.

Парамонов А. А. Основы фитогельминтологии / Отв. ред. К. И. Скрябин. Т. 1. М.: Наука, 1962, 480 с.

Романенко Е. Н. Фауна почвенных нематод и почвенно-экологические закономерности их распространения: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2000. 27 с.

Семенова И. Н., Биктимерова Г. Я., Ильбулова Г. Р., Исанбаева Г. Т. Содержание тяжелых металлов в почве окрестностей карьеров Челябинской области // Современные проблемы науки и образования, 2015, № 2. URL: www.science-education.ru/122-18973 (дата обращения: 27.10.2015).

Соколова О. Я., Стряпков А. В., Антимонов С. В., Соловых С. Ю. Влияние техногенного воздействия на содержание валовых и подвижных форм тяжелых металлов в почвах // Вестник Оренбургского государственного университета. Естественные и технические науки. 2006. № 2. Т. 2. С. 35–42.

Строганова М. Н., Мягкова А. Д., Прокофьева Т. В. Городские почвы: генезис, классификация, функции // Почва, город, экология / Ред. Г. В. Добровольский. М.: Фонд «За экономическую грамотность», 1997. С. 15–88.

Суцук А. А. Почвенные нематоды трансформированных экосистем Карелии: дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 2009. С. 93–95.

Суцук А. А., Груздева Л. И. Влияние техногенного загрязнения промышленных центров Карелии на сообщества почвенных нематод // Известия ПГПУ им. В. Г. Белинского. 2011. № 25. С. 441–448.

Суцук А. А., Груздева Л. И. Сообщества почвенных нематод в условиях загрязнения среды тяжелыми металлами // Ученые записки ПетрГУ. Серия Естественные и технические науки. 2012. № 4 (125). С. 29–32.

Титов А. Ф., Казнина Н. М., Таланова В. В. Тяжелые металлы и растения / Ред. Н. Н. Немова. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2014. 194 с.

Федорец Н. Г., Медведева М. В. Эколого-микробиологическая оценка состояния почв города Петрозаводска / Ред. О. Н. Бахмет. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2005. 96 с.

Хотько Э. И., Ветрова С. Н., Матвеевко А. А., Чумаков Л. С. Почвенные беспозвоночные и промышленное загрязнение / Ред. М. С. Гиляров. Минск: Наука и техника, 1982. 264 с.

Anderson G. L., Boyd W. A., Williams P. L. Assessment of sublethal endpoints for toxicity testing with the nematode *Caenorhabditis elegans* // Environmental Toxicology and Chemistry. 2001. Vol. 20. P. 833–838.

van Bezooijen J. Methods and techniques for nematology. Wageningen: The Netherlands, Wageningen University Press, 2006. 112 p.

Bongers T. The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition // Oecologia. 1990. Vol. 83. P. 14–19.

Bongers T., Ilieva-Maculec K., Ekschmitt K. Acute sensitivity of nematode taxa to CuSO₄ and relationships with feeding-type and life-history classification // Environmental Toxicology and Chemistry. 2001. Vol. 20, No 7. P. 1511–1516.

Camargo J. A., Nombela G., Muniz M., Navas A. Age specific sensitivity of the nematode *Aphelenchus avenae* to mercury toxicity // Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 1998. Vol. 61. P. 149–153.

Diyeva D. S., Matveeva E. M., Sushchuk A. A. Soil nematode communities of potato crop under heavy metal pollution // Russian Journal of Nematology. 2013. Vol. 21 (2). P. 145.

Ettema C. H., Bongers T. Characterization of nematode colonization and succession in disturbed soil using the Maturity Index // Biology & Fertility of Soils. 1993. Vol. 16. P. 193–209.

Fan-Xiang M., Wei O., Qi L., Yong J., Da-Zhong W. Vertical distribution and seasonal fluctuation of nematode trophic groups as affected by land use // Pedosphere. 2006. Vol. 16 (2). P. 169–176.

Ferris H., Bongers T., de Goede R. G. M. A framework for soil food web diagnostics: extension of the nematode faunal analysis concept // Applied Soil Ecology. 2001. Vol. 18. P. 13–29.

Georgieva S. S., McGrath S. P., Hooper D. J., Chambers B. S. Nematode communities under stress: the long-term effects of heavy metals in soil treated with sewage sludge // Applied Soil Ecology. 2002. Vol. 20. P. 27–42.

Hammer Ø., Harper D. A. T., Ryan P. D. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis // Paleontological Electronica. 2001. 4 (1). 9 p. (http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm).

Jiang C., Sun B., Li H., Jiang Y. Determinants for seasonal change of nematode community composition under long-term application of organic manure in an acid soil in subtropical China // European Journal of Soil Biology. 2013. Vol. 55. P. 91–99.

Kammenga J. E., Busschers M., van Straalen N. M. et al. Stress induced fitness reduction is not determined by the most sensitive life-cycle trait // Functional Ecology. 1996. Vol. 10. P. 106–111.

Pen-Mouratov S., Shukurov N., Steinberger Y. Influence of industrial heavy metal pollution on soil free-living nematode population // Environmental Pollution. 2008. Vol. 152. P. 172–183.

Sánchez-Moreno S., Navas A. Nematode diversity and food web condition in heavy metal polluted soils in a river basin in southern Spain // European Journal of Soil Biology. 2007. Vol. 43. P. 166–179.

Verschoor B. C., De Goede R. G., De Hoop J.-W., De Vries F. W. Seasonal dynamics and vertical distribution of plant-feeding nematode communities in grasslands // Pedobiologia. 2001. Vol. 45, iss. 3. P. 213–233.

Vranken G., Heip C. Toxicity of copper, mercury and lead to a marine nematode // Marine Pollution Bulletin. 1986. Vol. 17. P. 453–457.

Wasilewska L. Soil invertebrates as bioindicators, with special reference to soil-inhabiting nematodes // Russian Journal of Nematology. 1997. Vol. 5, No 2. P. 113–126.

Yeates G. W., Bongers T., de Goede R. G. M. et al. Feeding habits in soil nematode families and genera: An outline for soil ecologists // *J. of Nematology*. 1993. Vol. 25, No 3. P. 315–331.

Yeates G. W., Orchard V. A., Speir T. W. et al. Impact of pasture contamination by copper, chromium, arsenic

timber preservative on soil biological activity // *Biol. Fertil. Soils*. 1994. Vol. 18. P. 200–208.

Поступила в редакцию 05.10.2015

References

Fedorets N. G., Medvedeva M. V. Jekologo-mikrobiologičeskaja ocenka sostojanija pochv goroda Petrozavodskaja [Ecological and microbiological assessment of the soil state in the city of Petrozavodsk]. Ed. O. N. Bahmet. Petrozavodsk: KarRC of RAS, 2005. 96 p.

Gruzdeva L. I., Matveeva E. M., Kovalenko T. E. The effect of heavy metal salts on soil-inhabiting nematode communities. *Eurasian Soil Science*. Vol. 36, No 5. 2003. P. 536–545. Translated from *Pochvovedenie*. No 5. 2003. P. 596–606.

Hot'ko Je. I., Vetrova S. N., Matveenko A. A., Chumakov L. S. Pochvennye bespozvonochnye i promyshlennoe zagrjaznenie [Soil invertebrates and industrial pollution]. Ed. M. S. Giljarov. Minsk: Nauka i tehnika, 1982. 264 p.

Kozyreva N. I. Nematody semejstva Trichodoridae i ih rol' v rasprostranении virusnyh boleznej na kartofele v Moskovskoj oblasti [Nematodes of the family Trichodoridae and their role in the spread of viral diseases of potatoes in Moscow region]: PhD Diss. (Biol.). Moscow, 2008. 24 p.

Kudrin A. A. Raznoobrazie i jekologija pochvennyh nematod v pojmyennyh jekosistemah podzon srednej i severnoj tajgi Respubliki Komi [Diversity and ecology of soil nematodes in floodplain ecosystems of the middle and north taiga subzones of the Komi Republic]: PhD Diss. (Biol.). Syktyvkar, 2012. 23 p.

Paramonov A. A. Osnovy fitogel'mintologii [Fundamentals of Phytohelminthology]. Ed. K. I. Skrjabin. Vol. I. Moscow: Nauka, 1962, 480 p.

Romanenko E. N. Fauna pochvennyh nematod i pochvenno-jekologičeskije zakonomernosti ih rasprostraneniya [Soil nematode fauna and soil-environmental regularities of their distribution]: PhD Diss. (Biol.). Moscow, 2000. 27 p.

Semenova I. N., Biktimerova G. Ja., Il'bulova G. R., Isanbaeva G. T. Soderzhanie tjazhelyh metallov v pochve okrestnostej kar'erov Cheljabinskij oblasti [Contents of heavy metals in soil around quarries of Chelyabinsk region]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija* [Modern problems of science and education]. 2015. No 2. URL: www.science-education.ru/122-18973 (accessed: 27.10.2015).

Sokolova O. Ja., Strjapkov A. V., Antimonov S. V., Solovyh S. Ju. Vlijanie tehnogennogo vozdejstvija na soderzhanie valovyh i podviznyh form tjazhelyh metallov v pochvah [Influence of man-caused impact on content of gross and active forms of heavy metals in soil]. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta* [Vestnik of the Orenburg State University]. 2006. No 2. Vol. 2. P. 35–42.

Stroganova M. N., Mjagkova A. D., Prokof'eva T. V. Gorodskie pochvy: genezis, klassifikacija,

funkcii. In: Pochva, gorod, jekologija [Urban soils: genesis, classification, and functions. Soil, city, ecology]. Ed. G. V. Dobrovol'skij. Moscow: Fond «Za jekonomičeskiju gramotnost'», 1997. P. 15–88.

Sushchuk A. A. Pochvennye nematody transformirovannyh jekosistem Karelii [Soil nematodes of transformed ecosystems in Karelia]: PhD Diss. (Biol.). Petrozavodsk, 2009. P. 93–95.

Sushchuk A. A., Gruzdeva L. I. Soobshhestva pochvennyh nematod v uslovijah zagrjaznenija sredy tjazhelymi metallami [Soil nematode communities under heavy metal pollution]. *Uchenye zapiski PetrGU. Serija Estestvennye i tehničeskije nauki* [Proceedings of PetrSU. Ser. Natural and engineering sciences]. 2012. No 4 (125). P. 29–32.

Sushchuk A. A., Gruzdeva L. I. Vlijanie tehnogennogo zagrjaznenija promyshlennyh centrov Karelii na soobshhestva pochvennyh nematod [Effect of anthropogenic pollution of the Karelian industrial centres on the soil nematode communities]. *Izvestija PGPU im. V. G. Belinskogo* [Proceedings of PGPU named after V. G. Belinsky]. 2011. No 25. P. 441–448.

Titov A. F., Kaznina N. M., Talanova V. V. Tjazhelye metally i rastenija [Heavy metals and plants]. Ed. N. N. Nemova. Petrozavodsk: KarRC of RAS, 2014. 194 p.

Anderson G. L., Boyd W. A., Williams P. L. Assessment of sublethal endpoints for toxicity testing with the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2001. Vol. 20. P. 833–838. doi: 10.1002/etc.5620200419.

van Bezooijen J. Methods and techniques for nematology. Wageningen: The Netherlands: Wageningen University Press, 2006. 112 p.

Bongers T. The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia*. 1990. Vol. 83. P. 14–19. doi: 10.1007/BF00324627.

Bongers T., Ilieva-Maculec K., Ekschmitt K. Acute sensitivity of nematode taxa to CuSO₄ and relationships with feeding-type and life-history classification. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2001. Vol. 20, No 7. P. 1511–1516. doi: 10.1002/etc.5620200714.

Camargo J. A., Nombela G., Muniz M., Navas A. Age specific sensitivity of the nematode *Aphelenchus avenae* to mercury toxicity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1998. Vol. 61. P. 149–153. doi: 10.1007/PL00002972.

Diyeva D. S., Matveeva E. M., Sushchuk A. A. Soil nematode communities of potato crop under heavy metal pollution. *Russian Journal of Nematology*. 2013. Vol. 21 (2). P. 145.

Ettema C. H., Bongers T. Characterization of nematode colonization and succession in disturbed soil using

the Maturity Index. *Biology & Fertility of Soils*. 1993. Vol. 16. P. 193–209. doi: 10.1007/BF00369407.

Fan-Xiang M., Wei O., Qi L., Yong J., Da-Zhong W. Vertical distribution and seasonal fluctuation of nematode trophic groups as affected by land use. *Pedosphere*. 2006. Vol. 16 (2). P. 169–176. doi: 10.1016/S1002-0160(06)60040-4.

Ferris H., Bongers T., de Goede R. G. M. A framework for soil food web diagnostics: extension of the nematode faunal analysis concept. *Applied Soil Ecology*. 2001. Vol. 18. P. 13–29. doi: 10.1016/S0929-1393(01)00152-4.

Georgieva S. S., McGrath S. P., Hooper D. J., Chambers B. S. Nematode communities under stress: the long-term effects of heavy metals in soil treated with sewage sludge. *Applied Soil Ecology*. 2002. Vol. 20. P. 27–42. doi: 10.1016/S0929-1393(02)00005-7.

Hammer Ø., Harper D. A. T., Ryan P. D. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontological Electronica*. 2001. 4 (1). 9 p. (http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm).

Jiang C., Sun B., Li H., Jiang Y. Determinants for seasonal change of nematode community composition under long-term application of organic manure in an acid soil in subtropical China. *European Journal of Soil Biology*. 2013. Vol. 55. P. 91–99. doi: 10.1016/j.ejsobi.2012.11.003.

Kammenga J. E., Busschers M., van Straalen N. M., Jepson P. C., Bakker J. Stress induced fitness reduction is not determined by the most sensitive life-cycle trait. *Functional Ecology*. 1996. Vol. 10. P. 106–111. doi: 10.2307/2390268.

Pen-Mouratov S., Shukurov N., Steinberger Y. Influence of industrial heavy metal pollution on soil free-living nematode population. *Environmental Pollution*. 2008. Vol. 152. P. 172–183. doi: 10.1016/j.envpol.2007.05.007.

Sánchez-Moreno S., Navas A. Nematode diversity and food web condition in heavy metal polluted soils in a river basin in southern Spain. *European Journal of Soil Biology*. 2007. Vol. 43. P. 166–179. doi: 10.1016/j.ejsobi.2007.01.002.

Verschoor B. C., De Goede R. G., De Hoop J.-W., De Vries F. W. Seasonal dynamics and vertical distribution of plant-feeding nematode communities in grasslands. *Pedobiologia*. 2001. Vol. 45, iss. 3. P. 213–233. doi: 10.1078/0031-4056-00081.

Vranken G., Heip C. Toxicity of copper, mercury and lead to a marine nematode. *Marine Pollution Bulletin*. 1986. Vol. 17. P. 453–457. doi: 10.1016/0025-326X(86)90834-9.

Wasilewska L. Soil invertebrates as bioindicators, with special reference to soil-inhabiting nematodes. *Russian Journal of Nematology*. 1997. Vol. 5, No 2. P. 113–126.

Yeates G. W., Bongers T., de Goede R. G. M., Freckman D. W., Georgieva S. S. Feeding habits in soil nematode families and genera: An outline for soil ecologists. *J. of Nematology*. 1993. Vol. 25, No 3. P. 315–331.

Yeates G. W., Orchard V. A., Speir T. W., Hunt J. L., Hermans M. C. C. Impact of pasture contamination by copper, chromium, arsenic timber preservative on soil biological activity. *Biol. Fertil. Soils*. 1994. Vol. 18. P. 200–208. doi: 10.1007/BF00647667.

Received October 05, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Матвеева Елизавета Михайловна

старший научный сотрудник лаборатории паразитологии животных и растений, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: matveeva@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 783622

Сушук Анна Алексеевна

научный сотрудник лаборатории паразитологии животных и растений, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: anna_sushchuk@mail.ru
тел.: (8142) 762706

Калинкина Дарья Сергеевна

аспирант, младший научный сотрудник лаборатории паразитологии животных и растений
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: dania_22@mail.ru
тел.: (8142) 762706

CONTRIBUTORS:

Matveeva, Elizaveta

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: matveeva@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 783622

Sushchuk, Anna

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

Kalinkina, Darya

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: dania_22@mail.ru
tel.: (8142) 762706

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 581.823:582.632.1

СОДЕРЖАНИЕ РАСТВОРИМЫХ САХАРОВ В ТКАНЯХ СТВОЛА БЕРЕЗЫ, ОЛЬХИ И ОСИНЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ С ВВЕДЕНИЕМ ЭКЗОГЕННОЙ САХАРОЗЫ

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

Институт леса Карельского научного центра РАН

Ранее было показано, что формирование включений паренхимной ткани в древесине карельской березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica*) связано с высокой активностью апопластной инвертазы. Наши опыты с введением растворов экзогенной сахарозы (1,0; 2,5; 5,0; 10 %) в камбиальную зону обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) привели к росту активности апопластной инвертазы в области экспериментального воздействия. Активность фермента медленно возрастала с увеличением концентрации экзогенного раствора от 1 до 5 % и резко увеличилась в варианте с 10%-й сахарозой. Содержание сахарозы соответствовало этим данным: с ростом концентрации раствора от 1 до 5 % ее уровень поднимался и резко снизился при введении 10%-го раствора. При этой концентрации наблюдалось усиление паренхиматизации флоэмы и ксилемы: во флоэме заметно увеличилась доля паренхимных клеток, в ксилеме была сформирована толстая прослойка паренхимной ткани. Аналогичные опыты на стволах ольхи серой (*Alnus incana* (L.) Moench) и осины (*Populus tremula* L.) показали, что их реакция на введение дополнительной сахарозы отличается от реакции березы. У ольхи структурно-функциональных изменений клеток и тканей не наблюдалось. У осины соотношение структурных элементов проводящих тканей осталось прежним, но изменилось их функциональное состояние, о чем свидетельствовало увеличение доли паренхимных клеток с крупной центральной вакуолью. Сахароза в тканях ольхи и осины в эксперименте практически отсутствовала. Глюкоза была представлена в минимальных количествах, уровни фруктозы были существенно выше. Полученные данные свидетельствуют о способности ольхи и осины утилизировать большие количества сахарозы, не допуская ее аккумуляции в тканях ствола. Отсутствие у данных пород структурных нарушений флоэмы и ксилемы при введении высоких концентраций сахарозы может быть связано с этой способностью. В ходе дальнейших исследований предстоит выяснить причины быстрой утилизации сахарозы у осины и ольхи.

Ключевые слова: *Betula pendula* Roth; *Alnus incana* (L.) Moench; *Populus tremula* L.; флоэма; ксилема; содержание паренхимы; ферменты расщепления сахарозы; сахароза; глюкоза; фруктоза.

T. V. Tarelkina, L. L. Novitskaya, N. A. Galibina. THE CONTENT OF SOLUBLE SUGARS IN TRUNK TISSUES OF BIRCH, ALDER AND ASPEN IN AN EXPERIMENT WITH EXOGENOUS SUCROSE

It has been shown elsewhere that the formation of parenchyma tissue inclusions in the wood of Karelian birch (*Betula pendula* Roth var. *carelica*) is associated with high activity of apoplastic invertase. In our experiments with injection of sucrose solutions (1.0; 2.5; 5.0; 10 %) into the cambial zone of silver birch (*B. pendula* var. *pendula*) the activity of apoplastic invertase in the zone of experimental treatment also rose. The activity of this enzyme gradually increased with the rise in the sucrose solution concentration from 1 to 5 %, and sharply increased in the variant with 10 % sucrose. Sucrose content in tissues changed accordingly: its level rose as the sucrose concentration increased from 1 to 5 %, and decreased sharply in the variant with 10 % sucrose. At this concentration of exogenous sucrose a growth of parenchyma volume was observed: the proportion of parenchyma cells increased significantly in the phloem; a thick parenchyma layer formed in the xylem. Similar experiments performed on the trunks of alder (*Alnus incana* (L.) Moench) and aspen (*Populus tremula* L.) showed these species responded differently than birch. No signs of structural or functional changes were detected in alder tissues. The ratio of structural elements in conducting tissues in aspen remained the same but their functional state changed, as evidenced by an increase in the proportion of parenchyma cells with the large central vacuole. Aspen and alder tissues in the experiment contained practically no sucrose. Glucose was present in minor amounts, fructose levels were significantly higher. These data suggest that alder and aspen tissues can utilize large amounts of sucrose, not allowing its accumulation in trunk tissues. This may be the possible reason for the absence of structural deviations in phloem and xylem of these species in the variants with high sucrose concentration. The causes for rapid sucrose utilization in aspen and alder are yet to be investigated.

Key words: *Betula pendula* Roth; *Alnus incana* (L.) Moench; *Populus tremula* L.; phloem; xylem; parenchyma content; enzymes of sucrose breakdown; sucrose; glucose; fructose.

Введение

Характерный рисунок древесины карельской березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica*) создается за счет крупных включений паренхимной ткани. Клетки паренхимы в данном случае образуются вместо сосудов и волокнистых трахеид [Барильская, 1978]. Показано, что формирование структурных аномалий тканей ствола карельской березы связано с высокой активностью апопластной инвертазы [Галибина и др., 2015б].

Дифференцировку водопроводящих элементов древесины (ксилемы) определяет ауксин [Aloni, 2015]. Ингибирование их образования в ксилеме карельской березы свидетельствует об изменении гормонального статуса ткани. Предложен механизм, включающий участие продуктов апопластного расщепления сахарозы в инактивации ауксина (соответственно, в подавлении дифференцировки сосудов и трахеид) и стимуляции запасного метаболизма (соответственно, в образовании клеток паренхимы) [Новицкая, 2015].

Мы разработали эксперимент с введением растворов экзогенной сахарозы в камбиальную зону древесных растений [Novitskaya, Kushnir,

2006]. Он позволяет ожидать повышения активности апопластной инвертазы, поскольку в данном случае сахароза проникает вглубь тканей ствола предположительно по апопласту. Показано, что с увеличением концентрации экзогенного раствора (1,0; 2,5; 5,0; 10,0 %) степень паренхиматизации древесины обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) повышалась вплоть до формирования широкой прослойки паренхимы при концентрации дисахарида 10 %. Таким образом, в этих экспериментах, как и в случае с карельской березой, формирование паренхимных включений в древесине могло быть связано с расщеплением сахарозы в апопласте.

Аналогичные опыты на осине (*Populus tremula* L.) и ольхе серой (*Alnus incana* (L.) Moench) не дали морфогенетического эффекта, который был получен на березе. **Соотношение структурных элементов проводящих тканей у них осталось прежним** [Карелина, Новицкая, 2011].

Цель исследований, представленных в настоящей статье, заключалась в следующем: (1) на примере березы проверить предположение о том, что при введении в ткани ствола экзогенной сахарозы ее расщепление происходит в основном с участием апопластной инвертазы,

(2) оценить активность фермента при изменении концентрации экзогенной сахарозы, (3) провести сравнительный анализ содержания сахарозы и продуктов ее инвертазного расщепления – глюкозы и фруктозы – в зоне экспериментального воздействия на стволах березы, осины и ольхи.

Материалы и методы

Исследования проводили на 15–20-летних деревьях березы повислой (*Betula pendula* Roth var. *pendula*), ольхи серой (*Alnus incana* (L.) Moench) и осины (*Populus tremula* L.), произрастающих в одинаковых почвенно-климатических условиях на экспериментальных участках Института леса КарНЦ РАН (2 км к югу от г. Петрозаводска, 61°45' с. ш., 34°20' в. д.).

Эксперимент с введением растворов сахарозы в ткани ствола осуществляли в соответствии с опубликованной методикой [Novitskaya, Kushnir, 2006]. На стволах вырезали наружные слои коры в виде длинных узких полос (10 × 2 см), оставляя нетронутыми внутренние слои непроводящей флоэмы, проводящую флоэму и камбиальную зону. После удаления коры ствол в зоне ранения сразу покрывали водонепроницаемым материалом. В созданные таким образом «камеры» с помощью шприца вводили растворы сахарозы восходящей концентрации: 1 % (10 г/л), 2,5 % (25 г/л), 5 % (50 г/л), 10 % (100 г/л). Для получения сопоставимых результатов в опытах с введением растворов разной концентрации камеры делали на равном расстоянии друг от друга по окружности ствола на высоте 1,3 м от земли. Вливание растворов в камеру создавало имитацию их латерального поступления в камбиальную зону со стороны флоэмы. Интенсивная транспирация листьев обеспечивала всасывание растворов внутрь ствола. В качестве контроля использовали ткани, расположенные на 25 см выше экспериментальной зоны.

Растворы вводили ежедневно в течение 7 недель, начиная с первых чисел июля. Образцы для фиксации отбирали после окончания введения растворов. Исследования проводили в слоях тканей, включающих (1) проводящую флоэму и камбий и (2) наружные слои ксилемы. Эксперимент был выполнен в трех биологических повторностях. Из-за малого объема тканей, образовавшихся в ходе эксперимента, для биохимических исследований в каждом варианте опыта материал с трех деревьев объединяли в общую навеску.

В зонах экспериментального воздействия на стволах березы изучали активность

сахарозосинтазы и трех форм инвертазы – апопластной, вакуолярной и цитоплазматической, а также содержание сахарозы и продуктов ее расщепления – глюкозы и фруктозы. Ткани растирали в жидком азоте до однородной массы и гомогенизировали при 4 °С в буфере в течение 20 мин. Состав буфера: 50 мМ Нерес-буфер (pH 7,5), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 3 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl₂, 0,5 мМ фенолметилсульфонилфторид (PMSF). Полученный гомогенат центрифугировали при 10 000 g в течение 20 мин (центрифуга 2 – 16PK, «Sigma», Германия), осадок трехкратно промывали буфером, супернатант объединяли и диализовали при 4 °С в течение 18–20 ч против буфера для гомогенизации, разбавленного в 10 раз. Активность сахарозосинтазы определяли в направлении распада сахарозы спектрофотометрически [Галибина и др., 2015a]. Активность разных форм инвертазы определяли по количеству образовавшейся глюкозы глюкозооксидазным методом [Галибина и др., 2015б]. Активность ферментов выражали в мкм распавшейся сахарозы на г сырой ткани.

В тканях березы, ольхи и осины определяли содержание сахаров. Растительный материал фиксировали жидким азотом и лиофильно высушивали. Выделение и экстракцию сахаров проводили по методике, которая подробно описана ранее [Галибина и др., 2012]. Моно-, ди- и олигосахара, полученные из растительных образцов, анализировали с использованием ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографической) системы серии «Стайер» при следующих условиях: колонка Rezex RCM-Monosaccharide, элюент бидистиллированная вода, скорость потока элюента – 0,6 мл/мин, детектор – рефрактометр. Критерием идентификации пиков служило время удерживания стандартных веществ. Содержание углеводов выражали в мг/г сухого веса ткани.

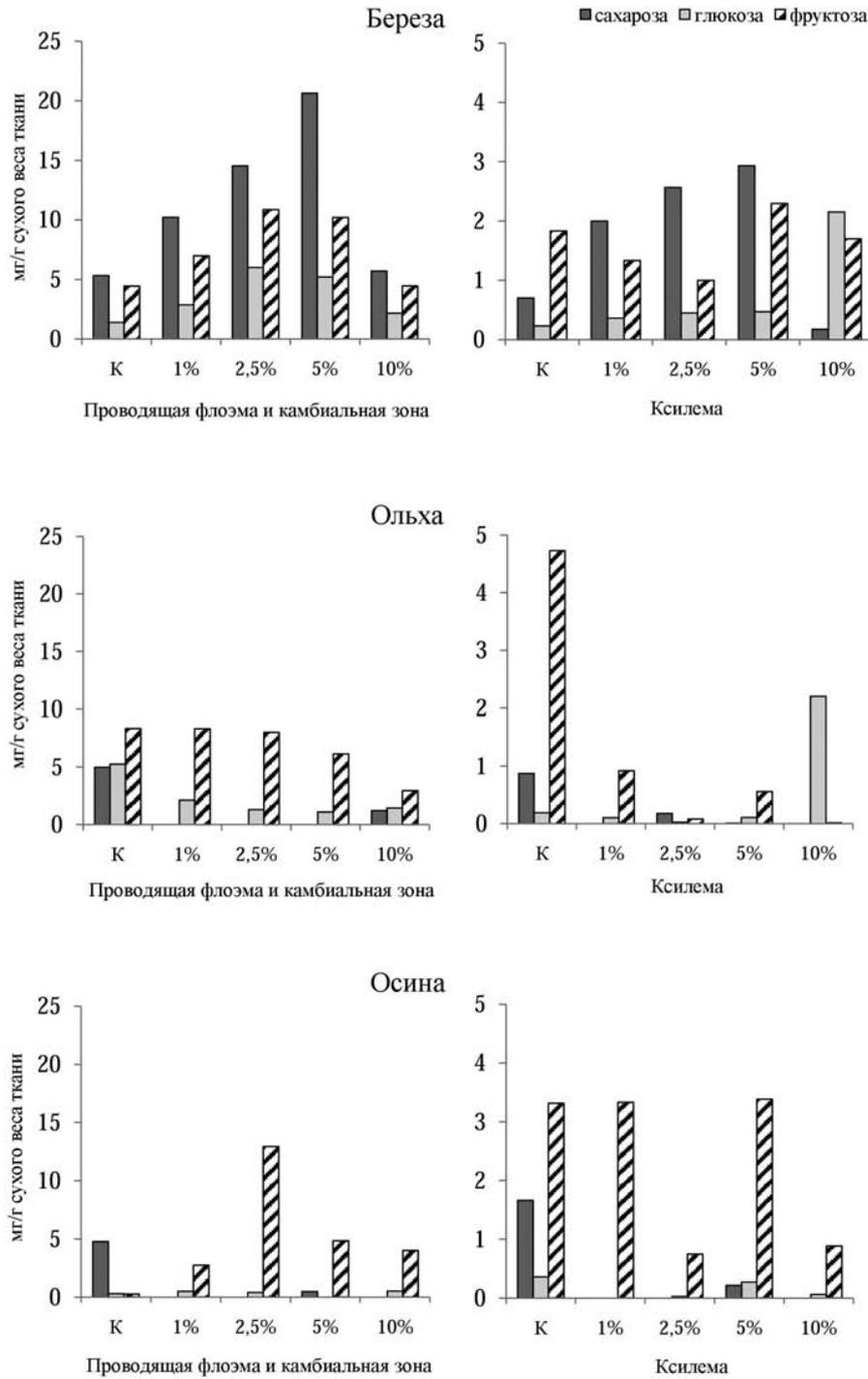
Биохимические анализы выполнены с использованием оборудования ЦКП «Аналитическая лаборатория» Института леса КарНЦ РАН.

У всех трех пород биохимические исследования проводили в сочетании с микроскопическим анализом тканей. Подготовку образцов осуществляли по общепринятой методике: материал фиксировали глютаральдегидом и четырехокисью осмия, обезживали и погружали в смесь эпоновых смол [Novitskaya, Kushnir, 2006]. На ультратоме LKB IV (Sweden) изготавливали срезы толщиной 2 мкм и окрашивали их сафранином. Исследования осуществляли с использованием светового микроскопа Axiolmager A1 (Germany).

Активность апопластной инвертазы (мкм распавшейся сахарозы на г сырого веса) у березы повислой в слое тканей, включающем проводящую флоэму и камбиальную зону, в эксперименте с введением в участки ствола растворов экзогенной сахарозы

	Концентрация экзогенного раствора сахарозы			
	1,0 %	2,5 %	5,0 %	10,0 %
Активность апопластной инвертазы	48,7	61,1 (+12,4)	75,3 (+14,2)	112,2 (+36,9)

Примечание. В скобках приведены различия в активности фермента между настоящим и предыдущим вариантами опыта.



Содержание растворимых сахаров в слоях тканей, включающих проводящую флоэму, камбиальную зону и наружные слои ксилемы в эксперименте с введением растворов экзогенной сахарозы в концентрациях 1–10 %. К – контроль

Результаты и обсуждение

Результаты анатомического анализа тканей в эксперименте с введением экзогенной сахарозы в стволы березы, осины и ольхи подтвердили опубликованные ранее данные [Novitskaya, Kushnir, 2006; Карелина, Новицкая, 2011], поэтому в настоящей статье мы их подробно не рассматриваем.

Расщепление сахарозы осуществляют два фермента: сахарозосинтаза (СС) и инвертаза (Инв). В растениях обнаружены три формы инвертазы, различающиеся по своим биохимическим свойствам и месту локализации: вакуолярная (ВакИнв), цитоплазматическая (ЦитИнв) и апопластная (АпИнв). Сопоставление активности ферментов в эксперименте с введением растворов экзогенной сахарозы в ткань ствола обычной березы повислой показало, что в зоне экспериментального воздействия во всех вариантах опыта активность апопластной инвертазы намного превосходила активность остальных ферментов. Минимальные значения активности АпИнв превышали тот же показатель для ВакИнв, ЦитИнв и СС в 70, 500 и 2300 раз соответственно. Разница по максимальным значениям активности в том же порядке перечисления ферментов составила 100, 300 и 2900 раз. Таким образом, расщепление экзогенной сахарозы в тканях ствола березы осуществляла главным образом апопластная инвертаза.

Активность АпИнв медленно возрастала с увеличением концентрации экзогенного раствора от 1 до 5 % и резко увеличилась в варианте с 10%-й сахарозой (табл.). Содержание сахарозы соответствовало этим данным: с ростом концентрации раствора от 1 до 5 % ее уровень поднимался и резко снизился при введении 10%-го раствора (в 4 раза в слое тканей «проводящая флоэма и камбиальная зона» и в 15 раз в наружных слоях ксилемы) (рис.). В этом варианте опыта у березы наблюдалось усиление паренхиматизации флоэмы и ксилемы: во флоэме заметно увеличилась доля паренхимных клеток, в ксилеме была сформирована толстая прослойка паренхимной ткани.

У ольхи суммарное содержание сахаров во флоэме и ксилеме в контроле было выше, чем в эксперименте (см. рис.). В контроле и почти во всех вариантах опыта (кроме варианта с 10%-й сахарозой в ксилеме) фруктоза преобладала над глюкозой. Преобладание фруктозы было характерно для всех трех исследуемых пород, что согласуется с известными различиями в скорости вовлечения глюкозы и фруктозы в метаболические реакции: глюкоза

значительно быстрее расходуется в обменных процессах [Uggla et al., 2001; Magel et al., 2006].

В эксперименте сахароза в тканях ольхи отсутствовала (см. рис.). Это может быть связано как с интенсивной утилизацией сахарозы в стволе, так и с ее оттоком в другие органы, например в корни.

У осины в проводящей флоэме и камбиальной зоне контрольных образцов присутствовало небольшое количество сахарозы и только следы глюкозы и фруктозы (см. рис.). Полученные результаты позволяют заключить, что (1) период утилизации сахарозы в стволе осины подошел к завершению, (2) продукты расщепления сахарозы, очевидно, использованы на синтез запасных биополимеров, в том числе крахмала. Вакуолизация клеток паренхимы в контроле у осины была слабой.

В эксперименте сахароза и глюкоза у осины практически отсутствовали, но появились пики фруктозы (см. рис.). Накопление фруктозы в данном случае можно рассматривать как свидетельство изменения метаболического статуса клеток в результате введения дополнительной сахарозы. В зоне экспериментального воздействия в подавляющем большинстве клеток паренхимы флоэмы осины присутствовала крупная центральная вакуоль. Сахара в клетке могут накапливаться только в вакуоли. Увеличение концентрации вакуолярного раствора повышает осмотический потенциал клетки и усиливает приток в нее воды, в результате чего объем вакуолей возрастает. Исходя из вышесказанного, наблюдаемое повышение степени вакуолизации паренхимных клеток проводящей флоэмы осины, очевидно, связано с накоплением в них фруктозы.

Соотношение структурных элементов ксилемы и флоэмы у осины и ольхи в контроле и опыте не различалось, из чего следует, что утилизация дисахарида у них проходила в рамках нормального морфогенеза.

Заключение

Сопоставление данных по содержанию сахарозы и формированию паренхимы в тканях ствола березы показывает, что аккумуляция сахарозы сама по себе, по-видимому, не дает морфогенетического эффекта. Он наблюдается при расщеплении сахарозы апопластной инвертазой. При этом увеличение концентрации сахарозы выступает в качестве индуктора для повышения активности фермента. Нарушение структуры тканей березы при высокой активности апопластной инвертазы свидетельствует в пользу предположения о том, что продукты

апопластного расщепления сахарозы участвуют в подавлении дифференцировки проводящих элементов ксилемы и флоэмы и стимулируют дифференцировку клеток паренхимы.

Результаты экспериментов на стволах ольхи и осины позволяют заключить, что у них существуют механизмы быстрой утилизации больших количеств сахарозы, которые не допускают аккумулярования дисахарида в тканях ствола. Полученные данные представляют интерес для подтверждения взаимосвязи между увеличением доли паренхимы в проводящих тканях древесных растений и повышением активности апопластной инвертазы. С этих позиций сохранение нормальной структуры ксилемы и флоэмы у опытных растений ольхи и осины должно быть связано с вовлечением сахарозы в обмен веществ при активном участии других ферментов ее утилизации. Проведение исследований в данном направлении мы планируем в будущем.

Работа выполнена в рамках государственного задания Института леса КарНЦ РАН 2014–2016.

Авторы выражают благодарность И. Н. Софроновой за помощь в проведении биохимических анализов.

Литература

Барильская Л. А. Сравнительный структурный анализ древесины березы повислой и карельской березы: дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 1978. 157 с.

Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Красавина М. С., Мощенская Ю. Л. Активность сахарозосинтазы в тканях ствола карельской березы в период камбиального роста // Физиология растений. 2015а. Т. 62, № 3. С. 410–419. doi: 10.7868/S0015330315030057.

References

Baril'skaya L. A. Sravnitel'nyy strukturnyy analiz drevesiny berezy povisloy i karelskoy berezy [Comparative structural analysis of wood of silver birch and Karelian birch]: PhD Diss. (Biol.). Petrozavodsk, 1978. 157 p.

Galibina N. A., Novitskaya L. L., Krasavina M. S., Moshchenskaya Yu. L. Aktivnost' sakharozosintazy v tkanyakh stvola karel'skoi berezy v period kambial'nogo rosta [Activity of sucrose synthase in trunk tissues of Karelian birch during cambial growth]. *Phyziologiya rasteniy [Plant Physiology]*. 2015a. Vol. 62, No 3. P. 410–419. doi: 10.7868/S0015330315030057.

Galibina N. A., Novitskaya L. L., Krasavina M. S., Moshchenskaya Yu. L. Aktivnost' ivertazy v tkanyakh

Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Красавина М. С., Мощенская Ю. Л. Активность инвертазы в тканях ствола карельской березы // Физиология растений. 2015б. Т. 62, № 6. С. 804–813. doi: 10.7868/S0015330315060068.

Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Софронова И. Н. Динамика сахаров в тканях ствола *Betula pendula* (*Betulaceae*) при выходе из зимнего покоя // Растительные ресурсы. 2012. Т. 48, № 4. С. 554–564.

Карелина Т. В., Новицкая Л. Л. Влияние различных концентраций сахарозы и продуктов ее расщепления на морфогенез проводящих тканей осины, ольхи и березы // Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействием факторов среды: тезисы докл. межд. конф. (Петрозаводск, 20–24 июня 2011 г.). Петрозаводск, 2011. С. 107–112.

Новицкая Л. Л. Карельская береза: механизмы роста и развития структурных аномалий. Петрозаводск: Verso, 2008. 144 с.

Новицкая Л. Л. Карельская береза: механизмы образования узорчатой древесины // Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий: тезисы Всерос. конф. (Петрозаводск, 21–25 сентября 2015 г.). Петрозаводск, 2015. 14 с.

Aloni R. Ecophysiological implications of vascular differentiation and plant evolution // *Trees*. 2015. Vol. 29. P. 1–16. doi: 10.1007/s00468-014-1070-6.

Magel E., Kruse S., Lütje G., Liese W. Soluble carbohydrates and acid invertases involved in the rapid growth of developing culms in *Sasa palmata* (Bean) Camus // *Bamboo Science and Culture: J. Amer. Bamboo Soc.* 2006. Vol. 19, No 1. P. 23–29.

Novitskaya L. L., Kushnir F. V. The role of sucrose in regulation of trunk tissue development in *Betula pendula* Roth // *J. Plant Growth Regul.* 2006. Vol. 25, No 1. P. 18–29. doi: 10.1007/s00344-004-0419-2.

Ugglä C., Magel E., Moritz T., Sundberg B. Function and dynamics of auxin and carbohydrates during early-wood/latewood transition in Scots Pine // *Plant Physiology*, 2001. Vol. 125, No 4. P. 2029–2039. doi: 10.1104/pp.125.4.2029.

Поступила в редакцию 25.06.2015

stvola karel'skoi berezy v period kambial'nogo rosta [Invertase activity in trunk tissues of Karelian birch]. *Phyziologiya rasteniy [Plant Physiology]*. 2015b. Vol. 62, No 6. P. 804–813. doi: 10.7868/S0015330315060068.

Galibina N. A., Novitskaya L. L., Sofronova I. N. Dinamika sakharov v tkanyakh stvola *Betula pendula* (*Betulaceae*) pri vykhode iz zimnego pokoya [Dynamics of sugars in trunk tissues of *Betula pendula* (*Betulaceae*) when exiting from winter dormancy]. *Rastitel'nye resursy [Plant resources]*. 2012. Vol. 48, No 4. P. 554–564.

Karelina T. V., Novitskaya L. L. Vliyanie razlichnykh kontsentratsii sakharozy i produktov ee rasshchepleniya na morfogenez provodyashchikh tkanei osiny, ol'khi

i berezy [Influence of different concentrations of sucrose and products of its cleavage on the conducting tissues morphogenesis of *Populus tremula* L., *Alnus incana* (L.) Moench and *Betula pendula* Roth.]. Strukturnye i funktsional'nye otkloneniya ot normal'nogo rosta i razvitiya rastenii pod vozdeistviem faktorov sredy: tezysi mezhd. konf. (Petrozavodsk, 20–24 iyunya 2011 g.). Petrozavodsk, 2011. P. 107–112.

Novitskaya L. L. Karelskaya bereza: mekhanizmy rosta i razvitiya strukturnykh anomalii [Karelian birch: mechanisms of growth and development of structural abnormalities]. Petrozavodsk: Verso, 2008. 144 p.

Novitskaya L. L. Karelskaya bereza: mekhanizmy obrazovaniya uzorchatoi drevesiny [Curly birch: the mechanisms behind the formation of figured wood]. Rastenija v usloviyakh globalnykh i lokalnykh prirodno-klimaticheskikh i antropogennykh vozdeistviy: tezysi docl. Vseros. konf. (Petrozavodsk, 21–25 sentjabrja 2015 g.) Petrozavodsk, 2015. 14 p.

Aloni R. Ecophysiological implications of vascular differentiation and plant evolution. *Trees*. 2015. Vol. 29. P. 1–16. doi: 10.1007/s00468-014-1070-6.

Magel E., Kruse S., Lütje G., Liese W. Soluble carbohydrates and acid invertases involved in the rapid growth of developing culms in *Sasa palmata* (Bean) Camus. *Bamboo Science and Culture: J. Amer. Bamboo Soc.* 2006. Vol. 19, No 1. P. 23–29.

Novitskaya L. L., Kushnir F. V. The role of sucrose in regulation of trunk tissue development in *Betula pendula* Roth. *J. Plant Growth Regul.* 2006. Vol. 25, No 1. P. 18–29. doi: 10.1007/s00344-004-0419-2.

Ugglä C., Magel E., Moritz T., Sundberg B. Function and dynamics of auxin and carbohydrates during early-wood/latewood transition in Scots Pine. *Plant Physiology*, 2001. Vol. 125, No 4. P. 2029–2039. doi: 10.1104/pp.125.4.2029.

Received June 25, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Тарелкина Татьяна Владимировна

младший научный сотрудник лаб. физиологии и цитологии древесных растений
Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: karelina.t.v@gmail.com
тел.: (8142) 568216

Новицкая Людмила Людвиговна

зав. лаб. физиологии и цитологии древесных растений, д. б. н.
Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: novits@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 568216

Галибина Наталия Алексеевна

зав. аналитической лабораторией, к. б. н.
Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: galibina@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 768160

CONTRIBUTORS:

Tarelkina, Tatiana

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: karelina.t.v@gmail.com
tel.: (8142) 568216

Novitskaya, Lyudmila

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: novits@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 568216

Galibina, Natalia

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

УДК 581.1;58.085

СОДЕРЖАНИЕ ФИТОГОРМОНОВ В КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ ПРИ ИНДУКЦИИ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА У ЗАРОДЫШЕЙ ЕЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PICEA ABIES* [L.] KARST.)

К. А. Хмара

Институт экологических проблем Севера УрО РАН

У зародышей *Picea abies* [L.] Karst. индуцировали соматический эмбриогенез добавлением в питательную среду 2,4-Д и БАП. На различных этапах формирования каллусной ткани с помощью иммуноферментного анализа определяли содержание ИУК, АБК, зеатин-рибозид и изопентениладенин (2иП) + изопентениладенозин (ИПА). Процесс образования эмбриогенного каллуса зависел от содержания ИУК и АБК в культивируемых тканях. В зародышах, способных образовывать эмбриогенный каллус, содержалось в 5–6 раз больше ИУК, чем у зародышей, не способных к соматическому эмбриогенезу. Содержание АБК у зародышей, способных образовывать эмбриогенный каллус, было в два раза выше, чем у зародышей, не способных к эмбриогенезу. В самом эмбриогенном каллусе наблюдался достаточно высокий уровень АБК. Одним из условий формирования эмбриогенного каллуса является высокое содержание цитокининов в культивируемых зародышах. Полученные данные показали, что эмбриогенный каллус содержит значительно меньшее количество цитокининов, чем культивируемая ткань зародышей. Эмбриогенный каллус имел низкое содержание фитогормонов по сравнению с каллусом, на котором он образовывался. Существование градиента концентрации фитогормонов – больших различий между эмбриогенным и неэмбриогенным каллусами – говорит об особой роли чувствительности тканей зародыша к регуляторам роста, которые определяют его компетентность и готовность воспринимать экзогенный гормональный сигнал и реагировать на него определенным образом.

Ключевые слова: *Picea abies*; ИУК; АБК; цитокинины; соматический эмбриогенез.

K. A. Hmara. THE CONTENT OF PLANT HORMONES IN CALLUS TISSUE DURING THE INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN EMBRYOS OF NORWAY SPRUCE (*PICEA ABIES* [L.] KARST.)

Somatic embryogenesis was induced in embryos of *Picea abies* by adding 2,4-D and BAP to the culture medium. The content of IAA, ABA, zeatin-ribosid and 2ip was determined at various stages of callus tissue formation using ELISA. The process of embryogenic callus formation depended on the content of IAA and ABA in cultured tissues. The embryos capable of forming embryogenic callus contained 5–6 times more IAA than those incapable of somatic embryogenesis. The ABA content in embryos capable of forming embryogenic callus was two times higher than in embryos incapable of embryogenesis. A sufficiently high level of ABA was observed in embryogenic callus. One of the conditions for the formation of embryogenic callus was a high content of cytokinins in cultured embryos. The data showed that embryogenic callus contained a significantly smaller amount

of cytokinins than the cultured tissue of embryos. The level of phytohormones observed in embryogenic callus was low compared to the callus it was formed on. The concentration gradient of phytohormones or a major difference between embryogenic and nonembryogenic callus showed special embryo tissue sensitivity to the growth regulators that determined its competence and readiness to accept exogenous hormonal signal and respond to it in a certain way.

Key words: *Picea abies*; plant hormones; IAA; ABA; cytokinins; somatic embryogenesis.

Введение

Известно, что семеношение хвойных пород подвержено значительному колебанию, поэтому лесное хозяйство испытывает недостаток в семенах. Для решения проблемы нехватки посадочного материала ведутся интенсивные исследования в области разработки методов размножения хвойных пород с помощью соматического эмбриогенеза [Белоруссова, Третьякова 2008; Третьякова, Ижболдина, 2008; Шалаев, Третьякова, 2011; Третьякова, Барсукова, 2012]. При индукции соматического эмбриогенеза у зародышей *Picea abies* [L.] Karst. наблюдается низкий эмбриогенный потенциал [von Arnold, 1987]. Применение в качестве эксплантов незрелых зародышей приводит к увеличению количества зародышей, способных образовывать эмбриогенный каллус [Весвар et al., 1987].

Одним из основных условий индукции эмбриогенеза в культуре ткани является присутствие в питательной среде определенного соотношения гормонов, которое играет основную роль в способности тканей зародыша образовывать эмбриогенный каллус. Скуг и Миллер установили, что при изменении соотношения между ауксином и цитокинином изменяется тип образующей меристемы: при высоком отношении ауксина к цитокининам из части клеток каллуса возникают зачатки корней, если концентрация цитокинина превышает концентрацию ауксина, то клетки дифференцируются в апикальные меристемы стебля [Skoog, Miller, 1957]. Часто эксплант, используемый для получения каллуса, является фрагментом органа и включает ткани, клетки которых различно дифференцированы и имеют разный уровень и соотношение гормонов. Онтогенетически молодые экспланты (незрелые зародыши, семена) продуцируют каллусы с более высокой долей морфотипов, способных к регенерации проростков, по сравнению с более зрелыми тканями [Mohan et al., 1988]. Возможно, разный потенциал развития незрелых зародышей и зрелых тканей обусловлен разной концентрацией гормонов.

Таким образом, эндогенные гормоны, такие как ауксины и цитокинины, играют важную роль при индукции соматического эмбриогенеза. Однако, несмотря на большое количество работ, посвященных изучению гормонального контроля эмбриогенеза, влияние гормонов на индукцию соматического эмбриогенеза изучено недостаточно [Kong et al., 1997; Vagner et al., 1999; Latkowska, Rakowski, 2000]. Так, до сих пор не понятно, какое количество и соотношение различных групп фитогормонов оказывает влияние на процесс формирования эмбриогенного каллуса и связан ли морфогенетический потенциал эксплантов с эндогенной концентрацией гормонов. Поэтому актуальной задачей является изучение содержания эндогенных фитогормонов в каллусе при индукции соматического эмбриогенеза в культуре ткани зародыша. Цель данной работы – определение количества фитогормонов в каллусной ткани при индукции соматического эмбриогенеза у зародышей *Picea abies* [L.] Karst. и изучение их влияния на процесс развития экспланта.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали зародыши семян *Picea abies* [L.] Karst. Семена были собраны на Устюженской лесосеменной плантации в Вологодской области.

Для индукции соматического эмбриогенеза применяли питательную среду, содержащую минеральные соли, по Murashige and Skoog [1962]. В состав среды входили: 1 % сахарозы, 0,6 % агара, тиамин-НCl – 5 мг/л, пиридоксин – 1 мг/л, никотиновая кислота – 5 мг/л, инозит 100 мг/л. В питательную среду добавляли 2,4-Д – 2,2 мг/л и БАП – 1,1 мг/л. Экспланты культивировали на индукционной питательной среде в течение 28 дней, при температуре +21°, при 16-часовом освещении.

Определение содержания фитогормонов в культивируемых зародышах было разбито на этапы. Первый этап – это зародыши до введения в культуру ткани. Второй этап – 5 дней культивирования на индукционной питательной среде. Данный период культивирования на

индукционной питательной среде не способен вызвать эмбриогенез у тканей зародыша при пересадке их на питательную среду, в которой отсутствуют экзогенные регуляторы роста. Третий этап – после 15 дней культивирования на индукционных питательных средах, содержащих регуляторы роста. На данном этапе на поверхности каллусной ткани можно было обнаружить эмбриогенную каллусную ткань. Определение фитогормонов в культивируемых зародышах проводили в каллусной массе, на поверхности которой формировался эмбриогенный каллус, и в каллусе, на поверхности которого эмбриогенез не наблюдался. Четвертый этап – после 28 дней культивирования на индукционных питательных средах, содержащих регуляторы роста. На данном этапе определяли количество фитогормонов в эмбриогенном каллусе и в органогенном каллусе.

Определение нативных фитогормонов проводили с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА) [Катаева и др., 1990]

Экстракция фитогормонов из растительного материала. Замороженный растительный материал растирали в агатовой ступке при температуре +4 °С до гомогенного состояния и экстрагировали в течение 2 часов охлажденным до 0 °С 80%-м метиловым спиртом, содержащим 0,1 % БМФ в качестве антиоксиданта, при постоянном перемешивании в темноте в атмосфере азота.

Полученный экстракт центрифугировали, осадок отделяли, ресуспендировали в 80%-м метаноле, содержащем 0,1 % бутилметилфенола (БМФ), и проводили повторную экстракцию в тех же условиях еще 30 мин. Экстракт центрифугировали, осадок отбрасывали, супернатанты объединяли. Супернатант пропускали с помощью пластикового одноразового шприца через предколонки объемом 3 см³, заполненные обращенной фазой С-18 «Сепарон» (Чехия). Получали обесцвеченный экстракт, свободный от хлорофиллов, фенолов, каротиноидов и др. Затем экстракт делили на две равные части: одна часть для определения цитокининов, другая – для определения ИУК и АБК. Для определения потери фитогормонов при очистке в качестве стандартов применялись радиоактивные препараты. Радиоактивность образцов определяли на сцинтилляционном счетчике 1919 Рак Бета «Спектраль» (ЛКБ, Швеция). В соответствии с полученными результатами учитывали потери при очистке.

Процедура ИФА. Полистироловые планшеты сенсibilизировали в течение 12 часов раствором антител в гидрокарбонате

натрия (рН 9,5–9,7) при температуре +4 °С. В каждую лунку вносили по 200 мкл соответствующей антисыворотки. После сенсibilизации планшеты трижды промывали ТБС в течение 15 мин, в каждую лунку вносили по 200 мкл 0,1%-го раствора бычьего сывороточного альбумина в триссолевом буфере (ТБС) и инкубировали 30 мин при температуре +37 °С (кроме вариантов для определения ИУК и АБК). Затем планшеты промывали и в лунки вносили по 50 мкл стандартного раствора гормона или растительного экстракта, перемешивали 1 мин и инкубировали 1 час (температура инкубации для цитокининов +37 °С, для ИУК и АБК +18...+22 °С). Через 1 час в инкубационную смесь добавляли по 150 мкл соответствующего конъюгата – щелочную фосфатазу (ЩФ-гормон), перемешивали 1 мин и инкубировали 1 час в тех же условиях. Планшеты промывали с добавлением в ТБС 0,01%-го раствора детергента Тритон X-100, затем лунки заполняли 200 мкл субстрата (п-нитрофенилфосфат 1 мг/л в гидрокарбонате натрия, рН 9,5–9,7) и инкубировали 1 час при температуре +37 °С. Реакцию останавливали, добавляя в каждую лунку по 50 мкл 5N KOH. Оптическую плотность продукта реакции измеряли при 405 нм на спектрофотометре Multiscan MCC фирмы «Flow» (Англия).

Оценка результатов. В соответствии с методикой Родбард [Rodbard, 1974] определяли зависимость между ферментативной активностью при инкубации антител с возрастающими концентрациями гормона и ферментативной активностью при инкубации в аналогичных условиях без экзогенного гормона.

Все эксперименты проводили в четырех биологических повторностях. При проведении ИФА использовали пять аналитических повторностей. В таблице приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

Результаты

В таблице приведены данные иммуноферментного анализа по содержанию различных групп фитогормонов в культивируемых тканях.

Содержание фитогормонов в каллусной ткани после 5 дней культивирования на индукционной питательной среде

При культивировании в течение 5 дней на индукционной питательной среде содержание ИУК в тканях зародыша увеличивалось в 24 раза.

Зародыши имели высокое содержание эндогенной АБК (163 нг/г сухого веса). После

Содержание фитогормонов в каллусе в процессе индукции соматического эмбриогенеза на питательной среде, содержащей 2,4-Д и БАП

Тип экспланта	Содержание фитогормонов, в нг/г сухого веса			
	ИУК	АБК	Зеатин+зеатин-рибозид	2иП+ИПА
зародыши	83 ± 2	164 ± 1	109 ± 8	4 ± 1
после 5 дней культивирования	1982 ± 201	127 ± 3	7402 ± 194	4300 ± 121
после 15 дней культивирования (зародыши, способные к соматическому эмбриогенезу)	99400 ± 11217	2638 ± 21	10505 ± 157	65304 ± 3103
после 15 дней культивирования (зародыши, не способные к соматическому эмбриогенезу)	15658 ± 309	1454 ± 11	12094 ± 267	68902 ± 6960
после 28 дней культивирования (зародыши, не способные к соматическому эмбриогенезу)	27000 ± 800	874 ± 5,6	8816 ± 12	62840 ± 3211
эмбриогенный каллус	74 ± 26	1241 ± 109	4256 ± 272	1029 ± 117

5 дней культивирования на индукционной питательной среде наблюдалось незначительное снижение содержания АБК в культивируемых зародышах до 127 нг/г сухого веса.

После 5 дней культивирования на индукционной питательной среде содержание зеатина и зеатин-рибозида в зародышах увеличивалось до 7402 нг/г сухого веса. Количество эндогенных зеатина и зеатина-рибозида в культивируемых зародышах в течение первых 5 дней увеличивалось в 70 раз.

В первые дни культивирования происходило значительное увеличение содержания цитокининов ряда 2иП и ИПА в культивируемых зародышах.

Содержание фитогормонов в каллусной ткани после 15 дней культивирования на индукционной питательной среде

Культивирование в течение 15 дней приводило к увеличению содержания ИУК в зародышах, на поверхности которых формировался эмбриогенный каллус, в 1200 раз. Зародыши, не способные к соматическому эмбриогенезу, имели уровень ИУК значительно ниже, увеличение составило 190 раз.

Содержание АБК в культивируемых зародышах, способных к эмбриогенезу, было высоким – 2638 нг/г сухого веса. Зародыши, не способные к соматическому эмбриогенезу, имели уровень АБК 1454 нг/г сухого веса.

К 15-му дню культивирования содержание зеатина и зеатин-рибозида в зародышах, способных к индукции соматического эмбриогенеза, было 10 505 нг/г сухого веса. Зародыши, не способные к соматическому эмбриогенезу, имели уровень 12 094 нг/г сухого веса.

Содержание цитокининов ряда 2иП и ИПА в зародышах, формирующих эмбриогенный

калус, было 65 304 нг/г сухого веса. Зародыши, не способные к соматическому эмбриогенезу, имели уровень 2иП и ИПА 68 902 нг/г сухого веса. Количество эндогенных цитокининов ряда 2иП и ИПА в культивируемых зародышах, способных образовывать эмбриогенный каллус, в течение первых 15 дней увеличилось в 16 326 раз.

Содержание фитогормонов в каллусной ткани после 28 дней культивирования на индукционной питательной среде

В зародышах, не способных формировать эмбриогенный каллус, содержание ИУК достигало 27 000 нг/г сухого веса. Содержание ИУК в эмбриогенном каллусе – 74 нг/г сухого веса.

Содержание АБК в эмбриогенном каллусе достигало 1241 нг/г сухого веса, что значительно превышало содержание ее в каллусе, не способном образовывать эмбриогенный каллус.

Эмбриогенный каллус содержал зеатина и зеатин-рибозида 4256 нг/г сухого веса, что в два раза меньше, чем у зародышей, не способных к органогенезу.

Зародыши, не способные к органогенезу, содержали цитокинины ряда 2иП и ИПА 62 840 нг/г сухого веса. В эмбриогенном каллусе – 1029 нг/г сухого веса.

Обсуждение

Одним из факторов, влияющих на дифференцировку клетки, является воздействие фитогормонов. По нашим данным [Хмара, 2011], способность зародышей *in vitro* к органогенезу зависит от соотношения цитокининов к АБК в культивируемых тканях, а при индукции соматического эмбриогенеза основную роль играет ИУК.

Содержание ИУК

В первые дни культивирования зародышей в условиях, стимулирующих образование эмбриогенного каллуса, происходило увеличение содержания ИУК в тканях. Аналогичные данные были получены при индукции органогебеза [Хмара, 2011]. К 15-му дню культивирования уровень ИУК в тканях превосходил исходный уровень более чем в 1000 раз. По нашим данным [Хмара, 2011], при индукции органогебеза содержание ИУК к 12-му дню культивирования увеличивалось в 166 раз. К концу пассажа содержание ИУК в тканях при индукции соматического эмбриогенеза было таким же, как и при индукции органогебеза. В зародышах, способных образовывать эмбриогенный каллус, содержалось в 5–6 раз больше ИУК, чем у зародышей, не способных к соматическому эмбриогенезу. В эмбриогенном каллусе содержание ИУК было низким и соответствовало исходному уровню в зародышах. Вагнер [Vagner et al., 1999] отмечал в эмбриогенном каллусе *Norway spruce* пониженное содержание ИУК. Полученные нами и литературные данные свидетельствуют о влиянии концентрации ИУК на способность тканей зародыша к соматическому эмбриогенезу, но при этом сам эмбриогенный каллус содержал значительно меньшее количество ИУК.

Содержание АБК

После 5 дней культивирования содержание АБК в тканях зародыша снижалось. По нашим данным [Хмара, 2011], снижение содержания АБК на первом этапе культивирования – необходимое условие для начала развития зародышей *in vitro*. При дальнейшем культивировании происходило увеличение уровня АБК. При индукции органогебеза у зародышей *in vitro* наблюдается увеличение содержания АБК в культивируемых тканях, связанное с интенсивным накоплением биомассы [Хмара, 2011]. К 28-му дню культивирования уровень ее снижался. Содержание АБК у зародышей, способных образовывать эмбриогенный каллус, было в два раза выше, чем у зародышей, не способных к эмбриогенезу. В самом эмбриогенном каллусе наблюдался достаточно высокий уровень АБК. Конг [Kong et al., 1997] наблюдал высокое содержание АБК в зиготических эмбриоидах. Таким образом, на первом этапе развития зародыша происходит снижение содержания АБК в тканях, при дальнейшем культивировании происходит накопление АБК в тканях, но при этом в эмбриогенном каллусе наблюдалось высокое содержание АБК.

Содержание цитокининов

Содержание цитокининов группы зеатинов в культивируемых зародышах возрастало первые 5 дней культивирования. При дальнейшем культивировании содержание их существенно не менялось. Содержание цитокининов группы изопентениладенина к 5-му дню культивирования значительно возрастало, а к 15-му дню культивирования происходило значительное увеличение содержания их в тканях экспланта и превышало уровень содержания их на 5-й день культивирования более чем в 30 раз. По нашим данным [Хмара, 2011], при индукции органогебеза у зародышей увеличивалось количество цитокининов группы зеатинов. К концу пассажа содержание цитокининов группы изопентениладенина также было достаточно высоким. Эмбриогенный каллус содержал значительно меньшее количество цитокининов по сравнению с каллусной тканью зародышей. Полученные данные показали, что одним из условий формирования эмбриогенного каллуса является высокое содержание цитокининов в культивируемых зародышах. Полученные данные показали, что эмбриогенный каллус содержит значительно меньшее количество цитокининов, чем культивируемая ткань зародышей.

Основным фактором, вызывающим индукцию эмбриогенного каллуса, является высокое содержание фитогормонов в культивируемых зародышах. При этом сам эмбриогенный каллус имел низкое содержание фитогормонов, лишь содержание АБК в нем было достаточно высоким. Данный фактор указывает на то, что эмбриогенный каллус обладает автономной гормональной регуляцией, так как даже высокое содержание фитогормонов в питательной среде не способно значительно повысить уровень фитогормонов в эмбриогенном каллусе.

Значительные отличия в содержании фитогормонов между каллусной тканью зародышей, способных образовывать эмбриогенный каллус, и каллусной тканью зародышей, не способных формировать эмбриогенный каллус, говорят о том, что не только влияние экзогенных фитогормонов определяет путь развития экспланта, но и способность самих тканей к биосинтезу эндогенных гормонов определяет путь развития экспланта в культуре ткани.

Существование градиента концентраций фитогормонов – больших различий между эмбриогенным и неэмбриогенным каллусами, а также между зародышами, способными образовывать эмбриогенный каллус,

и зародышами, не способными образовывать его, свидетельствует:

- об определенной роли складывающегося гормонального баланса в индукции морфогенеза *in vitro*;
- об особой роли чувствительности тканей зародышей к регуляторам роста, которые определяют его компетентность и готовность воспринимать экзогенный гормональный сигнал и реагировать на него определенным образом.

Литература

Белоруссова А. С., Третьякова И. Н. Особенности формирования соматических зародышей у лиственницы сибирской: эмбриологические аспекты // Онтогенез. 2008. Т. 39, № 2. С. 106–115.

Бутенко Р. Г. Гормональная регуляция дифференцировки растительной клетки в культуре *in vitro* // Рост и гормональная регуляция жизнедеятельности растений. Иркутск: Наука, 1974, С. 67–85.

Катаева Н. В., Александрова И. Г., Карягина Т. Б., Машкова А. Х. Возможности метода иммуноферментного анализа для определения фитогормонов в культивируемых *in vitro* побегах // Физиология растений. 1990. Т. 37, № 4. С. 813–821.

Кулаева О. Н. Цитокинины, их структура и функции. М.: Наука, 1973. 264 с.

Меняйло Л. Н. Гормональная регуляция ксилогенеза хвойных. Новосибирск: Наука, 1987. 185 с.

Полевой В. В. Фитогормоны. Ленинград: ЛГУ, 1982. 183 с.

Третьякова И. Н., Ижболдина М. В. Особенности роста эмбрионного каллуса и получение соматических зародышей у кедра сибирского // Хвойные бореальной зоны. 2008. Т. 25, № 1–2. С. 71–76.

Третьякова И. Н., Барсукова А. В. Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* трех видов лиственницы // Онтогенез. 2012. Т. 43, № 6. С. 425–435.

Хмара К. А. Динамика содержания фитогормонов в каллусной ткани при индукции органогенеза *in vitro* зародышей *Picea abies* L. Karst // Труды КарНЦ РАН. 2011. № 3. С. 131–136.

Чайлахян М. Х., Ложникова В. Н. Фитогормоны и цветение растений // Регуляторы роста и развития растений. Киев, 1989. С. 117–132.

Шалаев Е. А., Третьякова И. Н. Индукция соматического эмбриогенеза у ели саянской в культуре *in vitro* // Хвойные бореальной зоны. 2011. Т. 28, № 1–2. С. 69–71.

Весвар М., Noland T., Wann S. Somatic embryo development and plant regeneration from embryogenic

Norway spruce callus // Tappi, 1987. Vol. 70, No 2. P. 155–160.

Burrows W. Cytokinins // Biochem. Soc. Trans, 1978. Vol. 6. P. 1395–1400.

Hmara K. A., Kataeva N. V. Effect of plant genotype and cytokinin-like substances Norway Spruce (*Picea abies* L.) *in vitro* organogenesis // Russian Journal of Plant Physiology. 1993. Vol. 40, No 5. P. 802–803.

Kong L., Attree S. M., Fowke L. C. Changes of endogenous hormone levels in developing seeds, zygotic embryos and megagametophytes in *Picea glauca* // Physiol. Plant. 1997. Vol. 101. P. 23–30.

Label Ph., Sotta B., Miginiac E. Endogenous levels of ABA and IAA during *in vitro* rooting of Wild Cherry explants produced by micropropagation // Plant Growth Red. 1989. Vol. 8. P. 325–333.

Latkowska M. J., Rakowski K. Endogenous levels of phytohormones in the embryogenic tissue of Norway spruce // Quality enhancement of plant production through tissue culture. Working Group 2, Advanced propagation techniques. Inaugural meeting in Tampere. (Finland, 7–10 July. 2000 г.). Finland, 2000. P. 23–25.

Mohan C. J., Wenton R. J., Soltes E. J. Enhancement of somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies* L.) // Theor Appl Genet. 1988. Vol. 76, No 4. P. 501–506.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 5, No 95. P. 473–497.

Rodbard D. Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassay and immunoradiometric assays // Clin. Chem. 1974. Vol. 20, No 8. P. 1255–1261.

Skoog F., Miller W. Chemical regulation of growth and organ formation *in vitro* // Symp. Soc. Exp. Biol., 1957. Vol. 11. P. 118–121.

Stabel P., Eriksson T., Engstrom P. Changes in Protein Synthesis upon Cytokinin-Mediated Adventitious Bud Induction and during Seedling Development in Norway Spruce, *Picea abies* // Plant Physiology. 1990. Vol. 92. P. 1174–1183.

Vagner M., Vondrakova Z., Spackova J. et al. Norway spruce somatic embryogenesis: Endogenous levels of phytohormones during somatic embryo development // In: Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21 Century (Altman A. et al. eds.), Kluwer Ac. Publ., Netherlands. 1999. P. 93–96.

von Arnold S. Improved efficiency of somatic embryogenesis in mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. // J. Plant Physiol. 1987. Vol. 128, No 2. P. 233–244.

Walton D. Biochemistry and physiology of abscisic acid // Annu. Rev. Plant Physiol. 1980. Vol. 31. P. 453–489.

Поступила в редакцию 02.11.2015

References

Belorussova A. S., Tret'yakova I. N. Osobennosti formirovaniya somaticheskikh zarodyshej u listvennicy sibirskoj: ehmbriologicheskie aspekty [Patterns of somatic embryo formation in Siberian larch: embryological

aspects]. *Ontogenez* [Russ. J. Developmental Biol.]. 2008. Vol. 39, No 2. P. 106–115.

Chajlahyan M. H., Lozhnikova V. N. Fitogormony i cvetenie rastenij [Phytohormones and flowering of

plants]. Regulatory rosta i razvitiya rastenii [Regulators of growth and development in plants]. Kiev, 1989. P. 117–132.

Hmara K. A. Dinamika sodержaniya fitogormonov v kallusnoj tkani pri indukcii organogeneza *in vitro* zarodyshej *Picea abies* L. Karst [Dynamics of phytohormones in callus tissue during the induction of organogenesis in embryos of *Picea abies* L. Karst *in vitro*]. *Trudy KarNC RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2011. No 3. P. 131–136.

Kataeva N. V., Aleksandrova I. G., Karyagina T. B., Mashkova A. H. Vozmozhnosti metoda immunofermentnogo analiza dlya opredeleniya fitogormonov v kul'tiviruemyh *in vitro* pobegah [Possibilities of enzyme-linked immunosorbent assay for determining phytohormones in *in vitro* grown shoots]. *Fiziologiya rastenij* [Russ. J. Plant Physiol.]. 1990. Vol. 37, No 4. P. 813–821

Kulaeva O. N. Citokininy, ih struktura i funkcii [Cytokinins, their structure and functions]. Moscow: Nauka, 1973. P. 9–23.

Menyajlo L. N. Gormonal'naya regulaciya ksilogeneza hvojnnyh [Hormonal regulation of xylogenesis in conifers]. Novosibirsk: Nauka, 1987. 185 p.

Polevoj V. V. Fitogormony [Phytohormones]. Leningrad: LGU, 1982. 183 p.

Shalaev E. A., Tret'yakova I. N. Indukciya somaticheskogo ehmbriogeneza u eli ayanskoj v kul'ture *in vitro* [Induction of somatic embryogenesis by *Picea ajanensis* in culture *in vitro*]. *Hvojnnye boreal'noj zony* [Conifers of the boreal zone]. 2011. Vol. 28, No 1–2. P. 69–71.

Tret'yakova I. N., Barsukova A. V. Somaticheskij ehmbriogenez v kul'ture *in vitro* trekh vidov listvennicy [Somatic embryogenesis in *in vitro* culture of three larch species]. *Ontogenez* [Russ. J. Developmental Biol.]. 2012. Vol. 43, No 6. P. 425–435.

Tret'yakova I. N., Izhboldina M. V. Osobennosti rosta ehmbriogenenogo kallusa i poluchenie somaticheskikh zarodyshej u kedra sibirskogo [Peculiarities of embryogenic callus growth and obtaining somatic embryos of *Pinus sibirica*]. *Hvojnnye boreal'noj zony* [Conifers of the boreal zone]. 2008. Vol. 25, No 1–2. P. 71–76.

Becwar M., Noland T., Wann S. Somatic embryo development and plant regeneration from embryogenic Norway spruce callus. *Tappi*, 1987. Vol. 70, No 2. P. 155–160.

Burrows W. Cytokinins. *Biochem. Soc. Trans.*, 1978. Vol. 6. P. 1395–1400.

Hmara K. A., Kataeva N. V. Effect of plant genotype and cytokinin-like substances Norway Spruce (*Picea*

abies L.) *in vitro* organogenesis. *Russian Journal of Plant Physiology*. 1993. Vol. 40, No 5. P. 802–803.

Kong L., Attree S. M., Fowke L. C. Changes of endogenous hormone levels in developing seeds, zygotic embryos and megagametophytes in *Picea glauca*. *Physiol. Plant*. 1997. Vol. 101. P. 23–30.

Label Ph., Sotta B., Miginiac E. Endogenous levels of ABA and IAA during *in vitro* rooting of Wild Cherry explants produced by micropropagation. *Plant Growth Red.* 1989. Vol. 8. P. 325–333.

Latkowska M. J., Rakowski K. Endogenous levels of phytohormones in the embryogenic tissue of Norway spruce. Quality enhancement of plant production through tissue culture. Working Group 2. Advanced propagation techniques. Inaugural meeting in Tampere. (Finland, 7–10 July, 2000 r.). Finland, 2000. P. 23–25.

Mohan C. J., Wenton R. J., Soltes E. J. Enhancement of somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea adies* L.). *Theor Appl Genet*. 1988. Vol. 76, No 4. P. 501–506.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 5, No 95. P. 473–497.

Rodbard D. Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassay and immunoradiometric assays. *Clin. Chem.* 1974. Vol. 20, No 8. P. 1255–1261.

Skoog F., Miller W. Chemical regulation of growth and organ formation *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 1957. Vol. 11. P. 118–121.

Stabel P., Eriksson T., Engstrom P. Changes in Protein Synthesis upon Cytokinin-Mediated Adventitious Bud Induction and during Seedling Development in Norway Spruce, *Picea abies*. *Plant Physiol*. 1990. Vol. 92. P. 1174–1183.

Vagner M., Vondrakova Z., Spackova J., Cvikrova M., Eder J., Lipavska H., Albrechtova J., Svobodova H., Machackova I. Norway spruce somatic embryogenesis: Endogenous levels of phytohormones during somatic embryo development. In: *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21 Century* (Altman A. et al. eds.), Kluwer Ac. Publ., Netherlands. 1999. P. 93–96.

von Arnold S. Improved efficiency of somatic embryogenesis in mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *J. Plant Physiol*. 1987. Vol. 128, No 2. P. 233–244.

Walton D. Biochemistry and physiology of abscisic acid. *Annu. Rev. Plant Physiol*. 1980. Vol. 31. P. 453–489.

Received November 02, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ:

Хмара Константин Алексеевич

научный сотрудник, к. б. н.
Институт экологических проблем Севера УрО РАН
Набережная Северной Двины, 23, Архангельск,
Россия, 163000
эл. почта: KAX1961@yandex.ru

CONTRIBUTOR:

Hmara, Konstantin

Institute of Ecological Problems of the North,
Ural Branch, Russian Academy of Sciences
23 Severnaya Dvina Emb.,
163000 Arkhangelsk, Russia
e-mail: KAX1961@yandex.ru

ХРОНИКА

VIII СЪЕЗД ОБЩЕСТВА ФИЗИОЛОГОВ РАСТЕНИЙ РОССИИ И ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «РАСТЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ГЛОБАЛЬНЫХ И ЛОКАЛЬНЫХ ПРИРОДНО-КЛИМАТИЧЕСКИХ И АНТРОПОГЕННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ» (Петрозаводск, 21–26 сентября 2015 г.)

С 21 по 26 сентября 2015 года в Петрозаводске на базе Карельского научного центра РАН проходил VIII съезд Общества физиологов растений России, а также Всероссийская научная конференция с международным участием и школа для молодых ученых «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий». Их организаторами выступили Российская академия наук, Общество физиологов растений России, Научный совет по проблемам физиологии растений и фотосинтеза РАН, Институт биологии Карельского научного центра РАН, Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Институт леса Карельского научного

центра РАН, Петрозаводский государственный университет. В работе конференции приняли участие почти 400 ученых и специалистов из 36 городов Российской Федерации, от Калининграда до Владивостока, а также из зарубежных стран (Беларусь, Италия, Индия, Китай, Польша, Швейцария, Финляндия).

Основная цель конференции – анализ современного состояния исследований, последних достижений и тенденций в области физиологии растений.

На открытии съезда и конференции с приветственным словом выступили заместитель главы Республики Карелия, министр экономического развития Республики Карелия





В. Я. Чмиль, председатель КарНЦ РАН чл.-корр. РАН А. Ф. Титов, президент ОФР, директор ИФР им. К. А. Тимирязева РАН чл.-корр. РАН Вл. В. Кузнецов.

Участники конференции заслушали пять пленарных докладов, посвященных изучению происхождения карельской березы, ее морфофизиологических особенностей (д. б. н. Ветчинникова Л. В.) и механизмов образования узорчатой древесины (д. б. н. Новицкая Л. Л.); регуляции физиологических функций у цианобактерий (д. б. н. Лось Д. А.); особенностям функционирования рецепторов цитокининов (Ломин С. Н.) и образования изопреноидов в культурах клеток высших растений (д. б. н. Носов А. М.). Директор ИЯЛИ КарНЦ РАН д. фил. н. И. И. Муллонен выступила с интересным докладом об этнокультурной истории Карелии. По окончании пленарной сессии перед участниками конференции выступил национальный ансамбль песни и танца Республики Карелия «Кантеле».

В последующие дни работа конференции проходила в формате заседаний секций по актуальным научным направлениям физиологии растений. Рассматривались вопросы фотосинтеза, дыхания и продукционного процесса;

водного статуса и ионного гомеостаза растений; регуляции онтогенеза; генома растений и регуляции его экспрессии. Обсуждались проблемы клеточной биологии и биотехнологии, а также молекулярных механизмов регуляции физиологических процессов. Повышенное внимание участников конференции было сосредоточено на различных аспектах устойчивости и адаптации растений к абиотическим (низкие и высокие температуры, засоление, тяжелые металлы и т. д.) и биотическим (действие патогенов, бактерий, грибов и др.) факторам внешней среды, то есть на проблеме, которая многие годы занимает одно из центральных мест в современной физиологии растений и относится к приоритетным направлениям развития науки, техники и технологий РФ «Науки о жизни». Во время работы конференции было проведено два круглых стола, посвященных вопросам преподавания физиологии и биохимии растений в вузах и по организации и проведению праздника «День растений». В целом участники заслушали более 180 устных докладов и обсудили более 160 постеров.

В рамках конференции проводилась школа для молодых ученых, на которой присутствовали около 100 молодых ученых с устными



и стендовыми докладами. По мнению организаторов, участие аспирантов и студентов в такого рода мероприятиях способствует привлечению талантливой молодежи к научным исследованиям и служит дальнейшему прогрессу российской науки.

Важнейшим событием явилось проведение общего собрания членов Общества физиологов растений России. Президент Общества чл.-корр. РАН Вл. В. Кузнецов представил доклад о деятельности ОФР за 2011–2015 гг. Состоялись выборы руководящих органов (президента ОФР, вице-президентов, членов Центрального совета, членов ревизионной комиссии), утверждены места проведения годового собрания ОФР в 2016 году и IX съезда в 2019 году. Обсуждались также некоторые вопросы жизни Общества, в том числе о его юридическом статусе, избрании Почетных членов ОФР. Было предложено ввести категорию Иностранцев членов ОФР и этим званием отмечать наиболее авторитетных зарубежных биологов растений, внесших значительный вклад в развитие международных научных связей с российскими учеными. В торжественной обстановке состоялось закрытие VIII съезда ОФР и конференции.

Наряду с научной программой участники конференции познакомились с геологическим и археологическим музеями КарНЦ РАН, посетили выставку «Коллекция аномальной древесины». Были организованы экскурсии

на о. Валаам и в горный парк «Рускеала», на о. Кижы и водопад Кивач, в Важеозерский Спасо-Преображенский и Свято-Троицкий Преподобного Александра Свирского мужские монастыри.

В целом прошедшие VIII съезд Общества физиологов растений России и научная конференция позволили участникам обсудить с коллегами свои новейшие идеи и последние научные достижения, укрепить контакты между учеными ведущих научных центров страны и зарубежья, определить возможные пути внедрения полученных научных результатов в практику и установить приоритеты научных исследований в области физиологии растений на ближайшие годы.

Подробная информация об итогах конференции и решениях Общего собрания будет опубликована в очередном выпуске Бюллетеня ОФР, а также размещена на сайтах ОФР (<http://www.ofr.su/VIII-congress>) и КарНЦ РАН (<http://www.krc.karelia.ru/kspp/VIIIcongress.html>). **VIII съезд ОФР и научная конференция являются плановыми научными мероприятиями и проведены при финансовой поддержке РФФИ.**

*Председатель Оргкомитета конференции
чл.-корр. РАН А. Ф. Титов*

*Ответственный секретарь конференции
к. б. н. Н. М. Казнина*

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

(требования к работам, представляемым к публикации
в «Трудах Карельского научного центра Российской академии наук», с 2015 г.)

«Труды Карельского научного центра Российской академии наук» (далее – Труды КарНЦ РАН) публикуют результаты завершённых оригинальных исследований в различных областях современной науки: теоретические и обзорные статьи, сообщения, материалы о научных мероприятиях (симпозиумах, конференциях и др.), персоналии (юбилеи и даты, потери науки), статьи по истории науки. Представляемые работы должны содержать новые, ранее не публиковавшиеся данные.

Статьи проходят обязательное рецензирование. Решение о публикации принимается редакционной коллегией серии или тематического выпуска Трудов КарНЦ РАН после рецензирования, с учётом научной значимости и актуальности представленных материалов. Редколлегия серий и отдельных выпусков Трудов КарНЦ РАН оставляет за собой право возвращать без регистрации рукописи, не отвечающие настоящим правилам.

При получении редакцией рукопись регистрируется (в случае выполнения авторами основных правил её оформления) и направляется на отзыв рецензентам. Отзыв состоит из ответов на типовые вопросы анкеты и может содержать дополнительные расширенные комментарии. Кроме того, рецензент может вносить замечания и правки в текст рукописи. Авторам высылаются электронная версия анкеты и комментарии рецензентов. Доработанный экземпляр автор должен вернуть в редакцию вместе с первоначальным экземпляром и ответом на все вопросы рецензента не позднее чем через месяц после получения рецензии. Перед опубликованием авторам высылаются распечатанная версия статьи, которая вычитывается, подписывается авторами и возвращается в редакцию.

Журнал имеет полноценную электронную версию на базе Open Journal System (OJS), позволяющую перевести предоставление и редактирование рукописи, общение автора с редколлегиями серий и рецензентами в электронный формат и обеспечивающую прозрачность процесса рецензирования при сохранении анонимности рецензентов (<http://journals.krc.karelia.ru/>).

Редакционный совет журнала «Труды Карельского научного центра РАН» (Труды КарНЦ РАН) определил для себя в качестве одного из приоритетов полную открытость издания. Это означает, что пользователям на условиях свободного доступа разрешается: читать, скачивать, копировать, распространять, печатать, искать или находить полные тексты статей журнала по ссылке без предварительного разрешения от издателя и автора. Учредители журнала берут на себя все расходы по редакционно-издательской подготовке статей и их опубликованию.

Содержание номеров Трудов КарНЦ РАН, аннотации и полнотекстовые электронные варианты статей, а также другая полезная информация, включая настоящие Правила, доступны на сайтах – <http://transactions.krc.karelia.ru>; <http://journals.krc.karelia.ru>

Почтовый адрес редакции: 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11, КарНЦ РАН, редакция Трудов КарНЦ РАН. Телефон: (8142) 762018.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РУКОПИСИ

Статьи публикуются на русском или английском языке. Рукописи должны быть тщательно выверены и отредактированы авторами.

Объём рукописи (включая таблицы, список литературы, подписи к рисункам, рисунки) не должен превышать: для обзорных статей – 30 страниц, для оригинальных – 25, для сообщений – 15, для хроники и рецензий – 5–6. Объём рисунков не должен превышать 1/4 объёма статьи. Рукописи большего объёма (в исключительных случаях) принимаются при достаточном обосновании по согласованию с ответственным редактором.

При оформлении рукописи применяется полуторный межстрочный интервал, шрифт Times New Roman, кегль 12, выравнивание по обоим краям. Размер полей страницы – 2,5 см со всех сторон. Все страницы, включая список литературы и подписи к рисункам, должны иметь сплошную нумерацию в нижнем правом углу. Страницы с рисунками не нумеруются.

Рукописи подаются в электронном виде в формате MS Word на сайте <http://journals.krc.karelia.ru> либо на e-mail: trudy@krc.karelia.ru, или же представляются в редакцию лично (г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11, каб. 502). К рукописи желательно прилагать два бумажных экземпляра, напечатанных на одной стороне листа формата А4 в одну колонку.

ОБЩИЙ ПОРЯДОК РАСПОЛОЖЕНИЯ ЧАСТЕЙ СТАТЬИ

Элементы статьи должны располагаться в следующем порядке: *УДК* курсивом на первой странице, в левом верхнем углу; заглавие статьи на русском языке заглавными буквами полужирным шрифтом; инициалы, фамилии всех авторов на русском языке полужирным шрифтом; полное название организации – места работы каждого автора в именительном падеже на русском языке курсивом (если авторов несколько и работают они в разных учреждениях, следует отметить арабскими цифрами соответствие фамилий авторов учреждениям, в которых они работают; если все авторы статьи работают в одном учреждении, можно не указывать место работы каждого автора отдельно); аннотация на русском языке; ключевые слова на русском языке; инициалы, фамилии всех авторов на английском языке полужирным шрифтом; название статьи на английском языке заглавными буквами полужирным шрифтом; аннотация на английском языке; ключевые слова на английском языке; текст статьи (статья экспериментального характера, как правило, должны иметь разделы: **Введение. Материалы и методы. Результаты и обсуждение. Выводы** либо **Заключение**); благодарности и указание источников финансирования выполненных исследований; списки литературы: с библиографическими описаниями на языке и алфавите оригинала (**Литература**) и транслитерированный в латиницу с переводом русскоязычных источников на английский язык (**References**); таблицы (на отдельных листах); рисунки (на отдельных листах); подписи к рисункам (на отдельном листе).

На отдельном листе дополнительные сведения об авторах: фамилии, имена, отчества всех авторов полностью на русском и английском языке; полный почтовый адрес каждой организации (страна, город) на русском и английском языке; должности, научные звания, ученые степени авторов; адрес электронной почты для каждого автора; телефон для контактов с авторами статьи (можно один на всех авторов).

ЗАГЛАВИЕ СТАТЬИ должно точно отражать содержание статьи* и состоять из 8–10 значимых слов.

АННОТАЦИЯ** должна быть лишена вводных фраз, создавать возможно полное представление о содержании статьи и иметь объем не менее 200 слов. Рукопись с недостаточно раскрывающей содержание аннотацией может быть отклонена.

Отдельной строкой приводится перечень КЛЮЧЕВЫХ СЛОВ (не менее 5). Ключевые слова или словосочетания отделяются друг от друга точкой с запятой, в конце фразы ставится точка. Слова, фигурирующие в заголовке статьи, ключевыми являться не могут.

Раздел «Материалы и методы» должен содержать сведения об объекте исследования с обязательным указанием латинских названий и сводок, по которым они приводятся, авторов классификаций и пр. Транскрипция географических названий должна соответствовать атласу последнего года издания. Единицы физических величин приводятся по Международной системе СИ. Желательна статистическая обработка всех количественных данных. Необходимо возможно точнее обозначать местонахождения (в идеале – с точным указанием географических координат).

Изложение результатов должно заключаться не в пересказе содержания таблиц и графиков, а в выявлении следующих из них закономерностей. Автор должен сравнить полученную им информацию с имеющейся в литературе и показать, в чем заключается ее новизна. Следует ссылаться на табличный и иллюстративный материал так: на рисунки, фотографии и таблицы в тексте (рис. 1, рис. 2, табл. 1, табл. 2 и т. д.), фотографии, помещаемые на вклейках (рис. I, рис. II). Обсуждение завершается формулировкой в разделе «Заключение» основного вывода, которая должна содержать конкретный ответ на вопрос, поставленный во «Введении». Ссылки на литературу в тексте даются фамилиями, например: Карху, 1990 (один автор); Раменская, Андреева, 1982 (два автора); Крутов и др., 2008 (три автора или более) либо начальным словом описания источника, приведенного в списке литературы, и заключаются в квадратные скобки. При перечислении нескольких источников работы располагаются в хронологическом порядке, например: [Иванов, Топоров, 1965; Успенский, 1982; Erwin et al., 1989; Атлас..., 1994; Longman, 2001].

ТАБЛИЦЫ нумеруются в порядке упоминания их в тексте, каждая таблица имеет свой заголовок. На полях бумажного экземпляра рукописи (слева) карандашом указываются места расположения таблиц при первом упоминании их в тексте. Диаграммы и графики не должны дублировать таблицы. Материал таблиц должен быть понятен без дополнительного обращения к тексту. Все сокращения, использованные в таблице, поясняются в Примечании, расположенном под ней. При повторении цифр в столбцах нужно их повторять, при повторении слов – в столбцах ставить кавычки. Таблицы могут быть книжной или альбомной ориентации (при соблюдении вышеуказанных параметров страницы).

РИСУНКИ представляются отдельными файлами с расширением TIF (* .TIF) или JPG. При первичной подаче материала в редакцию рисунки вставляются в общий текстовый файл. При сдаче материала, принятого в печать, все рисунки из текста статьи должны быть убраны и представлены в виде отдельных файлов в вышеуказанном формате. Графические материалы должны быть снабжены распечатками с указа-

* Названия видов приводятся на латинском языке КУРСИВОМ, в скобках указываются высшие таксоны (семейства), к которым относятся объекты исследования.

** Обращаем внимание авторов, что в связи с подготовкой журнала к включению в международные базы данных библиографических описаний и научного цитирования расширенная аннотация на английском языке, а также транслитерированный в латиницу список использованной литературы приобретают особое значение.

нием желательного размера рисунка, пожеланий и требований к конкретным иллюстрациям. На каждый рисунок должна быть как минимум одна ссылка в тексте. Иллюстрации объектов, исследованных с помощью фотосъемки, микроскопа (оптического, электронного трансмиссионного и сканирующего), должны сопровождаться масштабными линейками, причем в подрисуночных подписях надо указать длину линейки. Приводить данные о кратности увеличения необязательно, поскольку при публикации рисунков размеры изменятся. Крупномасштабные карты желательно приводить с координатной сеткой, обозначениями населенных пунктов и/или названиями физико-географических объектов и разной фактурой для воды и суши. В углу карты желательна врезка с мелкомасштабной картой, где был бы указан участок, увеличенный в крупном масштабе в виде основной карты.

ПОДПИСИ К РИСУНКАМ должны содержать достаточно полную информацию, для того чтобы приводимые данные могли быть понятны без обращения к тексту (если эта информация уже не дана в другой иллюстрации). Аббревиации расшифровываются в подрисуночных подписях.

ЛАТИНСКИЕ НАЗВАНИЯ. В расширенных латинских названиях таксонов не ставится запятая между фамилией авторов и годом, чтобы была понятна разница между полным названием таксона и ссылкой на публикацию в списке литературы. Названия таксонов рода и вида печатаются курсивом. Вписывать латинские названия в текст от руки недопустимо. Для флористических, фаунистических и таксономических работ при первом упоминании в тексте и таблицах приводится русское название вида (если такое название имеется) и полностью – латинское, с автором и желательно с годом, например: водяной ослик (*Asellus aquaticus* (L. 1758)). В дальнейшем можно употреблять только русское название или сокращенное латинское без фамилии автора и года опубликования, например, для брюхоного моллюска *Margarites groenlandicits* (Gmelin 1790) – *M. groenlandicus* или для подвида *M. g. umbilicalis*.

СОКРАЩЕНИЯ. Разрешаются лишь общепринятые сокращения – названия мер, физических, химических и математических величин и терминов и т. п. Все сокращения должны быть расшифрованы, за исключением небольшого числа общеупотребительных.

БЛАГОДАРНОСТИ. В этой рубрике выражается признательность частным лицам, сотрудникам учреждений и фондам, оказавшим содействие в проведении исследований и подготовке статьи, а также указываются источники финансирования работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ. Пристатейные ссылки и/или списки пристатейной литературы следует оформлять по ГОСТ Р 7.0.5-2008. Библиографическая ссылка. Общие требования и правила составления (http://www.bookchamber.ru/GOST_P_7.0.5.-2008). Список работ представляется в алфавитном порядке. Все ссылки даются на языке оригинала (названия на японском, китайском и других языках, использующих нелатинский шрифт, пишутся в русской транскрипции). Сначала приводится список работ на русском языке и на языках с близким алфавитом (украинский, болгарский и др.), а затем – работы на языках с латинским алфавитом. В списке литературы между инициалами ставится пробел.

ТРАНСЛИТЕРИРОВАННЫЙ СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (References). Приводится отдельным списком, повторяя все позиции основного списка литературы. Описание русскоязычных работ указываются в латинской транслитерации, рядом в квадратных скобках помещается их перевод на английский язык. Выходные данные приводятся на английском языке (допускается транслитерация названия издательства). При наличии переводной версии источника можно указать ее библиографическое описание. Описания прочих работ приводятся на языке оригинала. Для составления списка рекомендуется использование бесплатной программы транслитерации на сайте <http://translit.ru/>, вариант VCI.

Внимание! С 2015 года каждой статье, публикуемой в «Трудах Карельского научного центра РАН», редакцией присваивается уникальный идентификационный номер цифрового объекта (DOI) и статья включается в базу данных CrossRef. **Обязательным условием является указание в списках литературы DOI для тех работ, у которых он есть.**

ОБРАЗЕЦ ОФОРМЛЕНИЯ 1-Й СТРАНИЦЫ

УДК 631.53.027.32:635.63

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ ПРЕДПОСЕВНОГО ЗАКАЛИВАНИЯ СЕМЯН НА ХОЛОДОУСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА

Е. Г. Шерудило¹, М. И. Сысоева¹, Г. Н. Алексейчук², Е. Ф. Марковская¹

¹Институт биологии Карельского научного центра РАН

²Институт экспериментальной ботаники НАН Республики Беларусь им. В. Ф. Купревича

Аннотация на русском языке

Ключевые слова: *Cucumis sativus* L.; кратковременное снижение температуры; устойчивость.

E. G. Sherudilo, M. I. Sysoeva, G. N. Alekseichuk, E. F. Markovskaya. EFFECTS OF DIFFERENT REGIMES OF SEED HARDENING ON COLD RESISTANCE IN CUCUMBER PLANTS

Аннотация на английском языке

Key words: *Cucumis sativus* L.; temperature drop; resistance.

ОБРАЗЕЦ ОФОРМЛЕНИЯ ТАБЛИЦЫ

Таблица 2. Частота встречаемости видов нематод в исследованных биотопах

Биотоп (площадка)	Кол-во видов	Встречаемость видов нематод в 5 повторностях				
		100 %	80 %	60 %	40 %	20 %
1Н	26	8	4	1	5	8
2Н	13	2	1	1	0	9
3Н	34	13	6	3	6	6
4Н	28	10	5	2	2	9
5Н	37	4	10	4	7	12

Примечание. Здесь и в табл. 3–4: биотоп 1Н – территория, заливаемая в сильные приливы; 2Н – постоянно заливаемый луг; 3Н – редко заливаемый луг; 4Н – незаливаемая территория; 5Н – периодически заливаемый луг.

ОБРАЗЕЦ ОФОРМЛЕНИЯ ПОДПИСИ К РИСУНКУ

Рис. 1. Северный точильщик (*Hadrobregmus confuses* Kraaz.)

ОБРАЗЕЦ ОФОРМЛЕНИЯ СПИСКА ЛИТЕРАТУРЫ

Ссылки на книги

Вольф Г. Н. Дисперсия оптического вращения и круговой дихроизм в органической химии / Ред. Г. Снатцке. М.: Мир, 1970. С. 348–350.

Патрушев Л. И. Экспрессия генов. М.: Наука, 2000. 830 с.

Knorre D. G., Laric O. L. Theory and practice in affinity techniques / Eds. P. V. Sundaram, F. L. Eckstein. N. Y., San Francisco: Acad. Press, 1978. P. 169–188.

B References:

Vol'f G. N. Dispersiya opticheskogo vrashheniya i krugovoj dikhroizm v organicheskoy khimii [Optical rotatory dispersion and circular dichroism in Organic Chemistry]. Ed. G. Snattske. Moscow: Mir, 1970. P. 348–350.

Patrushev L. I. Ekspressiya genov [Gene expression]. Moscow: Nauka, 2000. 830 p.

Knorre D. G., Laric O. L. Theory and practice in affinity techniques. Eds. P. V. Sundaram, F. L. Eckstein. N. Y., San Francisco: Acad. Press, 1978. P. 169–188.

Ссылки на статьи

Викторов Г. А. Межвидовая конкуренция и сосуществование экологических гомологов у паразитических перепончатокрылых // Журн. общ. биол. 1970. Т. 31, № 2. С. 247–255.

Grove D. J., Loisesides L., Nott J. Satiation amount, frequency of feeding and emptying rate in *Salmo gairdneri* // J. Fish. Biol. 1978. Vol. 12, No 4. P. 507–516.

Noctor G., Queval G., Mhamdi A., Chaouch A., Foyer C. H. Glutathione // Arabidopsis Book. American Society of plant Biologists, Rockville, MD. 2011. doi:10.1199/tab.0142.

B References:

Viktorov G. A. Mezvidovaya konkurentsiya i sosushhestvovanie ehkologicheskikh gomologov u paraziticheskikh pereponchatokrylykh [Interspecific competition and coexistence ecological homologues in parasitic Hymenoptera]. Zhurn. obshh. biol. 1970. Vol. 31, No 2. P. 247–255.

Grove D. J., Loisesides L., Nott J. Satiation amount, frequency of feeding and emptying rate in *Salmo gairdneri*. J. Fish. Biol. 1978. Vol. 12, No 4. P. 507–516.

Noctor G., Queval G., Mhamdi A., Chaouch A., Foyer C. H. Glutathione. Arabidopsis Book. American Society of plant Biologists, Rockville, MD. 2011. doi:10.1199/tab.0142.

Ссылки на материалы конференций

Марьинских Д. М. Разработка ландшафтного плана как необходимое условие устойчивого развития города (на примере Тюмени) // Экология ландшафта и планирование землепользования: тезисы докл. Всерос. конф. (Иркутск, 11–12 сент. 2000 г.). Новосибирск, 2000. С. 125–128.

B References:

Mar'inskikh D. M. Razrabotka landshaftnogo plana kak neobkhodimoe uslovie ustoichivogo razvitiya goroda (na primere Tyumeni) [Landscape planning as a necessary condition for sustainable development of a city (example of Tyumen)]. *Ekologiya landshafta i planirovanie zemlepol'zovaniya: tezisy dokl. Vseros. konf. (Irkutsk, 11–12 sent. 2000 g.)* [Landscape ecology and land-use planning: abstracts of all-Russian conference (Irkutsk, Sept. 11–12, 2000)]. Novosibirsk, 2000. P. 125–128.

Ссылки на диссертации или авторефераты диссертаций

Шефтель Б. И. Экологические аспекты пространственно-временных межвидовых взаимоотношений землероек Средней Сибири: дис. ... канд. биол. наук. М., 1985. С. 21–46.

B References:

Sheftel' B. I. *Ekologicheskie aspekty prostranstvenno-vremennykh mezhhvidovykh vzaimootnoshenii zemlerоек Srednei Sibiri* [Ecological aspects of spatio-temporal interspecies relations of shrews of Middle Siberia]: PhD Diss. (Biol.). Moscow, 1985. P. 21–46.

Ссылки на патенты

Патент РФ № 2000130511/28.04.12.2000.

Еськов Д. Н., Серегин А. Г. Оптико-электронный аппарат // Патент России № 2122745. 1998. Бюл. № 33.

B References:

Patent RF № 2000130511/28. 04.12.2000 [Russian patent No 2000130511/28. December 4, 2000].

Es'kov D. N., Seregin A. G. *Optiko-elektronnyi apparat* [Optoelectronic apparatus]. Patent Rossii № 2122745 [Russian patent No 2122745]. 1998. Bulletin No 33.

Ссылки на архивные материалы

Гребенщиков Я. П. К небольшому курсу по библиографии: материалы и заметки, 26 февр. – 10 марта 1924 г. // ОР РНБ. Ф. 41. Ед. хр. 45. Л. 1–10.

B References:

Grebenshchikov Ya. P. *K nebol'shomu kursu po bibliografii: materialy i zametki, 26 fevr. – 10 marta 1924 g.* [Brief course on bibliography: the materials and notes, Febr. 26 – March 10, 1924]. OR RNB. F. 41. St. un. 45. L. 1–10.

Ссылки на интернет-ресурсы

Паринов С. И., Ляпунов В. М., Пузырев Р. Л. Система Соционет как платформа для разработки научных информационных ресурсов и онлайн-сервисов // Электрон. б-ки. 2003. Т. 6, вып. 1. URL: <http://www.elbib.ru/index.phtml?page=elbib/rus/journal/2003/part1/PLP/> (дата обращения: 25.11.2006).

Демография. Официальная статистика / Федеральная служба государственной статистики [Электронный ресурс]. URL: <http://www.gks.ru/> (дата обращения: 25.12.2015).

B References:

Parinov S. I., Lyapunov V. M., Puzyrev R. L. *Sistema Sotsionet kak platforma dlya razrabotki nauchnykh informatsionnykh resursov i onlainovykh servisov* [Socionet as a platform for development of scientific information resources and online services]. *Elektron. b-ki [Digital library]*. 2003. Vol. 6, iss. 1. URL: <http://www.elbib.ru/index.phtml?page=elbib/rus/journal/2003/part1/PLP/> (accessed: 25.11.2006).

Demografija. *Oficial'naja statistika* [Demography. Official statistics]. *Federal'naja sluzhba gosudarstvennoj statistiki* [Federal state statistics service]. URL: <http://www.gks.ru/> (accessed: 25.12.2015).

Ссылки на электронные ресурсы на CD-ROM

Государственная Дума, 1999–2003 [Электронный ресурс]: электронная энциклопедия / Аппарат Гос. Думы Федер. Собрания Рос. Федерации. М., 2004. 1 CD-ROM.

B References:

Gosudarstvennaya Duma, 1999–2003 [State Duma, 1999–2003]. Electronic encyclopedia. The office of the State Duma of the Federal Assembly of the Russian Federation. Moscow, 2004. 1 CD-ROM.

TABLE OF CONTENTS

REVIEWS

P. N. Kravchenko , E. K. Oleinik. MECHANISMS OF IMMUNOLOGICAL TOLERANCE DISRUPTION . . .	3
--	---

ORIGINAL PAPERS

Yu. V. Venzhik, A. F. Titov, E. S. Kholoptseva, V. V. Talanova. SEPARATE AND COMBINED EFFECTS OF LOW TEMPERATURE AND CADMIUM ON SOME PHYSIOLOGICAL INDICATORS IN WHEAT	23
--	----

N. P. Chernobrovkina, E. V. Robonen. NITROGEN, BORON AND AMINO ACID LEVELS IN THE NEEDLES OF SCOTS PINE SEEDLINGS WITH CONTROLLED NITROGEN AND BORON SUPPLY . . .	35
---	----

L. V. Topchieva, V. V. Talanova, A. F. Titov, I. A. Nilova, N. S. Repkina, Yu. V. Venzhik. EFFECT OF LOW AND HIGH HARDENING AND DAMAGING TEMPERATURES ON THE TRANSCRIPTION LEVEL OF <i>BI-1</i> GENE IN WHEAT	45
---	----

I. A. Nilova, L. V. Topchieva, A. F. Titov. HSP GENE EXPRESSION IN WHEAT UNDER HEAT STRESS . . .	55
--	----

V. K. Bolondinsky, L. M. Vilikainen. RESEARCH OF RESPIRATION OF TWIGS AND STEMS IN KARELIAN BIRCH AND SILVER BIRCH	66
--	----

A. A. Ipatov, I. N. Bakhmet, D. A. Yekimov, N. A. Kuldin. AUTOMATIC EARLY WARNING DEVICE FOR ENVIRONMENTAL RISKS AT WATERBODIES AND ITS TRIALS	80
--	----

S. P. Rozhkov, A. S. Goryunov. PROTEIN SOLUTION PHASE DIAGRAMS AND PROTEIN MOLECULE STRUCTURAL TRANSITIONS	87
--	----

S. P. Rozhkov, A. S. Goryunov. THERMODYNAMIC AFFINITY FOR SOLVENT AS A CRITERION OF CRITICAL SOLUTION TEMPERATURES OF PROTEIN MACROMOLECULES	96
--	----

I. M. Dzyubuk, A. E. Kuritsyn, S. A. Efremov, T. A. Makarova. BIOLOGICAL EFFICIENCY OF THE DEVICE FOR TEMPERATURE COMPENSATION IN CAGE TROUT FARMING	101
--	-----

T. G. Shibaeva, E. G. Sherudilo, E. N. Ikkonen, A. F. Titov. THE EFFECT OF A DAILY SHORT-TERM TEMPERATURE DROP ON THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN CUCUMBER LEAVES OF VARIOUS AGES	107
--	-----

V. K. Golovanov, G. M. Chuiko, V. A. Podgornaya, E. I. Golovkina, N. S. Nekrutov. DYNAMICS OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY AND WATER-SOLUBLE PROTEINS IN THE BRAIN OF FISH AT DIFFERENT HEATING RATES IN THE SUMMER SEASON	116
---	-----

E. M. Matveeva, A. A. Sushchuk, D. S. Kalinkina. EXPERIMENTAL STUDY OF POPULATION PARAMETERS OF PHYTOTROPHIC NEMATODES DURING THE GROWING SEASON UNDER THE INFLUENCE OF HEAVY METALS	124
--	-----

SHORT COMMUNICATIONS

T. V. Tarelkina, L. L. Novitskaya, N. A. Galibina. THE CONTENT OF SOLUBLE SUGARS IN TRUNK TISSUES OF BIRCH, ALDER AND ASPEN IN AN EXPERIMENT WITH EXOGENOUS SUCROSE	135
---	-----

K. A. Hmara. THE CONTENT OF PLANT HORMONES IN CALLUS TISSUE DURING THE INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN EMBRYOS OF NORWAY SPRUCE (<i>PICEA ABIES</i> [L.] KARST.)	142
---	-----

CHRONICLE

A. F. Titov, N. M. Kaznina. VIII Congress of the Russian Society of Plant Physiologists and All-Russian sci. conf. "Plants under global and local natural-climatic and human impacts" (Petrozavodsk, September 21–26, 2015) 149

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS 152

Научное издание

**Труды Карельского научного центра
Российской академии наук**
№ 12, 2015

Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

*Печатается по решению
Президиума Карельского научного центра РАН*

Свидетельство о регистрации СМИ ПИ № ФС77-48848 от 02.03.2012 г.
выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи,
информационных технологий и массовых коммуникаций

Редактор А. И. Мокеева
Оригинал-макет Г. О. Предтеченский

Подписано в печать 25.12.2015. Формат 60x84¹/₈.
Гарнитура Pragmatica. Печать офсетная. Уч.-изд. л. 17,7. Усл. печ. л. 18,6.
Тираж 500 экз. Заказ 331.

Карельский научный центр РАН
Редакционно-издательский отдел
185003, г. Петрозаводск, пр. А. Невского, 50