

Карельский научный центр
Российской академии наук

ТРУДЫ

КАРЕЛЬСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

№ 11, 2016

Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

Петрозаводск
2016

Научный журнал
Труды Карельского научного центра
Российской академии наук
№ 11, 2016
Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

Scientific Journal
Transactions of the Karelian Research Centre of the
Russian Academy of Sciences
№ 11, 2016
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. М. КАЛИНКИНА, д. б. н.; О. Н. ЛЕБЕДЕВА, к. б. н., доцент; Е. М. МАТВЕЕВА, к. б. н.; Н. Н. НЕМОВА (отв. редактор), чл.-корр. РАН, д. б. н., проф.; 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.), Prof.; N. M. KALINKINA, DSc (Biol.); O. N. LEBEDEVA, PhD (Biol.), Assistant Prof.; E. M. MATVEEVA, PhD (Biol.); Assistant Prof.; N. N. NEMOVA (Editor-in-Charge), RAS Corr. Fellow, DSc (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)

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, 2016
© Институт биологии Карельского
научного центра РАН, 2016
© Институт леса Карельского научного
центра РАН, 2016

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.154+575.224.46: 582.542.1.

ГЕНОМНЫЙ ИМПРИНТИНГ У F_1 -ГИБРИДНЫХ ПОТОМСТВ *FESTUCA PRATENSIS* HUDS. С СУПРЕССИРОВАННОЙ ТЕМПЕРАТУРОЗАВИСИМОЙ ХЛОРОФИЛЛДЕФЕКТНОСТЬЮ

О. Н. Лебедева, Т. С. Николаевская, А. Ф. Титов

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Показаны особенности проявления мутантного гена и гена-супрессора, контролирующую температурозависимую супрессированную хлорофиллдефектность у F_1 -гибридных потомств *F. pratensis* L., полученных в результате реципрокных скрещиваний материнских растений различных фенотипов, и роль этих генов в формировании эпигенетической изменчивости растительных организмов. У F_1 -гибридных потомств, сформированных в реципрокных скрещиваниях, мутантный ген может проявлять как одинаковый, так и разный геномный импринтинг. Различия в эффекте зависели от глубины хлорофилльного дефекта проростков при десупрессии и модифицирующего действия гена-супрессора при ресупрессии. Мутантный ген, контролирующий более глубокие типы депигментации X, A и их комбинированные фенотипы, не несет специфического «отпечатка» пола родителя, т. е. отцовские и материнские гены проявляют одинаковый геномный импринтинг. У F_1 -гибридных потомств с менее выраженной депигментацией проявляется материнский или отцовский эффект: для растений с фенотипами V, VN проявляется материнский, а у *w-type* и XV – отцовский эффект. Ген-супрессор обладает мультипликативным действием, не только подавляя фенотипическое проявление мутантного гена, контролирующего температурозависимую хлорофиллдефектность, но и маскируя разный геномный импринтинг у отдельных F_1 -гибридных фенотипов.

Ключевые слова: супрессированная температурозависимая хлорофиллдефектность; де- и ресупрессия; *Festuca pratensis* Huds.; F_1 -гибридные потомства; геномный импринтинг.

O. N. Lebedeva, T. S. Nikolaevskaya, A. F. Titov. GENOMIC IMPRINTING IN F_1 HYBRID PROGENIES OF *FESTUCA PRATENSIS* HUDS. WITH SUPPRESSED TEMPERATURE-DEPENDENT CHLOROPHYLL DEFECTS

We demonstrate patterns in the penetrance of the mutant gene and the suppressor gene which control suppressed temperature-dependent chlorophyll defects in F_1 hybrid progenies of *F. pratensis* L. obtained through reciprocal crossings of mother plants of different phenotypes, and the contributions of these genes to the epigenetic variation of plant

organisms. In F_1 hybrid progenies from reciprocal crossings the mutant gene may demonstrate either the same or differential genomic imprinting. Variations of the effect depended on the degree of the chlorophyll defect in the seedlings at desuppression and the modifying action of the suppressor gene at resuppression. Furthermore, the suppressor gene had a multiplier effect, as it not only suppressed the penetrance of the mutant gene that controlled temperature-dependent chlorophyll defects but also masked the different genomic imprinting in individual F_1 hybrid phenotypes.

Key words: suppressed temperature-dependent chlorophyll defects; de- and resuppression; *Festuca pratensis* Huds.; F_1 hybrid progenies; genomic imprinting.

Введение

У большинства организмов при реципрокных скрещиваниях основная масса наследственных признаков, как правило, подчиняется определенной закономерности: ген проявляет свои свойства в фенотипе потомства вне зависимости, от какого из родителей он унаследован. Это явление было открыто еще Г. Менделем в опытах на горохе и получило название «принципа эквивалентности» [Mendel, 1866]. Однако ряд признаков не подчиняются данной закономерности и управляются так называемым геномным импринтингом. Термин «импринтинг» (imprint – отпечаток) впервые предложил в 1960 г. Х. Кроуз из Колумбийского университета США для описания селективной элиминации отцовских хромосом у насекомых. Геномный импринтинг является генетическим феноменом, при котором определенные гены подлежат экспрессии особым образом: фенотипическое проявление отдельных отцовских и материнских генов, передаваемых потомству, может нести специфический «отпечаток» одного из родителей. В этом случае для экспрессии гена важно, от кого из родителей он унаследован. Теоретически любой ген может быть затронут геномным импринтингом и оба родителя могут передавать потомкам совершенно идентичные гены. Однако при разном импринтинге (материнском или отцовском) действие идентичных генов будет неодинаковым. Важно и то, что эти отличия носят временный характер, т. е. проявляются на протяжении одного или нескольких поколений и постепенно могут исчезать [Сапиенца, 1990]. Таким образом, геномный импринтинг – эпигенетически обусловленная избирательная экспрессия только одного из аллельных генов, наследуемых от родителей.

Молекулярные механизмы геномного импринтинга у растений изучают на модельных объектах (чаще других используя *Arabidopsis thaliana* L.), проводя скрининг мутантов с измененными морфологическими признаками и физиолого-биохимическими

особенностями [Chaudhury et al., 1997; Grosniklaus et al., 1998; Luo et al., 1999; Vielle-Calzada et al., 1999]. Наряду с изучением молекулярных механизмов оценка фенотипического проявления отдельных признаков у потомств, полученных от реципрокных скрещиваний растений с хлорофиллдефектностью, также представляется продуктивным подходом в изучении геномного импринтинга.

Целью настоящего исследования явилось изучение у *Festuca pratensis* L. фенотипического проявления мутантного гена и гена-супрессора, контролирующего температурозависимую супрессированную хлорофиллдефектность (генетическая модель), и роли в ней генов, получаемых от матери и от отца, на основе анализа частоты хлорофиллдефектных проростков при де- и ресупрессии у F_1 -гибридных потомств, полученных в результате реципрокных скрещиваний растений различных фенотипов (дикого типа и депигментированных).

Материалы и методы

Материалом для проведения настоящего исследования послужило семенное потомство (F_1 -гибриды) овсяницы луговой (*Festuca pratensis* L., $2n = 14$), полученное в реципрокных скрещиваниях растений-ревертантов, маркированных в ювенильной фазе развития по степени хлорофилльного дефекта и механизму и скорости восстановления пигментации проростка – функциональные ревертанты. В дальнейшем растения высаживали в поле и культивировали в течение шести лет в виде клонов (всего 110). Каждый клон состоял из восьми растений, полученных методом деления материнских двухлетних особей. В полевом эксперименте проводили принудительные скрещивания растений-ревертантов: одно из растений каждого фенотипа помещали под изолятор вместе с растением другого фенотипа, всего 105 вариантов скрещиваний.

В дальнейшем в лабораторных условиях на проростках, выращенных из семян F_1 -потомств, полученных от реципрокных скрещиваний,

Таблица 1. Частота хлорофиллдефектных проростков у F_1 -гибридных потомств *F. pratensis*, сформированных в реципрокных скрещиваниях, при де- и ресупрессии

Тип скрещивания ♀ × ♂	Фенотип и количество проростков		Соотношение фактически полученных фенотипов	Значение χ^2 при $p < 0,05$	Частота хлорофиллдефектных проростков	
	зеленый	хлорофиллдефектный			десупрессия	ресупрессия
N (1) × f	212	768	1:3	5,93	0,64	0,67
f × N (1)	163	643	1:3	9,81	0,80	0,62
V (2) × f	139	815	1:6	0,06	0,85	0,60
f × V (2)	203	618	1:3	0,03	0,75	0,56
VN (5) × f	314	356	1:1	2,76	0,53	0,40
f × VN (5)	220	146	2:1	7,08	0,40	0,30
XV (3) × f	203	293	1:2	12,9	0,59	0,49
f × XV (3)	164	580	1:3	3,47	0,78	0,68
X (8) × f	187	465	1:3	4,71	0,71	0,53
f × X (8)	207	581	1:3	0,68	0,74	0,58
A (4) × f	115	280	1:3	3,57	0,71	0,60
f × A (4)	239	518	1:2	1,06	0,68	0,51
XN (7) × f	178	462	1:3	2,70	0,72	0,65
f × XN (7)	129	354	1:3	0,75	0,73	0,56
VX (6) × f	242	487	1:2	0,01	0,66	0,47
f × VX (6)	265	487	1:2	1,23	0,65	0,42

Примечание. Различия в частотах зеленый/хлорофиллдефектный фенотип значимы при $p < 0,05$ $\chi^2 < 3,34$. Здесь и далее различия в частотах хлорофиллдефектных проростков F_1 -гибридных потомств, сформированных в реципрокных скрещиваниях, значимы при $p < 0,05$ (маркированы полужирным шрифтом); f – растения различных фенотипов, участвующих в скрещиваниях.

анализировали вклад отцовских и материнских генов (мутантного гена и гена-супрессора) в частоту появления хлорофиллдефектных проростков в условиях де- и ресупрессии.

Генетическая оценка де- и ресупрессии проростков овсяницы луговой проводилась при проращивании семян в условиях фитотрона в течение 10 сут при непрерывном освещении ($96-120 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) и температуре $35 \text{ }^\circ\text{C}$. В массиве проростков регистрировали зеленые (*w-type* или *norma*, N) и депигментированные растения (V – виридис; X – ксанта; A – альбина; VN – виридо-норма; VX – виридо-ксанта; XN – ксанта-норма; XV – ксанта-виридис). Депигментированные проростки восстанавливали полностью или частично зеленую окраску листа через 4 сут при снижении температуры до $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (функциональная реверсия). Подсчитывали количество зеленых и депигментированных проростков при $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (десупрессия) и $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (частично или полностью восстановивших окраску листа до зеленой – ресупрессия). Обозначения фенотипов образовывались из начальных латинских букв соответствующего типа депигментации, знака «>» и начальных букв соответствующего типа восстановления (например, V > N, V > VX).

Депигментированные проростки восстанавливали зеленую окраску листа (ресупрессия)

с различной скоростью и двумя путями: через реверсию и репопуляцию. Быстрое восстановление путем реверсии происходило при культивировании проростков в течение последующих 4 сут или медленно – более 4 сут, и только при $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Восстановление окраски проростка до *w-type* происходило также через репопуляцию клеток базальной части проростка. При этом быстрое восстановление наблюдалось уже на 7-е сут при температуре $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Медленная репопуляция, так же как и медленная реверсия, происходила при $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Зафиксированы различные сочетания скорости и механизмов восстановления (быстрая реверсия – медленная реверсия и быстрая репопуляция – медленная репопуляция), что позволило выделить несколько фенотипических групп проростков.

Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано, что генетическая основа температурозависимой хлорофиллдефектности представлена системой, включающей мутантный ген и ген-супрессор и проявляющейся фенотипически как при подавленной функции гена-супрессора, так при ее восстановлении [Лебедева и др., 2012].

Генетический анализ хлорофиллдефектности F_1 -гибридных потомств, сформированных

Таблица 2. Частота 14-дневных проростков F_1 -гибридных потомств *F. pratensis* при восстановлении пигментации (ресупрессия) с разным импринтингом при десупрессии

Тип и механизм восстановления	Фенотипы гибридных потомств								Среднее по показателю
	N (1) × f	f × N (1)	V (2) × f	f × V (2)	VN (5) × f	f × VN (5)	XV (3) × f	f × XV (3)	
Полное восстановление до <i>w-type</i>	0,24	0,22	0,30	0,26	0,25	0,26	0,17	0,13	0,22
Частичное восстановление	0,41	0,49	0,40	0,49	0,54	0,49	0,53	0,46	0,48
Отсутствие восстановления	0,35	0,29	0,30	0,25	0,21	0,25	0,30	0,41	0,30
Всего	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Реверсия быстрая (V>N, X>N, X>V, A>N, A>V)	0,22	0,13	0,36	0,31	0,28	0,21	0,20	0,22	0,24
Реверсия медленная (V>V>N, X>X>N, A>A>N)	0,60	0,67	0,51	0,63	0,35	0,63	0,75	0,76	0,61
Репопуляция быстрая (VN>VN, XN>XN, XV>XV)	0,16	0,17	0,07	0,03	0,34	0,14	0,04	0,01	0,13
Репопуляция медленная (V>VN, X>XN, X>XV, A>AN, A>AV)	0,02	0,03	0,06	0,02	0,03	0,02	0,01	0	0,02

Таблица 3. Частота 14-дневных проростков F_1 -гибридных потомств *F. pratensis* при восстановлении пигментации (ресупрессия) с одинаковым импринтингом при десупрессии

Тип и механизм восстановления	Фенотипы гибридных потомств								Среднее по показателю
	X (8) × f	f × X (8)	A (4) × f	f × A (4)	XN (7) × f	f × XN (7)	VX (6) × f	f × VX (6)	
Полное восстановление до <i>w-type</i>	0,26	0,22	0,15	0,25	0,10	0,23	0,29	0,34	0,23
Частичное восстановление	0,44	0,50	0,57	0,46	0,60	0,41	0,41	0,40	0,47
Отсутствие восстановления	0,30	0,28	0,28	0,29	0,30	0,36	0,30	0,26	0,30
Всего	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Реверсия быстрая (V>N, X>N, X>V, A>N, A>V)	0,25	0,09	0,18	0,21	0,06	0,19	0,27	0,35	0,20
Реверсия медленная (V>V>N, X>X>N, A>A>N)	0,56	0,66	0,78	0,58	0,85	0,48	0,53	0,52	0,62
Репопуляция быстрая (VN>VN, XN>XN, XV>XV)	0,11	0,21	0,03	0,15	0,09	0,17	0,14	0,11	0,13
Репопуляция медленная (V>VN, X>XN, X>XV, A>AN, A>AV)	0,08	0,04	0,01	0,06	0	0,16	0,06	0,02	0,05

в реципрокных скрещиваниях, показал, что доля депигментированных проростков в экспериментальном пуле составляет у отдельных потомств $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$, $\frac{1}{6}$. Ген-супрессор проявляет нестойкое доминирование, и, как следствие, у отдельных гибридных потомств наблюдается различное соотношение частот фенотипов

с зеленой и хлорофиллдефектной окраской листа проростков (табл. 1).

Изучение эпигенетической составляющей температурозависимой супрессированной хлорофиллдефектности при десупрессии показало следующее. Частоты хлорофиллдефектных проростков у F_1 -гибридных потомств

в одних парах реципрокных скрещиваний близки по значению (для фенотипов X, A, XN, VX), а в других отличаются на 10–20% (для фенотипов N, V, VN, XV). Полученные данные позволили заключить, что мутантный ген, контролирующий более глубокие типы депигментации X, A и их комбинированные фенотипы, не несет специфического «отпечатка» пола родителя, т. е. отцовские и материнские гены передают потомкам совершенно идентичные гены и проявляют одинаковый геномный импринтинг.

Для другой группы F_1 -гибридных потомств с менее выраженной депигментацией (V, VN, XV) и *w-type* проявляется материнский или отцовский эффекты: у них величина пула депигментированных проростков при десупрессии у потомств от реципрокных скрещиваний различна. В этом случае для экспрессии мутантного гена важно, от которого из родителей он унаследован. Для F_1 -гибридных потомств с мутантными фенотипами (V, VN) проявляется материнский эффект (увеличение частоты депигментированных проростков), а у *w-type* и XV – отцовский эффект. При разном импринтинге (материнском или отцовском) действие идентичных генов неодинаково, и величина пула депигментированных проростков у них различна (табл. 1).

В условиях ресупрессии, когда функциональная активность гена-супрессора восстановлена, у F_1 -гибридных потомств, для которых проявляется одинаковый импринтинг – отсутствие специфического «отпечатка» пола родителя, расширился спектр фенотипов: X, A, XN, VX, V и *w-type*. Эффект различного геномного импринтинга мутантного гена, выявленный при десупрессии, сохраняется при ресупрессии лишь для F_1 -гибридных потомств с комбинированными фенотипами (ранние ревертанты): VN, XV (табл. 1).

Выявлены также и особенности действия гена-супрессора в отношении механизмов и скорости восстановления пигментации F_1 -гибридных потомств при ресупрессии (табл. 2, 3). Средние значения показателей, характеризующих восстановление пигментации (полное и частичное) в двух группах F_1 -гибридных потомств с одинаковым и разным импринтингом при десупрессии, не отличаются друг от друга. Отмечены различия в частотах при восстановлении пигментации проростков: при полном и частичном восстановлении для фенотипов A (медленная реверсия) и XN (быстрая и медленная реверсия; медленная репопуляция); для фенотипов X (быстрая и медленная реверсия,

быстрая репопуляция) (табл. 3). Фенотипы этих F_1 -гибридных потомств характеризуются различным импринтингом (материнским или отцовским).

Заключение

Результаты проведенного исследования позволили выявить сложную картину регуляции экспрессии мутантного гена и гена-супрессора, контролирующих температурозависимую супрессированную хлорофиллдефектность у *Festuca pratensis*. У F_1 -гибридных потомств, сформированных в реципрокных скрещиваниях, мутантный ген, контролирующий температурозависимую супрессированную хлорофиллдефектность, может проявлять как одинаковый, так и разный геномный импринтинг (т. е. зависимость экспрессии мутантного гена от пола родителей). Различия в эффекте (одинаковый или разный геномный импринтинг) зависели от глубины хлорофилльного дефекта проростков при десупрессии и модифицирующего действия гена-супрессора при ресупрессии в отношении как частоты депигментированных проростков, так и механизмов восстановления их пигментации. При этом ген-супрессор обладает мультипликативным действием, не только подавляя фенотипическое проявление мутантного гена, контролирующего температурозависимую хлорофиллдефектность, но и маскируя разный геномный импринтинг у отдельных F_1 -гибридных фенотипов. Используемая в данной работе генетическая модель «супрессированной хлорофиллдефектности» позволила получить новые сведения для понимания сложных механизмов эпигенетической изменчивости у растительных организмов, в частности геномного импринтинга, и роли в ней генов-супрессоров.

Литература

- Лебедева О. Н., Николаевская Т. С., Титов А. Ф., Федоренко О. М. Биологические особенности северных популяций многолетних злаков. Генетический груз и выживаемость / Под общ. ред. А. Ф. Титова. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2012. 261 с.
- Сапиенца К. Геномный импринтинг // В мире науки. 1990. № 12. С. 14–20.
- Chaudhury A. M., Ming L., Miller C. et al. Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1997. Vol. 94. P. 4223–4228.
- Grossniklaus U., Vielle-Calzada J. P., Hoepfner M. A., Gagliano W. B. Maternal control of embryogenesis by *meade* a polycomb group gene in *Arabidopsis* // Science. 1998. Vol. 280. P. 446–450.

Luo M., Bilodeau P., Koltunow A. et al. Genes controlling fertilization-in-dependent seed development in *Arabidopsis thaliana* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. P. 296–301.

Mendel G. Versuche über Pflanzen-Hybriden // Verhandlung des naturforschenden Vereines Brunn. 1866. Vol. IV. P. 67–112.

Vielle-Calzada J. P., Thomas J., Spillane C. et al. Maintenance of genomic imprinting at the Arabidopsis medea locus requires zygotic ddml activity // Genes Dev. 1999. Vol. 13, no. 22. P. 2971–2982.

Поступила в редакцию 11.02.2016

References

Lebedeva O. N., Nikolaevskaya T. S., Titov A. F., Fedorenko O. M. Biologicheskie osobennosti severnykh populyatsii mnogoletnikh zlakov. Geneticheskii gruz i vyzhivaemost' [Biological peculiarities of northern populations of perennial cereals. Genetic load and survival]. Ed. A. F. Titov. Petrozavodsk: KarRC of RAS, 2012. 261 p.

Sapientsa K. Genomnyi imprinting [Genomic imprinting]. *V mire nauki* [In the World of Science]. 1990. No. 12. P. 14–20.

Chaudhury A. M., Ming L., Miller C., Craig S., Dennis E. S., Peacock W. J. Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1997. Vol. 94. P. 4223–4228.

Grossniklaus U., Vielle-Calzada J. P., Hoepfner M. A., Gagliano W. B. Maternal control of embryogenesis by medea a polycomb group gene in *Arabidopsis*. *Science*. 1998. Vol. 280. P. 446–450.

Luo M., Bilodeau P., Koltunow A., Dennis E. S., Peacock W. J., Chaudhury A. M. Genes controlling fertilization-in-dependent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1999. Vol. 96. P. 296–301.

Mendel G. Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verhandlung des naturforschenden Vereines Brunn*. 1866. Vol. IV. P. 67–112.

Vielle-Calzada J. P., Thomas J., Spillane C., Coluccio A., Hoepfner M. A., Grossniklaus U. Maintenance of genomic imprinting at the Arabidopsis medea locus requires zygotic ddml activity. *Genes Dev*. 1999. Vol. 13, no. 22. P. 2971–2982.

Received February 11, 2016

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Лебедева Ольга Николаевна

зам. директора по научной работе, руководитель лаборатории генетики, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: lebedeva@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 774682

Николаевская Татьяна Сергеевна

старший научный сотрудник лаб. генетики, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: nicoltn@mail.ru
тел.: (8142) 573107

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:

Lebedeva, Olga

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: lebedeva@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 774682

Nikolaevskaya, Tatiana

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: nicoltn@mail.ru
tel.: (8142) 573107

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 575.174.015.3

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ПОПУЛЯЦИОННАЯ СТРУКТУРА ВИДА *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) НЕУНН. ОСТРОВА ВАЛААМ

М. В. Зарецкая, О. М. Федоренко

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Представлены результаты изучения генетического разнообразия и популяционной структуры *Arabidopsis thaliana* острова Валаам с целью выявления молекулярно-генетических механизмов и микроэволюционных процессов в условиях изоляции вида на острове, представляющем северную периферию его ареала. Оценена вариабельность 95 RAPD-локусов растений из четырех локальных мест произрастания их на острове. Выявлен повышенный уровень генетического разнообразия изученных групп растений (средние значения $P_{95\%} = 29,2\%$ и $H_{\text{exp}} = 0,092$) по сравнению с другими самоопылителями. Однако генетическая изменчивость *A. thaliana* Валаама оказалась ниже по сравнению с континентальными популяциями арабидопсиса Карелии, проанализированными ранее. Предполагается, что это связано с расположением острова в более южных широтах и более мягким его климатом, а также может зависеть от низкой интенсивности миграционного потока генов с материка из-за изолированного положения вида на острове. Выявлен высокий уровень генетического сходства по Нею изученных групп растений (среднее $I_N = 0,949$). С помощью статистик генного разнообразия Нея установлено, что на межгрупповую изменчивость (G_{ST}) приходится 39,0 % общего генного разнообразия, что невелико для инбредных видов. Полученные данные позволяют предположить, что вид *A. thaliana* представлен на Валааме единой подразделенной популяцией, в которой отдельные субпопуляции связаны между собой миграционными взаимодействиями. Такая популяционная структура противодействует инбридингу, присутствующему в природных популяциях ограниченной численности, и способствует сохранению генетического разнообразия, которое является основой адаптации и выживания популяций.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana* (L.); генетическое разнообразие; RAPD-маркеры; генетическая структура популяций; поток генов.

M. V. Zaretskaya, O. M. Fedorenko. GENETIC DIVERSITY AND POPULATION STRUCTURE OF THE SPECIES *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. ON VALAAM ISLAND

The genetic diversity and population structure of *Arabidopsis thaliana* on Valaam Island was investigated. The purpose of the study was to detect the molecular genetic mechanisms and microevolutionary processes in insulate populations of *A. thaliana* on an island lying in the northern periphery of the species range. The variability at 95 RAPD-loci was evaluated in *A. thaliana* from four localities on the island. A higher level of genetic diversity was revealed (average value $P_{99\%} = 29.2\%$; $H_{\text{exp}} = 0.092$) in comparison with other self-pollinators. The genetic variability of *A. thaliana* on Valaam was however lower than

in previously investigated mainland populations of *Arabidopsis* in Karelia. This fact is supposedly due to the island's southerner location and milder climate, and may also depend on the low rate of gene migration from the mainland because of the species' isolation on the island. The level of Nei's genetic similarity of the studied groups of plants was high (average $I_N = 0.949$). Nei's gene diversity statistics showed that 39.0 % of the total gene diversity was explained by between-group variability (G_{ST}), which is quite low for inbred species. The findings allow to suggest that the species *A. thaliana* on Valaam is one but segregated population where subpopulations are connected to one another by migratory interactions. This population structure counteracts inbreeding, which happens in isolated populations of limited size, and contributes to the preservation of genetic diversity, which is essential for adaptation and survival of populations.

Key words: *Arabidopsis thaliana* (L.); genetic diversity; RAPD-markers; genetic structure of populations; gene flow.

Введение

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. – наиболее изученный объект генетики растений, который, благодаря информации о нуклеотидной последовательности генома и широкому ареалу обитания, стал широко использоваться в популяционно-генетических и молекулярно-генетических исследованиях во всем мире. Однако экспериментальные исследования проводятся в основном на лабораторных гомозиготных линиях. Изучение природных популяций этого модельного вида имеет важное значение для использования богатства и уникальности их генетического разнообразия в последующих экспериментах с участием *A. thaliana* при решении различных конкретных задач. Особый интерес представляют популяции, расположенные на периферии ареала вида, у которых сформировались популяционно-генетические и молекулярно-генетические механизмы устойчивости к не вполне благоприятным условиям существования.

Проблема адаптации живых организмов к условиям окружающей среды является одной из актуальных в современной биологии. Существование генетической изменчивости является предпосылкой и необходимым условием для обеспечения приспособленности и адаптации организмов, при этом для жизнеспособности популяции важное значение имеет уровень генного разнообразия [Fischer, Matthies, 1998; Fischer et al., 2000; Savolainen et al., 2000]. Величина генетического разнообразия популяций определяется сложным переплетением взаимодействий основных факторов микроэволюции – естественного отбора, генных мутаций, случайного дрейфа и миграции генов, а также часто связана с величиной ареала и системой воспроизведения видов. Особое значение для эволюционных преобразований имеет поток генов, причем этот вопрос до сих

пор остается дискуссионным. Интенсивный поток генов между популяциями ведет к унификации вида, стирая межпопуляционные различия. При слабом генном потоке дрейф генов, отбор и даже мутации могут привести к генетической дифференциации. Своеобразие генетических процессов при изоляции позволяет каждой популяции изменяться независимо и приводит к формированию уникальных особенностей генофонда [Хедрик, 2003]. В связи с этим популяции островов представляют собой удобную модель для изучения микроэволюционных процессов и возможных путей адаптивной эволюции.

Валаамский архипелаг является уникальной островной экосистемой самого крупного озера Европы – Ладожского. В 1999 г. острову придан статус природного парка «Валаамский архипелаг». В связи с удаленностью от суши и отсутствием промышленного производства замкнутая островная экосистема представляет собой удобную модель для изучения состояния незагрязненной природной среды. Флора острова представлена очень большим числом видов растений (495), среди них и *A. thaliana*. Интересно, что 64 вида занесено в Красную книгу Карелии и 2 – в Красную книгу России [Кравченко, Крышень, 1995]. Остров Валаам представляет северную периферию ареала *A. thaliana*. Однако климатические условия Валаама во многом определяются влиянием Ладожского озера, в связи с чем климат архипелага – самый мягкий в пределах Республики Карелия и мягче остальных районов таких же широт благодаря близкому соседству Балтийского и Белого морей и, соответственно, влиянию теплового течения Гольфстрим.

В настоящем исследовании представлены результаты изучения генетического разнообразия и популяционной структуры *A. thaliana* острова Валаам с целью выявления молекулярно-генетических механизмов

и микроэволюционных процессов в условиях изоляции вида на северной периферии его ареала. Исследование выполнено с помощью RAPD-анализа – метода полимеразной цепной реакции с участием произвольных праймеров, который имеет ряд достоинств и преимуществ, позволяя, в частности, исследовать геном в целом и выявлять полиморфные состояния большого числа локусов, а также анализировать и некодирующие последовательности ДНК. В качестве одной из задач было выяснение вопроса, являются ли локальные места произрастания растений *A. thaliana* на Валааме отдельными популяциями или составляют субпопуляционную структуру единой подразделенной популяции острова. Сохранение вида *A. thaliana* на Валаамском архипелаге, как источника уникальных природных генов модельного растения, является еще одной важной задачей. Проведенное исследование будет способствовать разработке плана мероприятий, направленных на сохранение *A. thaliana* на острове.

Материалы и методы

Исследование выполнено на научном оборудовании Центра коллективного пользования ИБ КарНЦ РАН «Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера». Растения анализировали из четырех локальных мест произрастания *A. thaliana* на острове Валаам – площадки №№ 1, 4, 5 и 7. Площадки отделены друг от друга расстоянием в два и более километров, окружены лесной растительностью, а одна из них (площадка № 5) находится на полуострове, отделенном от основной части острова тонким перешейком и водной преградой. Из семян растений, собранных во время экспедиции 2012 года, выращивали исходный материал в лабораторных условиях в смеси земли и песка (2:1) под люминесцентными лампами.

Выделение ДНК из листьев 30 взрослых растений в вегетативной фазе каждой из четырех площадок проводили по протоколу Мёллера с соавторами [Möller et al., 1992]. Полимеразную цепную реакцию осуществляли в термоциклере Robocycler® (Stratagene, США). Амплификация ДНК шла в реакционной смеси объемом 30 мкл, содержащей 2,5 мкл 10×Taq-буфера, 0,2 мМ каждого dNTP, 1 ед. Taq-полимеразы («Евроген», Россия), соответствующий праймер 20 пМ и 50 нг геномной ДНК.

Для RAPD-анализа использовали семь олигонуклеотидных праймеров («Синтол», Россия): № 1 – 5'-GTAGCTGACG-3';

№ 2 – 5'-GTGTCGAGTC-3'; № 4 – 5'-AGGTCTGACG-3'; № 7 – 5'-GTGTCGATCGAG-3'; № 8 – 5'-CGAGCCGATC-3'; OPC-5 – 5'-GATGACCGCC-3'; P-01D – 5'-AGCAGCGTTCG-3'. ПЦР проводили по следующей программе: первичная денатурация – 2 мин при 94 °С; далее 35 циклов: денатурация – 1 мин при 94 °С, отжиг – 40 с при 35 °С, синтез – 40 с при 72 °С; достраивание фрагментов – 10 мин при 72 °С. Продукты амплификации выявляли методом электрофореза в 2%-м агарозном геле в TBE буферном растворе с добавлением бромистого этидия и фотографировали в проходящем УФ-свете. Анализ молекулярной массы фрагментов осуществляли относительно маркера молекулярной массы (100 bp – 1 Kb) («Силекс», Россия).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартных подходов, принятых в популяционно-генетических исследованиях [Животовский, 1983], пакетов программ PHYLIP [<http://evolution.genetics.washington.edu>], Arlequin ver. 3.11 [<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin> 3]. Для этого были составлены бинарные матрицы, в которых присутствие или отсутствие в спектре одинаковых фрагментов ДНК обозначали как «1» или «0». Уровень генетического разнообразия растений отдельных локальностей определяли с помощью показателей: доли полиморфных локусов при 95-процентном критерии ($P_{95\%}$) и ожидаемой гетерозиготности (H_{exp}). Генетическую подразделенность изученных площадок характеризовали с помощью статистик генного разнообразия Нея [Nei, 1973]. Генетическое сходство отдельных локальных мест произрастания арабидопсиса вычисляли с помощью коэффициента Нея – I_N [Nei, 1972].

Результаты и обсуждение

Для выбора эффективных RAPD-праймеров в предварительных экспериментах на ДНК *A. thaliana* проведено тестирование 20 декануклеотидных последовательностей, применяемых для анализа растений. В результате было отобрано семь из них, позволяющих воспроизводить наиболее полиморфные и относительно четкие RAPD-спектры. Количество амплифицированных фрагментов ДНК варьировало на праймер от 9 (праймер № 7) до 18 (праймер P-01D). Общее число учитываемых фрагментов ДНК – 95. На электрофоретических спектрах детектировались как мономорфные фрагменты, общие для всех образцов, так и полиморфные. В зависимости от праймера спектры фрагментов ДНК растений с разных площадок

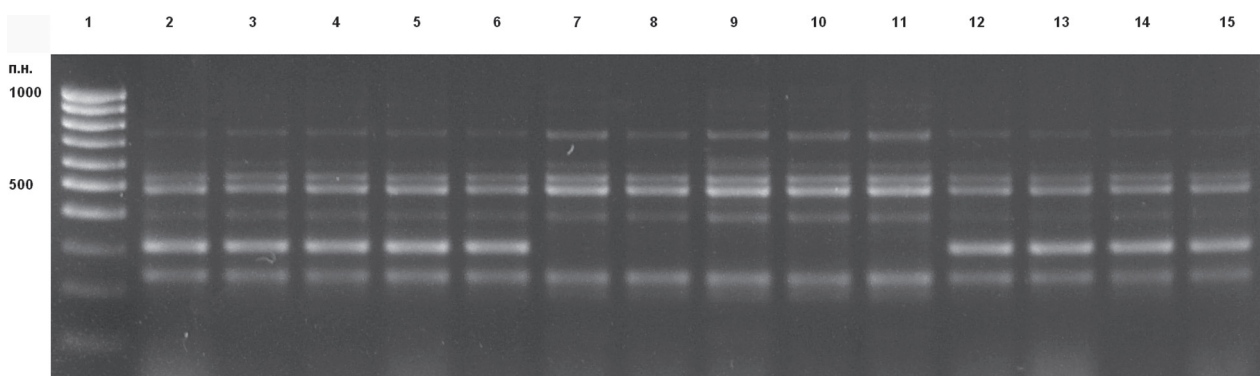


Рис. 1. RAPD-спектры геномной ДНК растений *A. thaliana* острова Валаам, полученные с помощью праймера № 2: 1 – маркер молекулярной массы (100–1000 п. н.); 2–6 – растения с площадки № 4; 7–11 – растения с площадки № 5; 12–15 – растения с площадки № 7

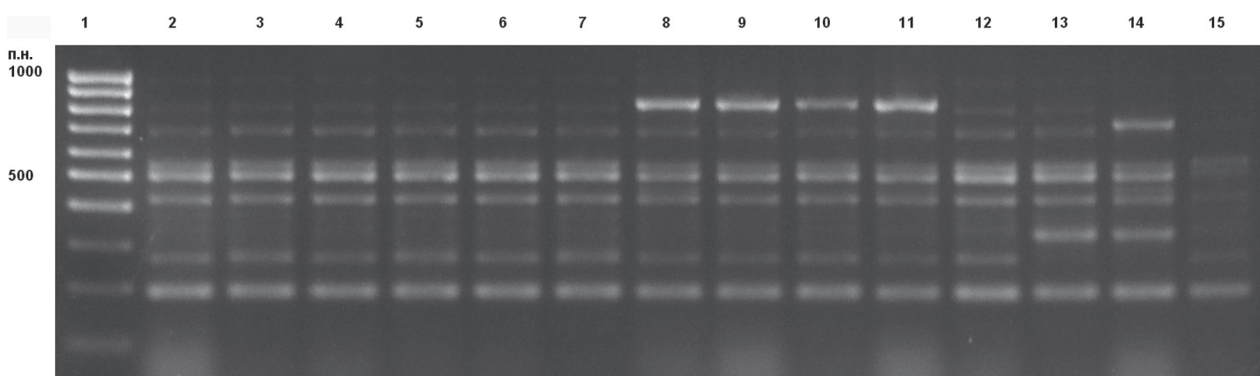


Рис. 2. RAPD-спектры геномной ДНК растений *A. thaliana* острова Валаам, полученные с помощью праймера № 4: 1 – маркер молекулярной массы (100–1000 п. н.); 2–7 – растения с площадки № 4; 8–11 – растения с площадки № 7; 12–15 – растения с площадки № 5

иногда были идентичны, а иногда различались. Так, спектры фрагментов ДНК, полученные с помощью праймера № 2, совпадают у растений площадок № 4 и № 7 и отличаются от спектров растений площадки № 5 (рис. 1). Уровень варьирования количества и размеров фрагментов ДНК растений с разных площадок был неодинаков: повышенная вариабельность спектров фрагментов ДНК заметна у растений с площадок № 1 и № 5 по сравнению со спектрами растений с площадок № 4 и № 7 (рис. 2, 3, 4).

На основании частот фрагментов ДНК были вычислены основные показатели уровня генетического разнообразия растений из четырех локальных мест произрастания *A. thaliana* на Валааме. Значения показателей представлены в таблице 1. В двух локальностях (площадки № 1 и № 5) выявлен значительный объем генетического разнообразия растений *A. thaliana*. Средние значения показателей уровня генетического разнообразия для этих двух площадок составляют $P_{95\%} = 37,4\%$ и $H_{\text{exp}} = 0,125$, что превышает средний уровень полиморфизма, установленный для других самоопыляющихся видов растений ($P_{95\%} = 18,9\%$ и $H_{\text{exp}} = 0,058$) [Hamrick et al., 1979]. В двух оставшихся

локальностях (площадки № 4 и № 7) величина генетической изменчивости составляет в среднем $P_{95\%} = 21,1\%$ и $H_{\text{exp}} = 0,059$ и находится на уровне, характерном для инбредных видов.

Ранее с помощью аллозимного и RAPD анализов нами была изучена генетическая вариабельность более десяти континентальных популяций арабидопсиса в Карелии, территория которой представляет северную границу ареала вида [Федоренко и др., 2001, 2011; Федоренко, Грицких, 2008]. В результате было выявлено значительное генетическое разнообразие северных природных популяций, более чем в два раза превышающее уровень изменчивости *A. thaliana* в центре его ареала (Англия) [Abbott, Gomes, 1989], а также превышение средних значений популяционных характеристик других самоопыляющихся видов растений [Hamrick et al., 1979] (табл. 1). Столь высокий популяционный полиморфизм не типичен для самоопыляющихся видов растений. В связи с этим было высказано предположение, что значительный уровень генетического разнообразия арабидопсиса в северной части его ареала может быть связан с жесткими экологическими

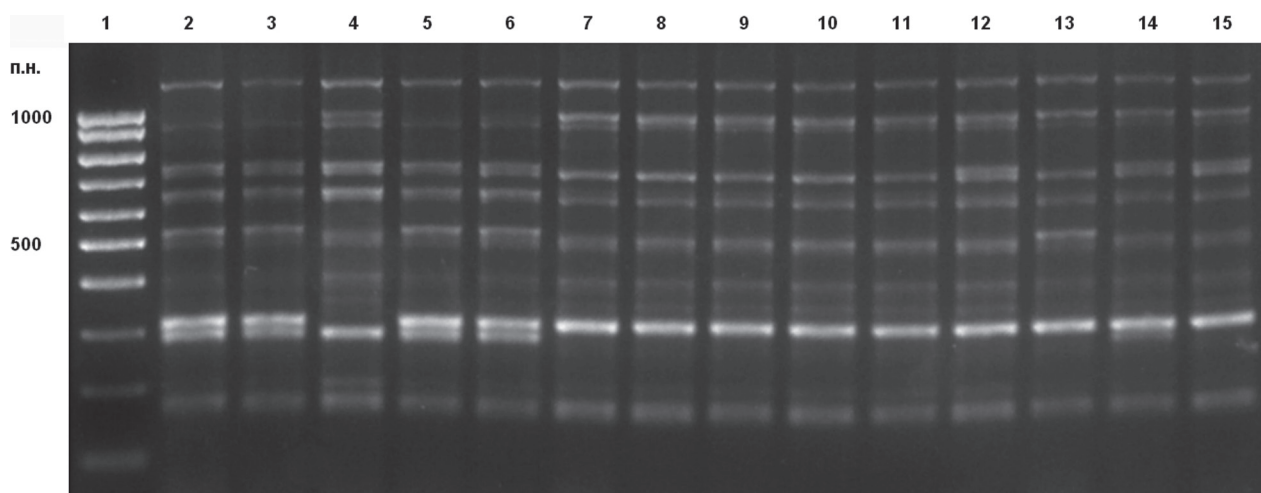


Рис. 3. RAPD-спектры геномной ДНК растений *A. thaliana* острова Валаам, полученные с помощью праймера OPC-5: 1 – маркер молекулярной массы (100–1000 п. н.); 2–6 – растения с площадки № 5; 7–11 – растения с площадки № 7; 12–15 – растения с площадки № 1

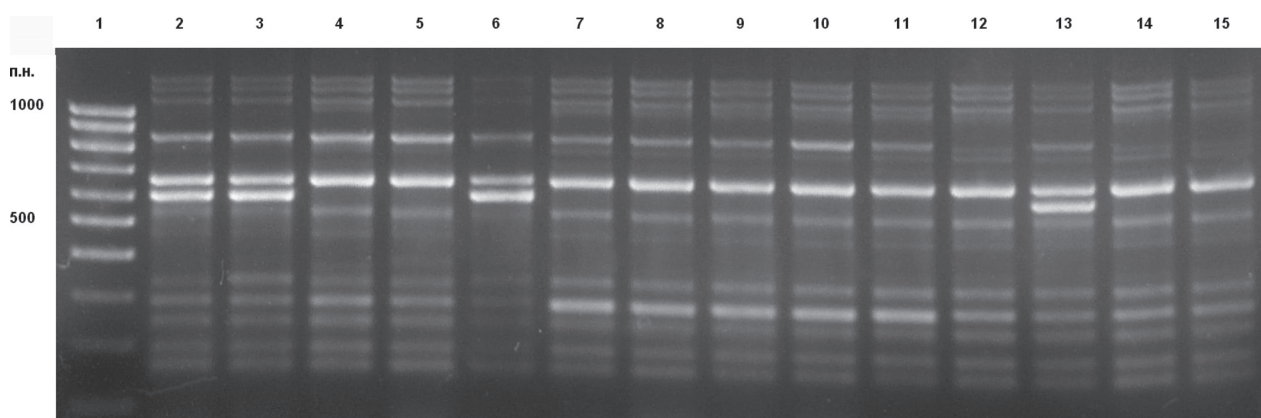


Рис. 4. RAPD-спектры геномной ДНК растений *A. thaliana* острова Валаам, полученные с помощью праймера P-01D: 1 – маркер молекулярной массы (100–1000 п. н.); 2–6 – растения с площадки № 5; 7–11 – растения с площадки № 7; 12–15 – растения с площадки № 1

условиями произрастания, что согласуется с представлениями Левонтина о популяционно-генетической структуре краевых популяций [Левонтин, 1978]. Уровень генетического разнообразия *A. thaliana* острова Валаам в среднем оказался ниже ($P_{95\%} = 29,2\%$ и $H_{\text{exp}} = 0,092$) выявленной ранее величины генетической изменчивости континентальных популяций арабидопсиса Карелии (табл. 1). По-видимому, это объясняется расположением острова в более южных широтах и более мягким климатом. Пониженная величина генетического разнообразия вида *A. thaliana* Валаама также может быть связана с его изолированным положением на острове, где из-за водной преграды Ладожского озера миграционный поток генов с материка может иметь очень низкую интенсивность. Особенности микроэволюционных процессов в островных, изолированных популяциях (уменьшение скорости миграции генов, усиление роли дрейфа генов и т. д.) способствуют

усилению инбридинга и снижению генетического разнообразия.

Оценка степени генной дифференциации внутри и между исследуемыми группами растений произведена с помощью статистик генного разнообразия Нея [Nei, 1973]. Результаты вычисления представлены в таблице 2. Общее генное разнообразие, среднее по всем семи праймерам, H_T составило 0,143. Немногим большая часть этого разнообразия пришлась на внутригрупповую компоненту, H_S . В целом установлено, что относительная величина межгрупповой дифференциации (G_{ST}) равна 0,390, т. е. на межгрупповую изменчивость приходится 39,0 % общего генного разнообразия, что невелико для самоопыляющихся видов растений. У инбредных видов G_{ST} составляет большую часть общего генного разнообразия ($\geq 50\%$). Так, для британских популяций *A. thaliana*, находящихся в центре своего ареала, $G_{ST} = 0,563$ [Abbott, Gomes, 1989]; для

Таблица 1. Показатели уровня генетического разнообразия растений *A. thaliana* острова Валаам

Места сбора растений	$P_{95\%}$, %	H_{exp}
Площадка № 1	38,9	0,123 ± 0,019
Площадка № 4	20,0	0,062 ± 0,014
Площадка № 5	35,8	0,127 ± 0,017
Площадка № 7	22,1	0,056 ± 0,012
Среднее	29,2	0,092
Карельские популяции <i>A. thaliana</i> [Федоренко и др., 2011]	42,3	0,126 ± 0,016
Британские популяции [Abbott, Gomes, 1989]	16,50	0,055
Самоопылители, среднее по 33 видам [Hamrick et al., 1979]	18,99	0,058

Примечание. $P_{95\%}$ – доля полиморфных локусов при 95% критерии; H_{exp} – ожидаемая гетерозиготность.

Таблица 2. Параметры генного разнообразия растений *A. thaliana* острова Валаам

Праймер	H_T	H_S	D_{ST}	G_{ST}
№ 1	0,130	0,079	0,051	0,389
№ 2	0,181	0,107	0,075	0,413
№ 4	0,209	0,122	0,087	0,418
№ 7	0,053	0,035	0,018	0,340
№ 8	0,084	0,059	0,025	0,301
ОРС-5	0,222	0,118	0,104	0,468
P-01D	0,120	0,087	0,033	0,274
Среднее	0,143	0,087	0,056	0,390

Примечание. H_T – общее генное разнообразие, H_S – внутригрупповое разнообразие, D_{ST} – межгрупповое разнообразие, G_{ST} – относительная величина межгрупповой дифференциации.

Таблица 3. Генетическая идентичность (I_N) отдельных групп растений *A. thaliana* на острове Валаам

Площадки	№ 1	№ 4	№ 5	№ 7
№ 1	0	0,945	0,965	0,967
№ 4		0	0,924	0,944
№ 5			0	0,946
№ 7				0

популяций северной границы ареала этого вида в бассейне Онежского озера $G_{ST} = 0,507$ [Федоренко и др., 2011]; для популяций других самоопылителей $G_{ST} = 0,523$ [Gottlieb, 1981]. Полученные данные позволяют предположить, что изученные группы растений с четырех площадок Валаама, по-видимому, представляют собой единую подразделенную популяцию, состоящую из отдельных субпопуляций.

На отсутствие существенных дифференциаций между отдельными локальными местами произрастания арабидопсиса указывают и высокие значения генетического сходства по Нею [Nei, 1972]. Значения I_N находятся в пределах от 0,924 для пары площадок № 4 и № 5 до 0,967 для площадок № 1 и № 7 (табл. 3). Средняя генетическая идентичность (I_N) между всеми парами площадок составила 0,949. Полученные данные оказались выше генетической идентичности популяций *A. thaliana* бассейна

Онежского озера ($I_N = 0,843$), которая была установлена нами ранее [Федоренко и др., 2011], а также выше генетического сходства британских популяций арабидопсиса ($I_N = 0,897$) [Abbott, Gomes, 1989]. Поскольку генетические различия между исследуемыми группами растений, оцененные с помощью RAPD-маркеров, невелики, кластерный анализ не проводился.

Заключение

Отметим ряд выявленных популяционно-генетических особенностей *A. thaliana* острова Валаам. С помощью RAPD-маркеров обнаружен повышенный уровень генетического разнообразия арабидопсиса (средние значения $P_{95\%} = 29,2\%$ и $H_{\text{exp}} = 0,092$) по сравнению с другими самоопыляющимися видами растений. Однако этот уровень оказался ниже, чем в континентальных карельских популяциях *A. thaliana*,

находящихся на северной периферии его ареала. По-видимому, это объясняется географическим расположением острова Валаам в более южных широтах и более мягким климатом, а также может быть связано со снижением интенсивности миграционного потока генов из-за изолированности вида на острове. Высокое генетическое сходство изученных групп растений и отсутствие существенной дифференциации между ними позволяют признать, что вид *A. thaliana* представлен на Валааме единой подразделенной популяцией, в которой отдельные субпопуляции связаны между собой миграционными взаимодействиями. Такая популяционная структура противодействует инбридингу, присутствующему в природных популяциях ограниченной численности, и способствует сохранению генетического разнообразия, которое является основой адаптации и выживания популяций. В качестве мероприятий, способствующих сохранению модельного вида на Валааме, была бы целесообразна организация регулярного генетического мониторинга популяционно-генетической структуры *A. thaliana*.

Литература

Животовский Л. А. Статистические методы анализа частот генов в природных популяциях // Итоги науки и техники. Общая генетика. М.: ВИНТИ, 1983. Т. 8. С. 76–104.

Кравченко А. В., Крышень А. М. Материалы к флоре и растительности Западного архипелага в Ладожском озере // Флористические исследования в Карелии. Вып. 2. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 1995. С. 85–111.

Левонтин Р. С. Генетические основы эволюции. М.: Мир, 1978. С. 157–161.

Свириденко Л. П., Светов А. П. Валаамский силл габбро-долеритов и геодинамика котловины Ладожского озера. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2008. 123 с.

Федоренко О. М., Савушкин А. И., Олимпиевко Г. С. Генетическое разнообразие природных популяций *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. в Карелии. // Генетика. 2001. Т. 37, № 2. С. 223–229.

Федоренко О. М., Грицких М. В. Генетическое разнообразие природных популяций *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. на северной границе его ареала: RAPD-анализ // Генетика. 2008. Т. 44, № 4. С. 496–499.

Федоренко О. М., Грицких М. В., Топчиева Л. В., Лебедева О. Н. Сравнительный анализ генетической структуры природных популяций двух видов растений *Arabidopsis* с разной степенью панмиксии // Генетика. 2011. Т. 47, № 4. С. 508–515. doi: 10.1134/S1022795411030033

Хедрик Ф. Генетика популяций. М.: Техносфера, 2003. 592 с.

Abbott R. J., Gomes M. F. Population genetic structure and outcrossing rate of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Heredity. 1989. Vol. 62, Part 3. P. 411–418.

Fischer M., Matthies D. RAPD variation in relation to population size in plant performance in the rare *Gentiana germanica* // American Journal of Botany. 1998. Vol. 85. P. 811–819.

Fischer M., Husi R., Prati D. et al. RAPD variation among and within small and large populations of the clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae) // American Journal of Botany. 2000. Vol. 87. P. 1128–1137.

Gottlieb L. D. Electrophoretic evidence and plant populations // Prog. Phytocem. 1981. Vol. 7. P. 1–46.

Hamrick J. L., Linhart I. B., Mitton J. B. Relationship between life history characteristic and electrophoretically detectable genetic variation in plants // Annu. Rev. Ecol. Syst. 1979. Vol. 10. P. 173–200.

Möller E. M., Bahnweg G., Sandermann H., Geiger H. H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues // Nucl. Acids Res. 1992. Vol. 20, no. 22. P. 6115–6116.

Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1973. Vol. 70. P. 3321–3323.

Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Natur. 1972. Vol. 106. P. 283–292.

Savolainen O., Langley C. H., Lazzaro B., Freville H. Contrasting patterns of nucleotide variation at the alcohol dehydrogenase locus in the outcrossing *Arabidopsis lyrata* and the selfing *Arabidopsis thaliana* // Mol. Biol. Evol. 2000. Vol. 17. P. 645–655.

Поступила в редакцию 27.06.2016

References

Fedorenko O. M., Savushkin A. I., Olimpienko G. S. Genetic diversity in natural populations of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. in Karelia. *Rus. J. Genetics*. 2001. Vol. 37, no. 2. P. 162–167.

Fedorenko O. M., Gritskikh M. V. Genetic diversity in natural populations of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. at the northern border of its range: RAPD-analysis. *Rus. J. Genetics*. 2008. Vol. 44, no. 4. P. 425–428. doi: 10.1134/S1022795408040078

Fedorenko O. M., Grickikh M. V., Topchieva L. V., Lebedeva O. N. Comparative analysis of genetic

structures in natural populations of two *Arabidopsis* species with different degrees of panmixia. *Rus. J. Genetics*. 2011. Vol. 47, no. 4. P. 446–452. doi: 10.1134/S1022795411030033

Hedrik F. *Genetika populacij* [Genetics of populations]. Moscow: Tehnosfera, 2003. 592 p.

Kravchenko A. V., Kryshen' A. M. Materialy k flore i rastitel'nosti Zapadnogo arhipelaga v Ladozhskom ozere [Materials on the flora and vegetation of the Western archipelago of Lake Ladoga]. *Floristicheskie issledovanija v Karelii* [Floristic Studies in Kare-

lia]. Iss. 2. Petrozavodsk: KarRC of RAS, 1995. P. 85–111.

Levontin R. S. Geneticheskie osnovy jevoljucii [Genetic basis of evolution]. Moscow: Mir, 1978. P. 157–161.

Sviridenko L. P., Svetov A. P. Valaamskij sill gabbrodoleritov i geodinamika kotloviny Ladozhskogo ozera [Valaam gabbro-dolerite sill and geodynamics of Lake Ladoga depression]. Petrozavodsk: KarRC of RAS, 2008. 123 p.

Zhivotovskij L. A. Statisticheskie metody analiza chastot genov v prirodnyh populacijah [Statistical techniques for genes frequencies analysis in natural populations]. Itogi nauki i tehniki. Obshhaja genetika [Results in Science and Technology. General Genetics]. Moscow: VINITI, 1983. Vol. 8. P. 76–104.

Abbott R. J., Gomes M. F. Population genetic structure and outcrossing rate of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Heredity*. 1989. Vol. 62, Part 3. P. 411–418.

Fischer M., Matthies D. RAPD variation in relation to population size in plant performance in the rare *Gentiana germanica*. *American Journal of Botany*. 1998. Vol. 85. P. 811–819.

Fischer M., Husi R., Prati D. et al. RAPD variation among and within small and large populations of the clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae).

American Journal of Botany. 2000. Vol. 87. P. 1128–1137.

Gottlieb L. D. Electrophoretic evidence and plant populations. *Prog. Phytchem*. 1981. Vol. 7. P. 1–46.

Hamrick J. L., Linhart I. B., Mitton J. B. Relationship between life history characteristic and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1979. Vol. 10. P. 173–200.

Möller E. M., Bahnweg G., Sandermann H., Geiger H. H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucl. Acids Res.* 1992. Vol. 20, no. 22. P. 6115–6116.

Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1973. Vol. 70. P. 3321–3323.

Nei M. Genetic distance between populations. *Amer. Natur.* 1972. Vol. 106. P. 283–292.

Savolainen O., Langley C. H., Lazzaro B., Freville H. Contrasting patterns of nucleotide variation at the alcohol dehydrogenase locus in the outcrossing *Arabidopsis lyrata* and the selfing *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Biol. Evol.* 2000. Vol. 17. P. 645–646.

Received June 27, 2016

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Зарецкая Марина Витальевна

научный сотрудник лаб. генетики
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: genmg@mail.ru

Федоренко Ольга Михайловна

старший научный сотрудник лаб. генетики
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: fedorenko_om@mail.ru

CONTRIBUTORS:

Zaretskaya, Marina

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

Fedorenko, Ol'ga

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

УДК 581.1

РОЛЬ ОТДЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ *ELYTRIGIA REPENS* (L.) NEVSKI К КАДМИЮ

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

Институт биологии Карельского научного центра РАН

В условиях вегетационного опыта изучали устойчивость пырея ползучего (*Elytrigia repens* (L.) Nevski) к кадмию и роль отдельных компонентов антиоксидантной системы (АОС) в адаптации растений этого вида к повышенным концентрациям металла в корнеобитаемой среде. Показано, что пырей обладает высокой устойчивостью к кадмию и способен в течение длительного времени (40 сут) успешно расти в присутствии данного металла в субстрате в концентрации 40 мг/кг субстрата, сохраняя при этом высокий уровень фотосинтеза и водного режима. Из полученных данных следует, что высокая устойчивость пырея к кадмию, наряду с другими защитными механизмами, обеспечивается эффективной работой АОС. В частности, в присутствии металла в корнях растений заметно возрастает активность таких антиоксидантных ферментов, как супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ) и гваяколовая пероксидаза (ПО). В листьях растений повышается активность только ПО, но при этом активизируется синтез ключевого неферментативного компонента АОС – глутатиона (GSH). Этому же способствует поддержание высокой концентрации каротиноидов, являющихся еще одним неферментативным антиоксидантом. На основании анализа полученных результатов сделан вывод о том, что в корнях растений, где обнаружена более высокая концентрация металла, детоксикация активных форм кислорода обеспечивается главным образом за счет увеличения активности антиоксидантных ферментов, тогда как в листьях основная роль в предотвращении окислительного стресса, возникающего под влиянием кадмия, принадлежит неферментативным низкомолекулярным соединениям, в частности GSH и каротиноидам.

Ключевые слова: *Elytrigia repens* (L.) Nevski; кадмий; антиоксидантные ферменты; неферментативные антиоксиданты.

N. M. Kaznina, Yu. V. Batova, A. F. Titov, G. F. Laidinen. ROLE OF ANTIOXIDANT SYSTEM COMPONENTS IN ADAPTATION OF *ELYTRIGIA REPENS* (L.) 'NEVSKI' TO CADMIUM

The tolerance of *Elytrigia repens* (L.) 'Nevski' to cadmium and the role of individual components of the antioxidant system (AOS) in the plants' adaptation to elevated metal concentrations in the root layer were studied in a greenhouse experiment. Couch grass is highly resistant to cadmium and can for a long time (40 days) successfully grow in the presence of this metal at a 40 mg/kg concentration in the substrate while maintaining a high level of photosynthesis and water regime. It follows from these data that the high resistance of *E. repens* to cadmium, along with other protective mechanisms, is ensured by effective operation of the AOS. In particular, the activity of antioxidant enzymes such

as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (PO) in roots is significantly promoted in the presence of the metal. In leaves, only PO activity is promoted, but at the same time the synthesis of the AOS key non-enzymatic component, glutathione (GSH), becomes more active. Another contributing factor is the maintenance of a high concentration of carotenoids, which represent another group of non-enzymatic antioxidants. Based on the analysis of the results it was concluded that detoxification of reactive oxygen species in the plants' roots, where a higher concentration of the metal was found, was mainly facilitated by enhanced activity of antioxidant enzymes, whereas in leaves the principal role in the prevention of oxidative stress under cadmium impact belonged to non-enzymatic low molecular weight compounds, in particular GSH and carotenoids.

Key words: *Elytrigia repens* (L.) 'Nevski'; cadmium; antioxidant enzymes; non-enzymatic antioxidants.

Введение

Известно, что концентрация молекулярного кислорода в клетках растений гораздо выше, чем у других эукариот, что в значительной степени связано с процессом фотосинтеза [Гарифзянов и др., 2011]. При этом примерно 1 % имеющегося в клетках кислорода, по оценкам исследователей, преобразуется в его активные формы [Smirnoff, 2000]. Основными генераторами активных форм кислорода (АФК) являются хлоропласты и митохондрии, а также пероксисомы, содержащие большое количество ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции [Arel, Hirt, 2004; Mhamdi et al., 2010; Креславский и др., 2012]. В небольших количествах АФК образуются в ходе многих метаболических процессов, но в норме они быстро инактивируются благодаря работе АОС. При действии же неблагоприятных факторов образование АФК значительно усиливается, вызывая у растений окислительный стресс [Finkel, Holbrook, 2000; Колупаев, 2007; Djebali et al., 2008; Paradiso et al., 2008]. Одним из таких факторов является кадмий – высокотоксичный тяжелый металл, способный оказывать сильное негативное воздействие на состояние клеточных мембран и на активность отдельных компонентов АОС. При этом считается, что металлоустойчивые виды (сорта, генотипы) благодаря эффективной работе АОС способны лучше сохранять целостность мембран в условиях высоких концентраций этого металла, чем менее устойчивые. Так, более высокая активность антиоксидантных ферментов была обнаружена у устойчивых к кадмию генотипов ячменя [Wu et al., 2003] и сортов пшеницы [Khan et al., 2007], а у устойчивого к этому металлу сорта сафлора красильного помимо активности ферментов заметно увеличивалось и содержание восстановленного глутатиона [Namdjoan et al., 2011]. Что касается дикорастущих злаков, то такого рода данных в литературе пока

относительно немного. Хотя подобные исследования имеют не только важное теоретическое значение, связанное с углублением знаний о клеточных механизмах металлоустойчивости растений, но и большую практическую значимость в плане выявления наиболее устойчивых из них для возможного использования в фиторемедиации почв, загрязненных тяжелыми металлами. Определенный интерес с этой точки зрения представляет *Elytrigia repens* (L.) Nevski (пырей ползучий) – многолетний корневищный злак, который, как обнаружено, способен произрастать на территориях с довольно высоким уровнем техногенного загрязнения почв [Елистратова, 2008; Батова и др., 2015].

Исходя из вышеизложенного, задачей настоящего исследования явилось изучение устойчивости *Elytrigia repens* к кадмию и выявление роли ряда отдельных компонентов АОС в адаптации растений к повышенным концентрациям металла в корнеобитаемой среде.

Материалы и методы

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования ИБ КарНЦ РАН «Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера».

Растения *E. repens* выращивали в условиях вегетационного опыта с использованием песчаного субстрата. Кадмий в концентрации 40 мг/кг субстрата в виде сернокислой соли вносили в субстрат перед посевом семян. Полив осуществляли модифицированным питательным раствором Кнопа. На 40-е сут после посева (фаза кущения) в корнях и побегах растений определяли концентрацию металла, интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) (по содержанию малонового диальдегида, МДА), активность антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД;

Таблица 1. Влияние кадмия (40 мг/кг субстрата) на некоторые показатели роста, фотосинтетической активности и водного режима у растений *Elytrigia repens*

Показатель	Контроль	Опыт
Сухая биомасса корня, мг	71,8 ± 11,9	30,5 ± 4,5*
Сухая биомасса побега, мг	109,4 ± 13,3	88,2 ± 7,3*
Интенсивность фотосинтеза, мкмоль/ (м ² ·с)	28,8 ± 1,2	30,9 ± 0,8
<i>Fv/Fm</i>	0,748 ± 0,011	0,742 ± 0,008
<i>Yield</i>	0,525 ± 0,017	0,530 ± 0,018
Интенсивность транспирации, ммоль/ (м ² ·с)	1,66 ± 0,13	2,00 ± 0,26
Оводненность тканей корня, %	85,3 ± 1,3	85,2 ± 1,4
Оводненность тканей побега, %	76,6 ± 0,8	77,6 ± 0,5

Примечание. *Здесь и в табл. 2 различия с контролем достоверны при $p \leq 0,05$.

КФ 1.15.1.1), каталазы (КАТ; КФ 1.11.1.6) и пероксидазы (ПО; КФ 1.11.1.7), а также количество восстановленного глутатиона (GSH) и концентрацию каротиноидов в листьях. Об устойчивости растений к кадмию судили по изменению (по отношению к контролю) биомассы корня и побега, эффективности работы ФС II, интенсивности фотосинтеза и транспирации, оводненности тканей.

Содержание кадмия в органах растений измеряли методом инверсионной вольтамперометрии на полярографе АВС-1.1 («Вольта», Россия). Разложение растительных образцов осуществляли в смеси HNO_3 и H_2O_2 в соотношении 4:1 с использованием микроволновой системы пробоподготовки МС-6 («Вольта», Россия). Показатели эффективности работы ФС II – потенциальный (*Fv/Fm*) и реальный (*Yield*) фотохимический квантовый выход ФС II – изучали на флуориметре MINI-PAM (Walz, Германия), интенсивность фотосинтеза и транспирации оценивали с помощью установки для исследования CO_2 -газообмена и водяных паров HCM-1000 (Walz, Германия). Оводненность тканей анализировали весовым методом, высушивая растительные образцы в термостате до постоянного веса при температуре 105 °С. Содержание МДА и активность антиоксидантных ферментов исследовали с помощью спектрофотометра СФ-2000 («Спектр», Россия). Для определения количества МДА брали реакционную среду, содержащую 0,25%-й раствор тиобарбитуровой кислоты в 10%-й трихлоруксусной кислоте [Heath, Packer, 1968]. Общую активность СОД оценивали по способности фермента ингибировать фотохимическое восстановление тетразолия нитросинего согласно методике [Beauchamp, Fridovich, 1971], активность ПО – по методике [Maehly, Chance, 1954], используя в качестве субстрата гваякол, активность КАТ – по методике [Aebi, 1984]. Содержание GSH измеряли методом высокоэффективной жидкостной

хроматографии на жидкостном хроматографе «Стайер» («Аквилон», Россия) согласно методике Снеллер с соавт. [Sneller et al., 2000] по стандарту GSH (Sigma). Расчет площадей пиков осуществляли с помощью компьютерной программы МультиХром (Версия 1,5X). Концентрацию каротиноидов в листьях растений определяли с помощью спектрофотометра СФ-2000 («Спектр», Россия), экстрагируя 80%-м ацетоном [Шлык, 1971].

Опыт повторяли дважды. Биологическая повторность в пределах каждого варианта опыта варьировала для разных показателей от 6 до 20 растений. Аналитическая повторность при проведении химических анализов 3–5-кратная. В таблицах и на рисунках приведены средние значения и их стандартные ошибки. Достоверность различий оценивали на основании *t*-критерия Стьюдента. В работе обсуждаются величины, достоверные при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ содержания кадмия в органах растений *E. repens* выявил заметное увеличение концентрации металла в корнях (до $116,2 \pm 5,0$ мкг/г сухой массы) и побегах (до $4,5 \pm 0,6$ мкг/г сухой массы) опытных растений по сравнению с контрольными, где его содержание было небольшим и составляло 0,2 и 0,03 мкг/г сухой массы соответственно.

Известно, что повышение содержания кадмия в растениях приводит к ингибированию физиологических процессов, при этом степень ингибирования в значительной степени зависит от металлоустойчивости вида. В наших исследованиях у *E. repens* в присутствии кадмия заметно снижалась биомасса корней (почти на 60 % по отношению к контролю) и в меньшей степени (на 20 %) – биомасса побега (табл. 1). Данный эффект является типичным для видов-исключателей, к которым относится пырей, поскольку у них именно в корнях задерживается

и инактивируется большая часть поступивших в растение токсичных ионов, что считается важным механизмом их металлоустойчивости [Серегин, Иванов, 2001; Liu et al., 2008; Титов и др., 2014].

В отличие от показателей роста, параметры, характеризующие эффективность работы ФС II, а также скорость фотосинтеза у опытных растений, сохранялись на уровне контрольных, интенсивность же транспирации даже несколько увеличивалась. Полагают, что повышение скорости транспирации при замедлении роста корня в неблагоприятных условиях среды может быть связано с увеличением гидравлической проводимости корней и является защитно-приспособительной реакцией растений, направленной на поддержание необходимой оводненности тканей [Кудоярова и др., 2001], как это было зафиксировано в нашем исследовании. В целом на основании полученных результатов можно сделать вывод о высокой устойчивости *E. repens* к кадмию.

Как известно, устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды во многом определяется устойчивостью их клеточных мембран [Чиркова, 1997]. Судя по литературным данным, кадмий способен вызывать у растений нарушение структуры плазмалеммы и внутренних мембран клетки, приводящее к снижению их проницаемости. Это, с одной стороны, связано с взаимодействием ионов металла с SH-группами мембранных белков, вызывающим изменение их свойств, а с другой стороны – со способностью кадмия опосредованно влиять на генерацию избыточных количеств АФК вследствие нарушения структуры хлоропластов и митохондрий [Romero-Puertas et al., 2002; Paradiso et al., 2008]. Резкое возрастание АФК в клетке вызывает у растений окислительный стресс, одним из следствий которого является усиление ПОЛ клеточных мембран, что было обнаружено у целого ряда видов растений под влиянием кадмия [Dixit et al., 2001; Guo et al., 2004; Nouairi et al., 2009; Amirjani, 2012 и др.]. Вместе с тем имеются данные и о снижении интенсивности ПОЛ в присутствии высоких концентраций металла, но это касается в основном опытов с длительными экспозициями [Daud et al., 2014; Januškaitienė, Klepeckas, 2015]. Предполагают, что снижение интенсивности ПОЛ в этом случае может быть связано с уменьшением количества АФК благодаря активной работе АОС и являться показателем восстановления структуры мембран. В наших исследованиях у *E. repens* спустя 40 сут воздействия кадмия в корнях и побегах также отмечено некоторое уменьшение

содержания МДА у опытных растений по сравнению с контрольными, что, по-видимому, свидетельствует о сохранении целостности клеточных мембран и, как следствие, об успешной адаптации растений к металлу (рис. 1).

Ключевыми антиоксидантными ферментами в клетках являются СОД, КАТ и ПО. При этом СОД обеспечивает «первую линию» защиты клеток от АФК, катализируя реакцию дисмутации супероксид-радикала в различных компартментах клетки. Образовавшаяся в результате восстановления супероксида перекись водорода, молекула которой также относится к АФК, в свою очередь, нейтрализуется с помощью КАТ и ПО [Asada, 1994; Полесская, 2007]. Из литературы известно, что растения, устойчивые к различным неблагоприятным факторам среды, характеризуются более высокой активностью антиоксидантных ферментов по сравнению с неустойчивыми [Babithaa et al., 2002; Mittova et al., 2003; Wu et al., 2003]. В наших опытах в корнях растений *E. repens* в присутствии кадмия также наблюдалось повышение активности всех изученных антиоксидантных ферментов (табл. 2). Причем активность СОД и КАТ оказалась почти в 3 раза, а ПО – в 2 раза выше, чем у растений контрольного варианта. В листьях же увеличивалась активность только ПО (в 3,6 раза по отношению к контролю).

Обнаруженное нами значительное увеличение активности СОД в корнях *E. repens*, где концентрация кадмия гораздо выше, чем в листьях, очевидно, обеспечивает защиту клеток от возрастания количества супероксид-радикалов. Усиление при этом активности КАТ и ПО, в свою очередь, позволяет снижать содержание образовавшихся молекул перекиси водорода. Такое согласованное повышение активности всех

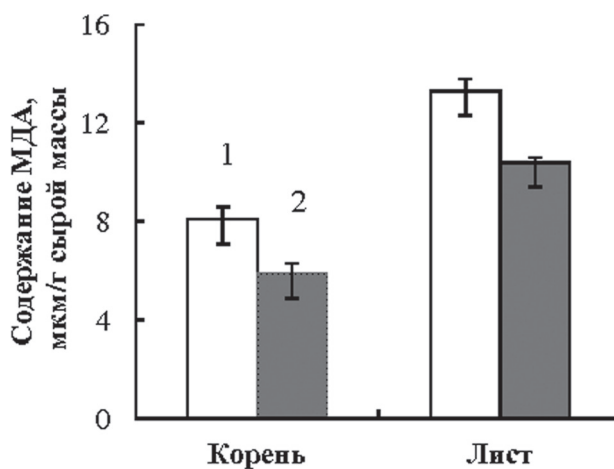


Рис. 1. Влияние кадмия (40 мг/кг субстрата) на содержание МДА в корнях и листьях растений *Elytrigia repens*: 1 – контроль; 2 – опыт

Таблица 2. Влияние кадмия (40 мг/кг субстрата) на активность антиоксидантных ферментов в корнях и листьях растений *Elytrigia repens*

Фермент	Корень		Лист	
	контроль	опыт	контроль	опыт
СОД, у. е. активности/мг белка-мин	4,2 ± 2,1	12,3 ± 1,1*	2,0 ± 1,2	1,7 ± 0,3
КАТ, мкмоль/мг белка-мин	18,1 ± 0,9	47,4 ± 1,3*	21,1 ± 2,4	24,0 ± 1,7
ПО, мкмоль/мг белка-мин	12,7 ± 0,4	25,5 ± 2,5*	1,19 ± 0,03	4,33 ± 0,48*

трех антиоксидантных ферментов можно рассматривать как важный элемент защиты клеток от избытка АФК, обеспечивающий успешную адаптацию и выживание растений в условиях повышенного содержания кадмия в корнеобитаемой среде.

Низкий уровень СОД и КАТ в листьях опытных растений говорит о том, что усиления окислительных процессов в их клетках в присутствии кадмия не происходит. Возрастание же активности ПО скорее связано с какими-то другими функциями, которые этот фермент выполняет в клетке, в том числе в условиях действия стресс-факторов, а также, возможно, с ее высокой чувствительностью к тяжелым металлам, вследствие чего активность ПО увеличивается даже при относительно невысоких их концентрациях [Mac Farlane, Burchett, 2001].

Помимо антиоксидантных ферментов в устраниении избыточных количеств АФК принимают участие и неферментативные низкомолекулярные соединения, среди которых важную роль играет GSH. Его антиоксидантные свойства определяются как непосредственным взаимодействием с АФК и обменными реакциями с соединениями с дисульфидными связями, так и функционированием ряда ферментов аскорбат-глутатионового цикла, связанного с нейтрализацией перекиси водорода [Толпыгина, 2012; Колупаев, Ястреб, 2015]. Поэтому поддержание высокого уровня GSH, а также оптимального соотношения его восстановленной и окисленной (GSSG) форм необходимо для нормального метаболизма клетки [Vanacker et al., 2000; Szalai et al., 2009]. В присутствии кадмия опасность изменения соотношения GSH/GSSG особенно высока из-за расхода молекул GSH на синтез фитохелатинов, что может приводить к целому ряду негативных последствий, связанных с изменением окислительно-восстановительного баланса клетки [Zhu et al., 1999; Cobbett, Goldsbrough, 2002; Pietrini et al., 2003; Noctor et al., 2011]. В нашем исследовании содержание GSH у растений *E. repens* в присутствии кадмия сохранялось на уровне контрольного варианта (рис. 2).

Учитывая, что при этом значительно возрастает концентрация фитохелатинов, как было

показано нами ранее [Казнина и др., 2014], можно говорить о запуске в этих условиях в растениях синтеза GSH. Гораздо более высокая концентрация GSH в листьях по сравнению с корнями объясняется тем, что основной пул глутатиона и ферментов его синтеза сосредоточен в хлоропластах [Heiss et al., 2003; Колупаев, Ястреб, 2015].

К неферментативным антиоксидантам относятся и каротиноиды. Они являются наиболее эффективными молекулами для устранения синглетного кислорода и наряду с α - и γ -токоферолом непосредственно участвуют в его тушении, а также останавливают реакции, протекающие по свободнорадикальному механизму, в частности реакции ПОЛ [Мерзляк, 1989; Красновский, 2004]. Показано, что кадмий отрицательно влияет на содержание каротиноидов у растений, что связано с ингибированием биосинтеза пигментов [Chen et al., 2011]. Однако, как было обнаружено в опытах с разными по устойчивости к металлу сортами бобов и риса, у более металлоустойчивых сортов уменьшение содержания каротиноидов выражено в гораздо меньшей степени, чем у менее устойчивых [Wahid et al., 2008; Cai et al., 2010]. В нашем эксперименте содержание каротиноидов в листьях *E. repens* в присутствии кадмия сохранялось на уровне контроля, что, очевидно, также способствовало лучшей адаптации растений к этому металлу.

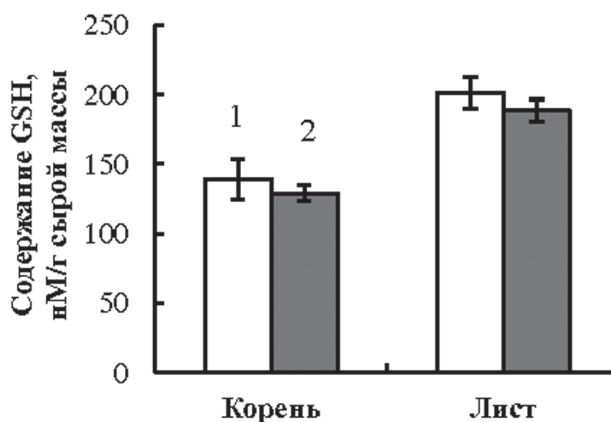


Рис. 2. Влияние кадмия (40 мг/кг субстрата) на содержание GSH в корнях и листьях растений *Elytrigia repens*: 1 – контроль; 2 – опыт

Заключение

Проведенное исследование показало, что растения *Elytrigia repens* способны в течение длительного времени успешно расти в условиях повышенной концентрации кадмия (40 мг/кг субстрата) в корнеобитаемой среде, сохраняя при этом высокий уровень фотосинтеза и водного режима. Анализ полученных результатов позволяет говорить, что важную роль в устойчивости растений этого вида к кадмию играют антиоксидантные ферменты и неферментативные компоненты АОС. При этом в зависимости от органа растений и, соответственно, концентрации металла в его клетках активность разных компонентов АОС неодинакова. В корнях, где накапливается основное количество поглощенного растением кадмия, детоксикация АФК обеспечивается главным образом за счет увеличения активности антиоксидантных ферментов, в частности СОД, КАТ и ПО. В отличие от корней, в листьях растений основная роль в предотвращении окислительного стресса, возникающего под влиянием данного металла, принадлежит неферментативным низкомолекулярным соединениям, таким как GSH и каротиноиды.

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

Литература

Батова Ю. В., Казнина Н. М., Лайдинен Г. Ф., Титов А. Ф. Влияние свинца на рост и некоторые физиолого-биохимические показатели растений пырея ползучего // Структурно-функциональная организация и динамика растительного покрова: матер. Всерос. научн. конф. с межд. участием (Самара, 30–31 янв. 2015 г.). Самара, 2015. С. 204–209.

Гарифзянов А. Р., Жуков Н. Н., Иванищев В. В. Образование и физиологические реакции активных форм кислорода в клетках растений // Современные проблемы науки и образования. 2011. № 2. URL: <http://www.science-education.ru/96-4600> (дата обращения: 03.04.2016).

Елистратова Д. Б. Злаковые растения придорожных полос Нижнего Новгорода // Вестн. Нижегородского ун-та. Сер. Биология. 2008. № 4. С. 82–85.

Казнина Н. М., Титов А. Ф., Батова Ю. В. Содержание непротеиновых тиолов в клетках корня дикорастущих злаков при действии кадмия и свинца // Тр. КарНЦ РАН. 2014. № 5. С. 182–187.

Колупаев Ю. Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции // Вестн. Харьковского нац. аграрн. ун-та. Сер. Биология. 2007. Вып. 3. С. 6–26.

Колупаев Ю. Е., Ястреб Т. О. Физиологические функции неэнзиматических антиоксидантов растений // Вестн. Харьковского нац. аграрн. ун-та. Сер. Биология. 2015. Вып. 2 (35). С. 6–25.

Красновский А. А. (мл.). Фотодинамическое действие и синглетный кислород // Биофизика. 2004. Т. 49. С. 305–321.

Креславский В. Д., Лось Д. А., Аллахвердиев С. И., Кузнецов Вл. В. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений // Физиология растений. 2012. Т. 59, № 2. С. 163–178.

Кудоярова Г. Р., Дедов А. В., Фархутдинов Р. Г., Веселова С. В. Передача сигналов и быстрая стрессовая реакция растений // Вест. Нижегородского ун-та. Сер. Биология. 2001. С. 85–87.

Мерзляк М. Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительных клеток // Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений. М.: ВИНТИ, 1989. Т. 6. 168 с.

Полесская О. Г. Растительная клетка и активные формы кислорода: учебное пособие. М.: КДУ, 2007. 140 с.

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

Титов А. Ф., Казнина Н. М., Таланова В. В. Тяжелые металлы и растения. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2014. 194 с.

Толпыгина О. А. Роль глутатиона в системе антиоксидантной защиты (обзор) // Бюлл. ВЦНЦ СО РАМН. 2012. № 2 (84). Ч. 2. С. 178–180.

Чиркова Т. В. Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям // Соросовский образ. журн. 1997. № 9. С. 12–14.

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

Aebi H. E. Catalase *in vitro* // Methods in Enzymology / Ed. L. Packer. Academic Press: Orlando, FL, USA, 1984. Vol. 105. P. 121–126.

Amirjani M. R. Effects of cadmium on wheat growth and some physiological factors // Int. J. Forest Soil Erosion. 2012. Vol. 2, no. 1. P. 50–58.

Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction // Annu. Rev. Plant Biol. 2004. Vol. 55. P. 373–399.

Asada K. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues // Causes of photooxidative stress and amelioration of defense system in plants / Eds. C. H. Foyer, P. Mullineaux. Boca Raton: CRC Press, 1994. P. 77–104.

Babithaa M. P., Bhath S. G., Prakasha H. S., Shetty H. S. Different induction of superoxide dismutase in downy mildew-resistant and -susceptible genotypes of pearl millet // Plant Pathol. 2002. Vol. 51. P. 480–486.

Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem. 1971. Vol. 44. P. 276–287.

Beauchamp C. O., Fridovich I. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ // Biochim. Biophys. Acta. 1973. Vol. 317. P. 50–64.

- Cai Y., Lin L., Cheng W. et al. Genotypic dependent effect of exogenous glutathione on Cd-induced changes in cadmium and mineral uptake and accumulation in rice seedlings (*Oryza sativa*) // Plant Soil Environ. 2010. Vol. 56, no. 11. P. 516–525.
- Chen X., Wang J., Shi Y. et al. Effect of cadmium on growth and photosynthetic activities in pakchoi and mustard // Botanical Studies. 2011. Vol. 52. P. 41–46.
- Cobbett C., Goldsbrough P. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis // Annu. Rev. Plant Biol. 2002. Vol. 53. P. 159–182.
- Daud M. K., Mei L., Najeed U. et al. In vitro cadmium-induced alterations in growth and oxidative metabolism of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) // Sci. World J. Vol. 2014, ID 309409. 8 p.
- Dixit V., Pandey V., Shyam R. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) // J. Exp. Bot. 2001. Vol. 52, no. 358. P. 1101–1109.
- Djebali W., Gallusci P., Polge C. et al. Modifications in endopeptidase and 20S proteasome expression and activities in cadmium treated tomato (*Solanum lycopersium* L.) plants // Planta. 2008. Vol. 227. P. 625–639.
- Finkel T., Holbrook N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing // Nature. 2000. Vol. 408, no. 9. P. 239–247.
- Guo T. R., Zhang G. P., Zhou M. X. et al. Effects of aluminum and cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activities of two barley genotypes with different Al resistance // Plant Soil. 2004. Vol. 258, no. 1–2. P. 241–248.
- Heath R. L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // Arch. Biochem. Biophys. 1968. Vol. 125. P. 189–198.
- Heiss S., Wachter A., Bogs J. et al. Phytochelatin synthase (PCS) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure // J. Exp. Bot. 2003. Vol. 54. P. 1833–1839.
- Januškaitienė I., Klepeckas M. The effect of equal Cd and Cu exposure in peat substrate on growth and bioaccumulation of *Hordeum vulgare* // Biologija. 2015. Vol. 61, no. 2. P. 83–93.
- Khan M. A., Samiullah S., Singh S., Nazar R. Activities of antioxidative enzymes, sulphur assimilation, photosynthetic activity and growth of wheat (*Triticum aestivum*) cultivars differing in yield potential under cadmium stress // J. Agron. Crop. Sci. 2007. Vol. 193. P. 435–444.
- Liu H., Zhang J., Christie P., Zhang F. Influence of iron plaque on uptake and accumulation of Cd by rice (*Oryza sativa* L.) seedlings grown in soil // Sci. Total Environ. 2008. Vol. 394. P. 361–368.
- Mac Farlane G. R., Burchett M. D. Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the grey mangrove *Avicennia marina* // Mar. Pollut. Bull. 2001. Vol. 42. P. 223–240.
- Maehly A. C., Chance B. The assay of catalase and peroxidase // Meth. Biochem. Anal. 1954. Vol. 1. P. 357–424.
- Mhamdi A., Queval G., Chaouch S. et al. Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as a stress-mimic models // J. Exp. Bot. 2010. Vol. 61, no. 15. P. 4197–4220.
- Mittova V., Tal M., Volokita M., Guy M. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii* // Plant Cell Environ. 2003. Vol. 26. P. 845–856.
- Namdjoyan S. H., Khavari-Nejad R. A., Bernard F. et al. Antioxidant defense mechanisms in response to cadmium treatments in two safflower cultivars // Физиология растений. 2011. Т. 58, № 3. С. 403–413.
- Noctor G., Queval G., Mhamdi A. et al. Glutathione // Arabidopsis Book. American Society of plant Biologists, Rockville, MD. 2011. doi: 10.1199/tab.0142
- Nouairi I., Ben Ammar W., Ben Youssef N. et al. Antioxidant defense system in leaves of Indian mustard (*Brassica juncea*) and rape (*Brassica napus*) under cadmium stress // Acta Physiol. Plant. 2009. Vol. 31, no. 2. P. 237–247.
- Paradiso A., Berardino R., de Pinto M. C. et al. Increase in the ascorbate-glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants // Plant Cell Physiol. 2008. Vol. 49. P. 362–374.
- Pietrini F., Iannelli M. A., Pasqualini S., Massacci A. Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel // Plant Physiol. 2003. Vol. 133, no. 2. P. 829–937.
- Romero-Puertas M. C., Palma J. M., Gómez M. et al. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants // Plant Cell Environ. 2002. Vol. 25. P. 677–686.
- Smirnoff N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule // Curr. Opin. Plant Biol. 2000. Vol. 3. P. 229–235.
- Sneller F. E. C., van Heerwaarden L. M., Koevoets P. L. M. et al. Derivatization of phytochelatin from *Silene vulgaris*, induced upon exposure to arsenate and cadmium: comparison of derivatization with Ellman's reagent and monobromobimane // J. Agric. Food Chem. 2000. Vol. 48. P. 4014–4019.
- Szalai G., Kellos T., Galiba G., Kocsy G. Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions // J. Plant Growth Regul. 2009. Vol. 28. P. 66–80.
- Vanacker H., Carver T. L. W., Foyer C. H. Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in barley-powdery mildew interaction // Plant Physiol. 2000. Vol. 123. P. 1289–1300.
- Wahid A., Ghani A., Javed F. Effect of cadmium on photosynthesis, nutrition and growth of mungbean // Agron. Sustian. Dev. 2008. Vol. 28. P. 273–280.
- Wu F., Zhang G., Dominy P. Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity // Environ. Exp. Bot. 2003. Vol. 50. P. 67–78.
- Zhu Y. L., Pilon-Smits E. A. H., Jouanin L., Terry N. Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance // Plant Physiol. 1999. Vol. 119, no. 1. P. 73–79.

Поступила в редакцию 21.04.2016

References

- Batova Yu. V., Kaznina N. M., Laidinen G. F., Titov A. F. Vliyanie svintsya na rost i nekotorye fiziologo-biokhicheskie pokazateli rastenii pyreya polzuthego [Effect of lead on growth and some physiological and biochemical parameters of *Elytrigia repens* (L.) Nevski. plants]. Strukturno-funktsional'naya organizatsiya i dinamika rastitel'nogo pokrova: mater. Vseros. nauchn. kohf. s mezh. uchastiem (Samara, 30–31 yanv. 2015 g.) [Structural and Functional Organization and Dynamics of Vegetation Cover: Proceedings of All-Russian Scientific Conference with International Participation (Samara, Jan. 30–31, 2015)]. Samara, 2015. P. 204–209.
- Chirkova T. V. Kletochnye membrany i ustoichivost' rastenii k stressovym vozdeistviyam [Cell membranes and plants tolerance to stress]. *Sorosovskii obraz. zurn.* [Soros Educational Journal]. 1997. No. 9. P. 12–14.
- Elistratova D. B. Zlakovye rasteniya pridorozhnykh polos Nizhnego Novgoroda [Cereal plants on roadsides of Nizhny Novgorod]. *Vestn. Nizhegorodskogo un-ta. Ser. Biologiya* [Vestnik of Lobachevsky Un. of Nizhny Novgorod. Biology Series]. 2008. No. 4. P. 82–85.
- Garifzyanov A. R., Zhukov N. N., Ivanishchev V. V. Obrazovanie i fiziologicheskie reaktsii aktivnykh form kisloroda v kletkakh rastenii [Formation and physiological responses of reactive oxygen species in plant cells]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern Problems of Science and Education]. 2011. No. 2. URL: <http://www.science-education.ru/96-4600> (accessed: 03.04.2016).
- Kaznina N. M., Titov A. F., Batova Yu. V. Soderzhanie neproteinovykh tiolov v kletkakh kornja dikorastushchikh zlakov pri deistvii kadmiya i svintsya [Non-protein thiols content in root cells of wild perennial grasses (*Phleum pratense* L. and *Elytrigia repens* L.) treated with cadmium and lead]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. of KarRC of RAS]. 2014. No. 5. P. 182–187.
- Kolupaev Yu. E. Aktivnye formy kisloroda v rasteniyakh pri deistvii stressorov: obrazovanie i vozmozhnye funktsii [Reactive oxygen species in plants under stress factors: formation and possible functions]. *Vestn. Khar'kovskogo nats. agrarn. un-ta. Ser. Biologiya* [Bulletin of Kharkiv National Agricultural University. Biology Series]. 2007. Vol. 3. P. 6–26.
- Kolupaev Yu. E., Yastreb T. O. Fiziologicheskie funktsii neenzimatischeskikh antioksidantov rastenii [Physiological functions of non-enzymatic antioxidants of plants]. *Vestn. Khar'kovskogo nats. agrarn. un-ta. Ser. Biologiya* [Bulletin of Kharkiv National Agricultural University. Biology Series]. 2015. Vol. 2 (35). P. 6–25.
- Krasnovskii A. A. ml. Fotodinamicheskoe deistvie i singletnyi kislorod [Photodynamic action and singlet oxygen]. *Biofizika* [Biophysics]. 2004. Vol. 49. P. 305–321.
- Kreslavsky V. D., Los D. A., Allakhverdiev S. I., Kuznetsov V. V. Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress. *Russ. J. Plant Physiol.* 2012. Vol. 59. P. 141–154.
- Kudojarova G. R., Dedov A. V., Farkhutdinov R. G., Veselova S. V. Peredacha signalov i bystraya stressovaya reaktsiya rastenii [Transmission of signals and rapid stress response of plants]. *Vestn. Nizhegorodskogo un-ta. Ser. Biologiya* [Vestnik of Lobachevsky Un. of Nizhny Novgorod. Biology Series]. 2001. P. 85–87.
- Merzljak M. N. Aktivirovannyi kislorod i okislitel'nye protsessy v membranakh rastitel'nykh kletok [Activated oxygen and oxidation processes in plant cells membranes]. *Itogi nauki i tekhniki. Ser. Fiziologiya rastenii* [Results in Science and Technology. Plant Physiology]. Moscow: VINITI, 1989. Vol. 6. 168 p.
- Polesskaja O. G. Rastitel'naja kletka i aktivnye formy kisloroda: uchebnoe posobie [Plant cells and reactive oxygen species: study guide]. Ed. I. P. Ermakov. Moscow: KDU, 2007. 140 p.
- Seregin I. V., Ivanov V. B. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 2001. Vol. 48, no. 4. P. 523–544.
- Shlyk A. A. Opreделение khlorofillov i karotinoidov v ekstraktakh zelenykh list'ev [Determination of chlorophylls and carotenoids in green leaves extracts]. *Biologicheskie metody v fiziologii rastenii* [Biological Methods for Plant Physiology]. Moscow: Nauka, 1971. P. 154–170.
- Titov A. F., Kaznina N. M., Talanova V. V. Tjazhelye metally i rasteniya [Heavy metals and plants]. Ed. N. N. Nemova. Petrozavodsk: KarRC of RAS, 2014. 194 p.
- Tolpygina A. F. Rol' glutationa v sisteme antioksidantnoi zashity (obzor) [Role of glutathione in an antioxidant defense system (a review)]. *Byull. VSNTS SO RAMN* [Bulletin of the East Siberian Scientific Center SB RAMS]. 2012. No. 2 (84), Part. 2. P. 178–180.
- Aebi H. E. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*. Ed. L. Packer. Academic Press: Orlando, FL, USA, 1984. Vol. 105. P. 121–126.
- Amirjani M. R. Effects of cadmium on wheat growth and some physiological factors. *Int. J. Forest Soil Erosion*. 2012. Vol. 2, no. 1. P. 50–58.
- Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004. Vol. 55. P. 373–399.
- Asada K. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. Causes of photooxidative stress and amelioration of defense system in plants. Eds. C. H. Foyer, P. Mullineaux. Boca Raton: CRC Press. 1994. P. 77–104.
- Babitha M. P., Bhath S. G., Prakasha H. S., Shetty H. S. Different induction of superoxide dismutase in downy mildew-resistant and -susceptible genotypes of pearl millet. *Plant Pathol.* 2002. Vol. 51. P. 480–486.
- Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1971. Vol. 44. P. 276–287.
- Beauchamp C. O., Fridovich I. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. *Biochim. Biophys. Acta.* 1973. Vol. 317. P. 50–64.
- Cai Y., Lin L., Cheng W., Zhang G., Wu F. Genotypic dependent effect of exogenous glutathione on Cd-induced changes in cadmium and mineral uptake and accumulation in rice seedlings (*Oryza sativa*). *Plant Soil Environ.* 2010. Vol. 56, no. 11. P. 516–525.
- Chen X., Wang J., Shi Y., Zhao M. Q., Chi G. Y. Effect of cadmium on growth and photosynthetic activities in pakchoi and mustard. *Botanical Studies.* 2011. Vol. 52. P. 41–46.

- Cobbett C., Goldsbrough P. Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2002. Vol. 53. P. 159–182.
- Daud M. K., Mei L., Najeeb U., Khan M. A., Deeba F., Raza I., Batool A., Zhu S. J. In vitro cadmium-induced alterations in growth and oxidative metabolism of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Sci. World J.* Vol. 2014, ID 309409. 8 p.
- Dixit V., Pandey V., Shyam R. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *J. Exp. Bot.* 2001. Vol. 52, no. 358. P. 1101–1109.
- Djebali W., Gallusci P., Polge C., Boulila L., Galtier N., Raymond P., Chaibi W., Brouquisse R. Modifications in endopeptidase and 20S proteasome expression and activities in cadmium treated tomato (*Solanum lycopersium* L.) plants. *Planta.* 2008. Vol. 227. P. 625–639.
- Finkel T., Holbrook N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000. Vol. 408, no. 9. P. 239–247.
- Guo T. R., Zhang G. P., Zhou M. X., Wu F., Chen J. Effects of aluminum and cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activities of two barley genotypes with different Al resistance. *Plant Soil.* 2004. Vol. 258, no. 1–2. P. 241–248.
- Heath R. L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1968. Vol. 125. P. 189–198.
- Heiss S., Wachter A., Bogs J., Cobbett C., Rausch T. Phytochelatin synthase (PCS) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure. *J. Exp. Bot.* 2003. Vol. 54. P. 1833–1839.
- Januškaitienė I., Klepeckas M. The effect of equal Cd and Cu exposure in peat substrate on growth and bioaccumulation of *Hordeum vulgare*. *Biologija.* 2015. Vol. 61, no. 2. P. 83–93.
- Khan M. A., Samiullah S., Singh S., Nazar R. Activities of antioxidative enzymes, sulphur assimilation, photosynthetic activity and growth of wheat (*Triticum aestivum*) cultivars differing in yield potential under cadmium stress. *J. Agron. Crop. Sci.* 2007. Vol. 193. P. 435–444.
- Liu H., Zhang J., Christie P., Zhang F. Influence of iron plaque on uptake and accumulation of Cd by rice (*Oryza sativa* L.) seedlings grown in soil. *Sci. Total Environ.* 2008. Vol. 394. P. 361–368.
- Mac Farlane G. R., Burchett M. D. Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the grey mangrove *Avicennia marina*. *Mar. Pollut. Bull.* 2001. Vol. 42. P. 223–240.
- Maehly A. C., Chance B. The assay of catalase and peroxidase. *Meth. Biochem. Anal.* 1954. Vol. 1. P. 357–424.
- Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Van Breusegem F., Noctor G. Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as a stress-mimic models. *J. Exp. Bot.* 2010. Vol. 61, no. 15. P. 4197–4220.
- Mittova V., Tal M., Volokita M., Guy M. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Plant Cell Environ.* 2003. Vol. 26. P. 845–856.
- Namdjouyan S. H., Khavari-Nejad R. A., Bernard F., Nejadshattari T., Shaker H. Antioxidant defense mechanisms in response to cadmium treatments in two safflower cultivars. *Russ. J. Plant. Physiol.* 2011. Vol. 58, no. 3. C. 403–413.
- Noctor G., Queval G., Mhamdi A., Chaouch S., Foyer C. H. Glutathione. *Arabidopsis Book.* American Society of plant Biologists, Rockville, MD. 2011. doi: 10.1199/tab.0142
- Nouairi I., Ben Ammar W., Ben Youssef N., Ben Miled D. D., Ghorbal N. H., Zarrouk M. Antioxidant defense system in leaves of Indian mustard (*Brassica juncea*) and rape (*Brassica napus*) under cadmium stress. *Acta Physiol. Plant.* 2009. Vol. 31, no. 2. P. 237–247.
- Paradiso A., Berardino R., de Pinto M. C., Sanità di Toppi L., Srotelli M. M., Tommasi F., de Gara L. Increase in the ascorbate-glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants. *Plant Cell Physiol.* 2008. Vol. 49. P. 362–374.
- Pietrini F., Iannelli M. A., Pasqualini S., Massacci A. Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. *Plant Physiol.* 2003. Vol. 133, no. 2. P. 829–937.
- Romero-Puertas M. C., Palma J. M., Gómez M., Del Río L. A., Sandalio L. M. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell Environ.* 2002. Vol. 25. P. 677–686.
- Smirnoff N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2000. Vol. 3. P. 229–235.
- Sneller F. E. C., van Heerwaarden L. M., Koevoets P. L. M., Vooijs R., Schat H., Verkleij A. C. Derivatization of phytochelatin from *Silene vulgaris*, induced upon exposure to arsenate and cadmium: comparison of derivatization with Ellman's reagent and monobromobimane. *J. Agric. Food Chem.* 2000. Vol. 48. P. 4014–4019.
- Szalai G., Kellos T., Galiba G., Kocsy G. Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. *J. Plant Growth Regul.* 2009. Vol. 28. P. 66–80.
- Vanacker H., Carver T. L. W., Foyer C. H. Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiol.* 2000. Vol. 123. P. 1289–1300.
- Wahid A., Ghani A., Javed F. Effect of cadmium on photosynthesis, nutrition and growth of mungbean. *Agron. Sustian. Dev.* 2008. Vol. 28. P. 273–280.
- Wu F., Zhang G., Dominy P. Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. *Environ. Exp. Bot.* 2003. Vol. 50. P. 67–78.
- Zhu Y. L., Pilon-Smits E. A. H., Jouanin L., Terry N. Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol.* 1999. Vol. 119, no. 1. P. 73–79.

Received April 21, 2016

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Казнина Наталья Мстиславовна

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

Батова Юлия Валерьевна

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

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

Лайдинен Галина Федоровна

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

CONTRIBUTORS:

Kaznina, Natalia

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

Batova, Yulia

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

Titov, Aleksandr

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

Laidinen, Galina

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

УДК 581.19:546

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАДМИЯ И СВИНЦА НА РОСТ И СОДЕРЖАНИЕ ПРОЛИНА В РАСТЕНИЯХ ТРИТИКАЛЕ (*Triticosecale* Wittm.)

Г. А. Абилова

Дагестанский государственный университет

Изучено влияние солей CdSO_4 и $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ в концентрациях 10^{-5}M , 10^{-4}M и 10^{-3}M на некоторые физиологические показатели роста и развития растений тритикале (*Triticosecale* Wittm.) сорта ПРАГ-530. Показано, что соли обоих металлов подавляли энергию прорастания семян тем больше, чем выше концентрация соли. Установлено, что изменения показателей роста, накопления биомассы и аккумуляции пролина надземными и подземными органами растений описывались не в виде монотонной зависимости «доза-эффект», а соответствовали парадоксальному эффекту, при котором увеличение дозы металла приводило к снижению его повреждающего воздействия, а снижение, напротив, увеличивало его. В частности, установлено, что экспозиция растений тритикале в течение восьми суток в растворах $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ стимулировала процессы роста по показателям длины и массы побега, а также корневой системы. При этом свинец в концентрации 10^{-4}M оказался более благоприятным для проростков, чем в концентрации 10^{-5}M . Ответная реакция проростков тритикале, выросших на растворах CdSO_4 , была такой же, за исключением концентрации соли 10^{-3}M , когда процессы роста побега были заторможены, а корня – подавлены полностью. Показано, что в ответ на стресс, вызванный солями металлов свинца и кадмия, растения отвечали аккумуляцией значительного количества пролина в листьях и корнях, который выполнял протекторную функцию. Полученные результаты свидетельствуют об устойчивости растений тритикале к действию тяжелых металлов свинца и кадмия и о большей токсичности кадмия по сравнению со свинцом.

Ключевые слова: тяжелые металлы; пролин; рост; стресс; парадоксальный эффект.

G. A. Abilova. EFFECT OF CADMIUM AND LEAD IONS ON THE GROWTH AND CONTENT OF PROLINE IN PLANTS OF TRITICALE (*Triticosecale* Wittm.)

We studied the effect of CdSO_4 and $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ salts in 10^{-5}M , 10^{-4}M and 10^{-3}M concentrations on some physiological indices of growth and development in plants of triticale (*Triticosecale* Wittm.) cultivar PRAG-530. It is shown that both of the metal salts inhibited germination energy and this effect increased along with salt concentration. It was found that the changes in growth rates, biomass accumulation and accumulation of proline by above- and underground organs of plants cannot be described as a monotonic dose-response dependence, but they are consistent with the paradoxical effect that an increase in the metal dose resulted in a decrease of its damaging effects, whereas a reduction of the metal dose, on the contrary, increased its damaging effect. In particular, it was found that the exposure of triticale plants for 8 days in $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ solutions stimulated growth

processes in terms of length and weight of the shoot and the root system. Interestingly, the toxic 10^{-4} M lead concentration was more favorable for the seedlings than the 10^{-5} M concentration. The response of triticale seedlings grown on CdSO_4 solutions was the same, except for the salt concentration of 10^{-3} M, when growth in shoots was inhibited and that in roots was completely suppressed. It is shown that the plants responded to stress caused by lead and cadmium metal salts with substantial accumulation of proline in leaves and roots, and the compound had the protective function. These results indicate that triticale plants are resistant to heavy metals, lead and cadmium, and that cadmium is more toxic to them than lead.

Key words: heavy metals; proline; growth; stress; paradoxical effect.

Введение

Промышленные предприятия, автотранспорт, минеральные удобрения, пестициды и гербициды, используемые в сельском хозяйстве, – все это источники поступления тяжелых металлов (ТМ) в окружающую среду. Самыми токсичными среди них, оказывающими отрицательное воздействие на физиологические и биохимические процессы в растениях, являются кадмий и свинец [Мазей, 2008]. В первую очередь они влияют на такие процессы, как рост растений [Серегин, Иванов, 2001], дыхание, фотосинтез [Караваев и др., 2001], водный обмен и минеральное питание [Титов и др., 2014]. В основе действия ТМ на растительные организмы лежит окислительный стресс, проявляющийся в усилении образования активных форм кислорода (АФК), нарушающих структуру клетки и ее компонентов [Сазанова и др., 2012]. В определенных пределах эти изменения носят обратимый характер благодаря эффективной работе антиоксидантной системы, состоящей из ферментов и низкомолекулярных соединений, одним из которых является пролин [Стеценко и др., 2011]. В отличие от эссенциальных ТМ, которые в минимальных количествах необходимы для правильного протекания процессов метаболизма (например, медь, железо, цинк), кадмий и свинец являются токсичными металлами и даже в небольших дозах приводят к нарушению метаболических процессов. Однако имеются данные о том, что соли кадмия в концентрации 10^{-5} M и ниже стимулируют рост растений бобов и скорость фотосинтеза [Караваев, Довыдыков, 1999].

В связи с этим цель настоящей работы заключалась в выяснении вопроса, как влияют высокие и низкие концентрации солей кадмия и свинца на процессы прорастания семян и роста проростков тритикале. В качестве одного из показателей, отражающих изменения в антиоксидантной системе, мы исследовали содержание пролина в клетках листьев и корней.

Материалы и методы

Объектом исследования служили растения тритикале (*Triticosecale* Wittm.) сорта ПРАГ-530. Семена тритикале дезинфицировали в течение 10 мин слабым раствором перманганата калия, после чего промывали дистиллированной водой. Далее семена проращивали на фильтровальной бумаге: в контроле – на дистиллированной воде, в опыте – на растворах CdSO_4 и $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 10^{-5} – 10^{-3} M. Проращивание семян осуществляли при комнатной температуре и естественном освещении в течение восьми дней. На третьи сутки определяли энергию прорастания (ЭП) семян путем подсчитывания количества проросших семян от общего количества семян, взятых для анализа. На восьмые сутки эксперимента оценивали действие солей кадмия и свинца на рост растений по следующим биометрическим показателям: длина главного корня и побега, сырая биомасса подземных и надземных органов. Экстракцию и определение количества свободного пролина проводили в листьях и корнях 8-дневных проростков тритикале [Bates et al., 1973].

Повторность в пределах одного варианта опыта для определения длины и массы побега и корня составляла 10 растений, а для определения содержания свободного пролина в листьях и корнях проростков тритикале – 3–5 растений. В таблицах приведены средние арифметические значения и их стандартные отклонения по трем независимым опытам. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента при 5%-м уровне значимости.

Результаты и обсуждение

Несмотря на низкую проницаемость оболочка семян злаковых [Титов и др., 2014], соли кадмия и свинца оказывали ингибирующее действие на прорастание семян (табл. 1). Одинаковые концентрации солей кадмия и свинца вызывали разную степень ингибирования ЭП семян. Если при концентрации CdSO_4 10^{-5} M не

Таблица 1. Влияние $CdSO_4$ и $Pb(NO_3)_2$ на энергию прорастания (ЭП) семян тритикале сорта ПРАГ-530

Концентрация соли, М	Всего семян	$CdSO_4$		$Pb(NO_3)_2$	
		Количество проросших семян	ЭП, %	Количество проросших семян	ЭП, %
Контроль (H_2O)	60	55 ± 2,6	92	55 ± 2,6	92
10^{-5}	60	48 ± 4,6	80	42 ± 3,6	70
10^{-4}	60	49 ± 3,5	82	53 ± 4,5	88
10^{-3}	60	28 ± 2,2*	47	40 ± 2,6*	67

Примечание. Здесь и в табл. 2–4 звездочкой обозначены достоверные различия результатов, полученных по отношению к проросткам, выросшим на дистиллированной воде; $p \leq 0,05$.

Таблица 2. Влияние $Pb(NO_3)_2$ на линейные размеры и биомассу корня и побега у 8-дневных проростков тритикале сорта ПРАГ-530

Концентрация соли, М	Побег		Корень	
	Масса (мг)	Длина (мм)	Масса (мг)	Длина (мм)
Контроль (H_2O)	70 ± 6,6	93 ± 4,3	40 ± 6,0	75 ± 5,7
10^{-5}	78 ± 6,9	111 ± 5,7*	63 ± 4,8*	106 ± 5,5*
10^{-4}	98 ± 6,5*	122 ± 2,9*	104 ± 9,4*	114 ± 4,0
10^{-3}	89 ± 5,9	109 ± 6,1	61 ± 7,9	78 ± 6,8

проросло 20 % семян, то в случае с $Pb(NO_3)_2$ – 30 %. Концентрация соли $CdSO_4$ 10^{-3} М оказалась более токсичной, и доля проросших семян составила 47 % против 67 % для $Pb(NO_3)_2$. Необходимо отметить, что концентрация соли $Pb(NO_3)_2$ 10^{-4} М была для семян менее токсичной по сравнению с 10^{-5} М. Такая же закономерность наблюдалась и с $CdSO_4$, но она была не столь явно выражена.

Исследование интенсивности роста растений показало, что экспозиция растений тритикале в течение восьми суток на растворах $Pb(NO_3)_2$ стимулировала увеличение длины и массы побега, а также корневой системы (табл. 2). Стимулирующими были все концентрации соли, но достоверно отличались от контрольных значений длина и масса побега и корня при концентрациях 10^{-5} – 10^{-4} М. Закономерность, отмеченная при изучении ЭП семян, наблюдается и в этом случае, когда концентрация соли 10^{-4} М способствовала росту проростков в большей степени, чем 10^{-5} М (масса и высота побега при концентрации 10^{-4} М были больше по сравнению с контролем соответственно на 40 и 31 %, а при концентрации 10^{-5} М – только на 11 и 19 %).

Были выявлены те же изменения в корнях: при концентрации $Pb(NO_3)_2$ 10^{-5} М длина и масса корня увеличивались соответственно на 58 и 41 %, а при большей концентрации соли (10^{-4} М) масса корня увеличивалась на 160 %, а длина – на 52 %.

Сульфат кадмия также стимулировал ростовые процессы проростков тритикале, за исключением концентрации 10^{-3} М, когда масса побега составляла только 43 %, высота – 30 % от контроля, а рост корня прекращался полностью.

Как отмечено ранее [Berry, Wallace, 1981], зависимость действия ТМ на организм растений от дозы представляет собой кривую, состоящую из трех отрезков, соответствующих трем фазам – фазе дефицита, фазе толерантности и фазе токсичности. Фаза дефицита наблюдается при действии сверхмалых и малых доз ТМ и сопровождается положительным биологическим ответом при увеличении концентрации соли. Вторая фаза – фаза толерантности – характеризуется тем, что увеличение концентрации ТМ не сопровождается изменением интенсивности ответной реакции растительного организма, кривая выходит на плато. И при использовании концентрации ТМ выше пороговых значений наблюдается фаза токсичности, которая при высоких дозах ТМ завершается гибелью растительного организма. В случае эссенциальных элементов, то есть металлов, необходимых растениям в минимальных дозах, присутствуют все три фазы. Для ТМ, не являющихся жизненно необходимыми для растений, а, напротив, приводящих к нарушению метаболических процессов, отсутствует первая фаза, и минимальные дозы таких элементов вызывают эффект, соответствующий фазе толерантности [Berry, Wallace, 1981].

Изменения линейных размеров и биомассы побега и корня свидетельствуют о том, что $Pb(NO_3)_2$ в концентрациях 10^{-5} – 10^{-3} М и $CdSO_4$ в концентрациях 10^{-5} – 10^{-4} М стимулируют рост проростков тритикале. По-видимому, эти концентрации солей соответствуют на кривой «доза-эффект» фазе толерантности. Однако

Таблица 3. Влияние $CdSO_4$ на линейные размеры и биомассу корня и побега у 8-дневных проростков тритикале сорта ПРАГ-530

Концентрация соли, М	Побег		Корень	
	Масса (мг)	Длина (мм)	Масса (мг)	Длина (мм)
Контроль (H_2O)	70 ± 6,6	93 ± 4,3	40 ± 6,0	75 ± 5,7
10^{-5}	88 ± 4,6*	117 ± 3,3*	85 ± 9,5*	109 ± 4,0*
10^{-4}	78 ± 5,3	109 ± 2,6*	87 ± 8,6*	85 ± 5,4
10^{-3}	30 ± 3,7*	28 ± 1,2*	–	–

Таблица 4. Содержание пролина (мкМ/г сырой массы) в листьях и корнях 8-дневных растений тритикале сорта ПРАГ-530 в зависимости от концентрации $Pb(NO_3)_2$ и $CdSO_4$

Концентрация соли, М	$Pb(NO_3)_2$		$CdSO_4$	
	Листья	Корни	Листья	Корни
Контроль (H_2O)	1,33 ± 0,11	0,67 ± 0,07	1,33 ± 0,11	0,67 ± 0,06
10^{-5}	1,77 ± 0,40*	0,65 ± 0,05	1,69 ± 0,10*	0,86 ± 0,09*
10^{-4}	1,40 ± 0,28	0,62 ± 0,02	1,36 ± 0,06	0,85 ± 0,05
10^{-3}	1,82 ± 0,09*	0,79 ± 0,04	5,40 ± 0,43*	–

немонотонность изменений этих показателей может быть обусловлена парадоксальным эффектом, когда меняется направление ответной реакции организма при возрастании силы воздействующего фактора, то есть увеличение дозы токсиканта приводит к снижению его повреждающего действия, и наоборот, снижение дозы токсиканта увеличивает его повреждающий эффект [Ерофеева, 2016].

Главной причиной изменений физиологических и биохимических процессов в растениях при действии ТМ является окислительный стресс, вызванный избыточным количеством АФК. Обезвреживание АФК в стрессовых условиях обеспечивается многоступенчатой системой защиты, в которой участвуют антиоксидантные ферменты. Однако при окислительном стрессе ферменты могут быть инактивированы не только АФК, но и самими ТМ. В этом случае основную и более эффективную роль антиоксидантов выполняют низкомолекулярные метаболиты, одним из которых является пролин. Иминокислота пролин участвует в детоксикации супероксид-радикала и гидроксил-радикала [Радюкина и др., 2008].

Листья тритикале имели более высокий конститутивный уровень пролина (1,33 мкМ/г сырой массы) по сравнению с корнями (0,67 мкМ/г сырой массы) (табл. 4). После 8 суток выращивания растений в присутствии возрастающих концентраций $Pb(NO_3)_2$ наблюдалось достоверное повышение содержания эндогенного пролина. Исключение составила концентрация соли $10^{-4}M$, когда содержание пролина оставалось на уровне контроля. В клетках корней существенных изменений по сравнению с контролем в аккумуляровании пролина не наблюдалось.

Как видно из данных таблицы 4, при двух концентрациях $CdSO_4$ (исключение $10^{-4}M$, листья) наблюдался достоверно высокий пул пролина, превышающий в среднем контрольные значения на 30 %, а в листьях при концентрации $CdSO_4 10^{-3}M$ – на 300 %, рост корневой системы при этой концентрации соли был полностью подавлен.

Таким образом, изменение содержания пролина в листьях проростков тритикале при возрастании концентрации солей свинца и кадмия также происходит по парадоксальному типу. Уменьшение содержания пролина, наблюдаемое при концентрации солей $10^{-4}M$, по сравнению с $10^{-5}M$, по-видимому, связано с использованием его для «тушения» АФК, что благотворно сказалось на росте и накоплении биомассы тритикале. Концентрация $10^{-3}M Pb(NO_3)_2$ и $CdSO_4$ была летальной, о чем свидетельствует ухудшение состояния растений и наивысший уровень пролина в них.

Выводы

На основании сравнительного анализа ответных реакций побегов и корней тритикале на стресс, вызванный действием солей свинца и кадмия, можно сделать следующие выводы:

1. При действии солей кадмия и свинца на проростки тритикале в малых дозах (10^{-5} – $10^{-4}M$) наблюдалось стимулирование процессов роста и накопления биомассы надземными органами и корнями, что свидетельствует об устойчивости этих растений к действию ТМ.
2. Возникновение немонотонных зависимостей «доза-эффект» при возрастающих концентрациях солей свинца и кадмия для линейных размеров, биомассы побега и корня

и содержания в них пролина обусловлено парадоксальным эффектом.

3. Выявлена отрицательная зависимость между изменениями показателей роста и содержанием пролина тритикале при концентрации 10^{-4} М, что свидетельствует об участии пролина в формировании антиоксидантной активности к действию ТМ.
4. Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что соль $Pb(NO_3)_2$ является менее токсичной для растений тритикале по сравнению с $CdSO_4$.

Литература

Ерофеева Е. А. Гормезис и парадоксальные эффекты у растений в условиях автотранспортного загрязнения и при действии поллютантов в эксперименте: дис. ... докт. биол. наук. Нижний Новгород, 2016. 184 с.

Караваев В. А., Довыдьков С. А. Влияние хлорида кадмия на медленную индукцию флуоресценции и фотосинтез листьев бобов // *Биофизика*. 1999. Т. 44, № 1. С. 145–146.

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

Кузнецова С. А., Климачев Д. А. Влияние кадмия на ростовые процессы и интенсивность фотосинтеза растений пшеницы // *Вестник Московского государственного областного университета*. Серия: Естественные науки. 2014. № 5. С. 20–23.

References

Erofeeva E. A. Gormezis i paradoksal'nye jeffekty u rastenij v uslovijah avtotransportnogo zagraznjenja i pri dejstvii pollutantov v experimente [Hormesis and paradoxical effects on plants under conditions of automobile pollution and pollutants impact in an experiment]: DSc (Dr. of Biol.) thesis. Niznij Novgorod, 2016. P. 184.

Karavaev V. A., Dovydkov S. A. Vlijanie hlorida kadmija na medlennuju indukciju fljuorescencii i fotosintez list'ev bobov [Impact of $CdCl_2$ on slow fluorescence induction and photosynthesis in bean leaves]. *Biophysika* [Biophysics]. 1999. Vol. 44, no. 1. P. 145–146.

Karavaev V. A., Baulin A. M., Gordienko T. V., Dovydkov S. A., Tihonov A. N. Izmenenie fotosinteticheskogo apparata list'ev bobov v zavisimosti ot sodержaniya tyazhelyh metallov v srede vyrashhivaniya [Changes in photosynthetic apparatus of bean leaves depending on heavy metals content in growth medium]. *Physiologija rastenij* [Russian Journal of Plant Physiology]. 2001. Vol. 48, no. 1. P. 47–54.

Kuznetsova S. A., Klimachev D. A. Vlijanie kadmija na rostovye processy i intensivnost' fotosinteza rastenij pshenitsy [Effect of cadmium on growth processes and

Mazei N. G. Vlijanie ionov Cd^{2+} i Pb^{2+} na rost i razvitiye rastenij pshenicy // *Известия Пензенского государственного педагогического университета*. Серия: Естественные науки. 2008. № 10 (14). С. 33–38.

Радюкина Н. Л., Шашукова А. В., Шевякова Н. И., Кузнецов Вл. В. Участие пролина в системе антиоксидантной защиты у шалфея при действии NaCl и параквата // *Физиология растений*. 2008. Т. 55, № 5. С. 721–730.

Сазанова К. А., Башмаков Д. И., Лукаткин А. С. Генерация супероксидного анион-радикала в листьях растений при хроническом действии тяжелых металлов // *Труды КарНЦ РАН*. Серия: Экспериментальная биология. 2012. № 2. С. 119–124.

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

Стеценко Л. А., Шевякова Н. И., Ракитин В. Ю., Кузнецов Вл. В. Пролин защищает растения *Atropa belladonna* от токсического действия солей никеля // *Физиология растений*. 2011. Т. 58, № 2. С. 275–282.

Титов А. Ф., Казнина Н. М., Таланова В. В. Тяжелые металлы и растения. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2014. 194 с.

Bates L. S. Rapid determination of free proline for stress studies // *Plant Soil*. 1973. Vol. 39. P. 205–207.

Berry W. L., Wallace A. Toxicity: the concept and relationship to the dose response curve // *Journal of plant nutrition*. 1981. No. 3. P. 13–19.

Поступила в редакцию 20.06.2016

photosynthesis intensity of wheat plants]. *Vestnik Moskovskogo gosudarstvennogo oblastnogo universiteta*. *Seriia: lestestvennyie nauki* [Bulletin MSRU. Series: Natural Sciences]. 2014. No. 5. P. 20–23.

Mazei N. G. Vlijanie ionov Cd^{2+} i Pb^{2+} na rost i razvitiye rastenija pshenicy [Influence of Cd^{2+} and Pb^{2+} ions on growth and development of wheat plants]. *Izvestiia Penzenskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta*. *Seriia: lestestvennyie nauki* [Proceed. of Penza State Pedagogical Un. Series: Natural Sciences]. 2008. No. 10 (14). P. 33–38.

Radjukina N. L., Shashukova A. V., Shevjakova N. I., Kuznetsov Vl. V. Uchastie prolina v sisteme antioksidantnoi zashity shalfeya pri deistvii NaCl i parakvata [Proline involvement in the common sage antioxidant system in the presence of NaCl and paraquat]. *Physiologija rastenij* [Russian Journal of Plant Physiology]. 2008. Vol. 55, no. 5. P. 721–730.

Sazanova K. A., Bashmakov D. I., Lukatkin A. S. Generacia superoksidnogo anion-radicala v list'jah rastenii pri hronicheskom deistvii tyazholyh metallov [Generation of superoxide anion radical in plants leaves under chronic influence of heavy metals]. *Trudy Karelskogo*

nauchnogo tsentra RAN [Trans. of KarRC of RAS]. 2012. No. 2. P. 119–124.

Serejogin I. V., Ivanov V. B. Fiziologicheskie aspekty toxicheskogo deistviya kadmiya i svintsa na vysshie rasteniya [Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants]. *Physiologiya rastenii* [Russian Journal of Plant Physiology]. 2001. Vol. 48. P. 606–630.

Stetsenko L. A., Sheviakova N. I., Rakitin V. Ju., Kuznetsov V. V. Prolin zashishhaet rasteniia *Atropa belladonna* ot toxicheskogo deistviia solei nikelya [Proline protects *Atropa belladonna* plants against nickel salt

toxicity]. *Physiologiya rastenii* [Russian Journal of Plant Physiology]. 2011. Vol. 5, no. 2. P. 275–282.

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

Bates L. S. Rapid determination of free proline for stress studies. *Plant Soil*. 1973. Vol. 39. P. 205–207.

Berry W. L., Wallace A. Toxicity: the concept and relationship to the dose response curve. *Journal of plant nutrition*. 1981. No. 3. P. 13–19.

Received June 20, 2016

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ:

Абилова Гуляра Абуталибовна

доцент кафедры физиологии растений и теории эволюции биологического факультета, к. б. н.

Дагестанский государственный университет
ул. Гаджиева, 43а, Махачкала, Республика Дагестан,
Россия, 367000

эл. почта: gulyaraabilova@mail.ru

CONTRIBUTOR:

Abilova, Gulyara

Dagestan State University
43a Gadzhiev St., 367000 Makhachkala,
Republic of Dagestan, Russia
e-mail: gulyaraabilova@mail.ru

УДК 577.3

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА С ШУНГИТОВЫМ НАНОУГЛЕРОДОМ

А. С. Горюнов, С. П. Рожков, Г. А. Суханова, А. Г. Борисова

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Особенности механизма биоактивности шунгитового наноуглерода (ShC), как новой ультрадисперсной формы углерода, представляют большой интерес с точки зрения биомедицинских приложений наноматериала и охраны окружающей среды. Термодинамические эффекты взаимодействия ShC с сывороточным альбумином (СА) человека в водной нанодисперсии исследовались методом дифференциальной сканирующей калориметрии в аспекте молекулярной структуры и фракционного состава белка. Путем деконволюции кривой денатурации альбумина на основе гауссовых функций проанализированы характеристики (температуры, энтальпии) отдельных эндотермических переходов белка. Установлено, что основным эффектом взаимодействия СА и ShC в растворе является увеличение разницы температур индивидуальных переходов, причем общей тепловой дестабилизации белка не происходит, хотя имеет место частичная дестабилизация. Этот результат не может быть следствием изменения внутримолекулярных межмолекулярных взаимодействий в белковых макромолекулах при межмолекулярных взаимодействиях с ShC из-за доступности поверхности наночастиц лишь малой доле общего белка в нанодисперсии. Показано, что в основе наблюдаемых эффектов лежит влияние ShC на соотношение белковых фракций с разным содержанием жирных кислот (ЖК) через воздействие на часть ЖК в центрах связывания на белке и их переход на наночастицы. При этом, вероятно, имеет место конкуренция белка и наноуглерода за ЖК, при которой определяющую роль может играть соотношение их концентраций в дисперсии. Значение такой конкуренции связано с ее возможным использованием для воздействия на транспортную функцию сывороточного альбумина по отношению к ЖК.

Ключевые слова: белок; водная нанодисперсия углерода; дифференциальная сканирующая калориметрия; жирные кислоты.

**A. S. Goryunov, S. P. Rozhkov, G. A. Sukhanova, A. G. Borisova.
THERMODYNAMIC EFFECTS OF SERUM ALBUMIN INTERACTION WITH
SHUNGITE NANOCARBON**

The bioactivity features of shungite nanocarbon (ShC) as a new ultrafine carbon form are of particular interest from the point of view of both biomedical applications of the nanomaterial and environmental issues. Thermodynamic effects of human serum albumin (SA) interaction with ShC in water nanodispersion have been studied regarding the molecular structure and protein fraction content using differential scanning calorimetry. Deconvolution of the albumin denaturation curve on the basis of Gaussian functions was used to analyze the characteristics (temperature, enthalpy) of individual endothermic

transitions of the protein. The increase of the temperature difference of individual transitions was found to be the major SA-ShC interaction effect. No overall thermal destabilization of the protein was observed, although some partial destabilization did occur. This result cannot ensue from changes in intramolecular interdomain interactions in protein molecules at intermolecular interactions with ShC since only a small part of the total protein in nanodispersion has access to nanoparticle surface. The effects observed are shown to be related to the ShC influence on the ratio of the protein fractions with different fatty acids (FA) content by affecting some part of FA at their protein binding sites and their transition to nanoparticles. Protein and nanocarbon probably compete for FA in the process, and their concentration ratio in the dispersion is of decisive importance. The significance of this sort of competition consists in the possibility to influence the transport function of serum albumin with respect to FA.

Key words: protein; water carbon nanodispersion; differential scanning calorimetry; fatty acids.

Введение

Понимание фундаментальных взаимодействий новых ультрадисперсных форм углерода с биологическими молекулами, тканевыми структурами и целыми организмами является первоочередным с точки зрения как биомедицинских приложений, так и охраны окружающей среды [Wang et al., 2016]. В ряду наноматериалов, встречающихся в окружающей среде, преобладают углеродосодержащие. Один из ярких примеров – шунгитовый наноуглерод (ShC) [Rozhkova et al., 2016], который весьма специфичен, довольно широко распространен и активно внедряется в различные биоактивные продукты не всегда с достаточным обоснованием. Физико-химические механизмы биоактивности ShC малоизучены и малопонятны в особенности в том, что касается наноуглерода, высвобождаемого непосредственно из шунгитовой породы в результате взаимодействия с водой в различных процедурах получения водных дисперсий ShC. Биомолекулярные эффекты, будучи выясненными, смогут найти рациональное использование при поиске и применении новых функций углеродных наноматериалов и обеспечении биологической безопасности.

Результаты исследований структуры белковых молекул при взаимодействии с наночастицами различной природы, в том числе углеродными, свидетельствуют, что изменения возможны на уровне как вторичной, так и третичной структуры белка [Brandes et al., 2006; Narayanan et al., 2007]. Метод дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (ДСК) позволяет делать выводы о структурном состоянии белковых макромолекул в составе комплекса с наноуглеродом на основе термодинамических данных о теплотемпературных дисперсиях при изменении их температуры,

об энтальпии тепловой денатурации белка, о характеристических температурах последовательных стадий разворачивания макромолекул. Это один из прямых методов, в котором при исследовании дисперсии макромолекул и их комплексов доменная организация белка может проявиться непосредственно на термограмме [Privalov, 1982]. Мы исследовали термодинамические эффекты взаимодействия ShC с сывороточными альбуминами в водной нанодисперсии с учетом фракционного состава и структуры белка методом ДСК. Основной белок плазмы млекопитающих сывороточный альбумин (СА) в настоящее время представляет интерес с точки зрения разработки лекарственных препаратов, поскольку может быть использован для того, чтобы скрыть активный ингредиент внутри белковой матрицы во избежание его преждевременного распознавания защитными системами организма. За счет взаимодействия с наночастицами углерода также может быть повышен потенциал СА как носителя органических лигандов.

Материалы и методы

Использовались препараты коммерческого обезжиренного (5-я фракция) и обезжиренного сывороточного альбумина человека (САЧ) производства PAA Laboratories GmbH. Стабильные водные дисперсии наночастиц ShC (ShCNP) представляли собой приготовленные из шунгитового горнорудного сырья Шуньга I согласно методике Н. Н. Рожковой [2011] и охарактеризованные с помощью спектрофотометрии UV-Vis, рамановского рассеяния и динамического рассеяния света (ДРС) образцы нанодисперсии с концентрацией 0,08–0,18 г/л ShC и pH 7,2–7,4. Размер ShCNP определялся по максимуму кривой распределения интенсивности ДРС (Nanosizer NanoZS,

Таблица 1. Температура (°C) переходов плавления сывороточного альбумина человека в водном растворе и в водной дисперсии шунгитового наноуглерода

Состав раствора	№ перехода						
	Общий	1	2	3	3-1	3-2	2-1
САЧ	73,4 ± 2,7	62,1 ± 3,9	70,3 ± 2,1	76,3 ± 1,5	14,2	6,0	8,2
САЧ + ShC	76,2 ± 1,0	56,7 ± 2,9	68,7 ± 3,9	76,9 ± 1,5	20,2	8,2	12,0

Примечание. САЧ – обезжиренный сывороточный альбумин человека, ShC – шунгитовый наноуглерод. 3-1, 3-2, 2-1 – разницы температур (°C) переходов попарно, исключая общий. Указаны стандартные ошибки (n = 12).

Malvern) по размерам при 51 нм и полуширине 21 нм. Термодинамические свойства САЧ изучались с помощью микрокалориметра NanoDSC (TA-Instruments) в водных нанодисперсиях ShC путем регистрации термограмм (зависимостей избыточного теплотогощения растворов СА от температуры). Использование малых концентраций белка – 0,5 г/л – обеспечивало наивысшие возможные соотношения ShC/СА и, соответственно, максимальный эффект взаимодействия ShC и САЧ. Анализ данных ДСК методом деконволюции термограмм проводился с помощью пакета программ обработки микрокалориметрических данных TA Instruments NanoAnalyze™ Software.

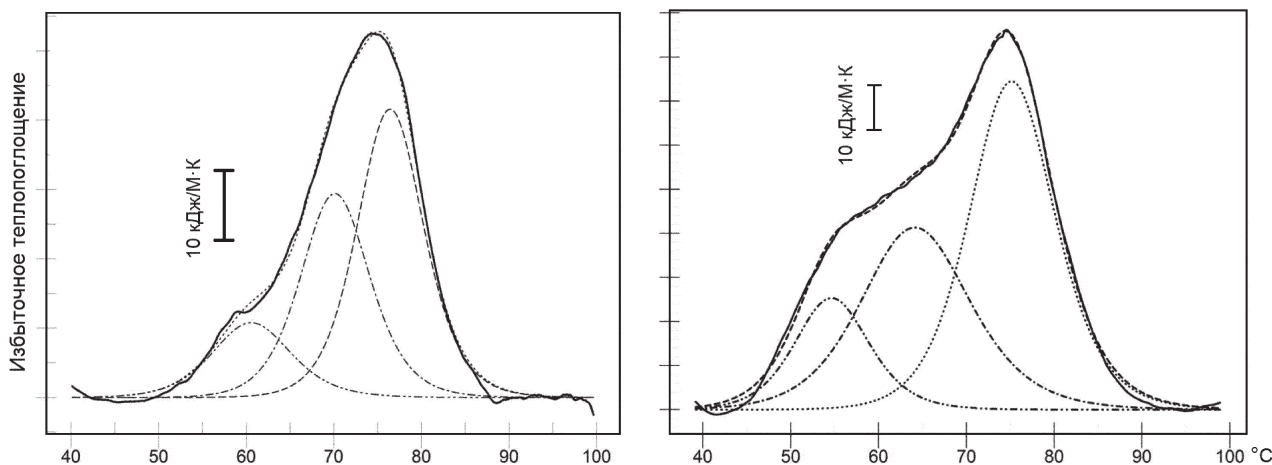
Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования ИБ КарНЦ РАН «Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера».

Результаты и обсуждение

Кривая денатурации СА может быть представлена в виде комбинации трех гауссовых составляющих, которые соответствуют трем независимым эндотермическим переходам,

отвечающим плавлению трех доменов молекулы СА [Тиктопуло и др., 1985]. При этом предполагается, что каждый переход соответствует двухстадийной модели, т. е. происходит между двумя состояниями – нативным и денатурированным – по типу «все или ничего». Деконволюция на основе гауссовых функций позволяет разделить весь эндотермический переход молекул СА на такие отдельные переходы, отвечающие денатурационному превращению разных частей структуры (термодинамических доменов).

На рисунке представлены термограммы обезжиренного САЧ в водном растворе при концентрации 0,5 г/л и при внесении в раствор нанодисперсии ShC в концентрации 0,08 г/л, а также соответствующие кривые деконволюции. Они показывают, что полученные термограммы удовлетворительно описываются функцией, составленной минимум из трех гауссовых слагаемых. Эти температурные зависимости избыточного теплотогощения в целом подобны как по соотношению трех переходов, так и по их характеристикам, однако степень разрешения переходов в присутствии ShC заметно повышается при исследованных концентрациях СА. Проявляется это как гораздо более выраженное низкотемпературное плечо



Термограммы коммерческого обезжиренного сывороточного альбумина человека (САЧ) (0,5 г/л; pH 5,5) (сплошные кривые), гауссовы составляющие термограмм (симметричные пунктирные и штрих-пунктирные кривые), их сумма (асимметричные пунктирные кривые). Слева – раствор САЧ, справа – САЧ в водной нанодисперсии шунгитового углерода. Вертикальными отрезками показан масштаб оси избыточного теплотогощения для каждой из термограмм

Таблица 2. Энтальпия (кДж/М) переходов плавления сывороточного альбумина человека в водном растворе и в водной дисперсии шунгитового нанougлерода

Состав раствора	№ перехода						
	Общий	1	2	3	3-1	3-2	2-1
САЧ	994,1 ± 135,4	267,9 ± 59,9	328,5 ± 54,3	397,8 ± 54,1	129,9	69,3	60,6
САЧ + ShC	946,5 ± 128,5	254,0 ± 54,8	288,1 ± 84,1	404,5 ± 84,0	150,5	116,4	34,1

Примечание. САЧ – обезжиренный сывороточный альбумин человека, ShC – шунгитовый нанougлерод. 3-1, 3-2, 2-1 – разницы энтальпий (кДж/М) переходов попарно, исключая общий. Указаны стандартные ошибки (n = 12).

термограммы. При этом существенно изменяются: а) разница температур 1-го и 2-го слагаемых (переходов), с одной стороны, и 3-го перехода – с другой; б) соотношение энтальпий переходов в пользу 1-го и 2-го переходов. Аналогичный эффект был предварительно обнаружен нами ранее для больших концентраций САЧ – 5, 10 и 17 г/л [Rozhkov, Goryunov, 2013].

Результаты обработки термограмм, представленных на рисунке и аналогичных им, показаны в таблице 1. Видно, что в присутствии ShC разница температур увеличивается во всех трех парах переходов. Это означает, что в результате взаимодействия с ShC кооперативность общего перехода заметно снижается, о чем свидетельствует количественный показатель – разница температур индивидуальных переходов термодинамических доменов. Увеличение разницы температур, как следует из таблицы 1, происходит в первую очередь за счет снижения температуры 1-го перехода и в меньшей степени – 2-го, тогда как 3-й переход совершенно не смещается. В этой связи повышение температуры общего пика не отражает общей стабилизации белка, а является результатом формального применения процедуры автоматического определения максимума термограммы.

В таблице 2 представлены рассчитанные из тех же термограмм значения энтальпии переходов плавления обезжиренного САЧ. Здесь также наблюдается некоторая тенденция к увеличению разницы энтальпий 3-го и остальных переходов, хотя различия между раствором при отсутствии и в присутствии ShC не столь очевидны и с учетом погрешности измерений даже во многих случаях незначимы.

Введение ShC в раствор обезжиренного коммерческого САЧ не вызывает при концентрации белка 0,5 г/л никаких изменений в процессе плавления (термоиндуцированного денатурационного перехода): термограммы имеют максимум и основной, доминантный пик в области 60 °С и плечо в области 80 °С в соответствии с известными данными [Степуро и др., 1991].

Таким образом, основным эффектом взаимодействия САЧ и ShC в растворе является

увеличение разницы температур индивидуальных переходов. При этом увеличения температуры третьего, самого большого, перехода, как и достоверного повышения температуры общего перехода, не наблюдается. Это говорит о том, что общей тепловой дестабилизации белка при взаимодействии с нанougлеродом не происходит, но имеет место частичная дестабилизация: температура двух переходов из трех снижается по отношению к третьему.

Этот результат может быть расценен как следствие изменения внутримолекулярных межмолекулярных взаимодействий в белковых макромолекулах под влиянием межмолекулярных взаимодействий с ShCNP. Однако следует учесть соотношение поверхностей контакта белка и наночастиц углерода. Так, исходя из размеров ShCNP 51 нм, полученных методом ДРС, известных размеров молекул САЧ и предположения об однослойной адсорбции, даже при сравнимых концентрациях белка и наночастиц оказывается, что поверхность наночастицы доступна лишь малой доле (менее процента) всего белка в дисперсии. И тем меньшая доля белка может входить в контакт, оказываясь под влиянием взаимодействия с наночастицами при больших – 10–15 г/л – концентрациях СА, при которых эффект также заметен [Rozhkov, Goryunov, 2013]. Все это не позволяет ожидать, что даже большие изменения в структуре столь малой доли белка при таком контакте приведут к наблюдаемым значительным изменениям формы термограмм. К тому же существенных изменений в процессе термоиндуцированного денатурационного перехода обезжиренного СА в присутствии ShC не отмечается.

Другая возможность – это изменение соотношения фракций белка, различающихся по количеству и/или типу связанных жирных кислот (ЖК). Действительно, в состоянии, далеком от насыщения жирными кислотами центров их связывания на белке, как в коммерческом обезжиренном или полученном из плазмы крови доноров СА (0,5–2,0 молей ЖК на 1 моль СА), имеет место раздвоение пика теплопоглощения белка, причем при снижении насыщения соотношение интенсивностей пиков существенно изменяется в пользу

низкотемпературного пика [Степуро и др., 1991]. Именно такого рода изменения формы термограмм в нанодисперсии ShC можно видеть на рисунке. Это позволяет допустить, что повышение разрешенности пиков в присутствии ShC связано с изменением соотношения фракций белка с разным насыщением в сторону менее насыщенных жирными кислотами фракций и, вероятно, с переносом части ЖК с СА на ShCNP. Быстрый обмен, который имеет место между белковой «коронай» наночастицы и белком в растворе [Gossmann et al., 2015], обеспечивает при этом участие в переносе значительной или большей доли белка в нанодисперсии ShC. Это и делает изменения формы термограмм существенными.

Приведенные результаты позволяют заключить, что наблюдаемые эффекты связаны с влиянием ShC на соотношение фракций через воздействие на часть ЖК в центрах их связывания на белке. При этом, вероятно, имеет место конкуренция САБ и ShC за ЖК, при которой определяющее значение может иметь соотношение их концентраций в дисперсии.

Очевидно, здесь проявляется эффект перехода ЖК с белка на углеродную матрицу, который используется в процедуре очистки СА от ЖК с помощью активированного угля. Однако соотношение концентраций белка и углерода в данном случае совершенно иное: преобладает белок, а не углерод, как при очистке. Это делает такой эффект значимым с точки зрения его влияния на связывание органических лигандов (ЖК), а значит, и с физиологической точки зрения, если иметь в виду, например, транспортную функцию СА по отношению к ЖК.

Для детального выяснения механизма перехода ЖК с белка на ShC требуется исследование влияния нанougлерода, введенного в белковый раствор, на распределение СА по фракциям, различающимся по количеству и/или типу связанных ЖК.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (тема № 0221-2014-0010).

References

Rozhkova N. N. Nanouglerod shungitov [Shungite nanocarbon]. Petrozavodsk: KarRC of RAS, 2011. 100 p.
Stepuro I. I., Lapshina E. A., Chaykovskaya N. A. Issledovanie teplovy denaturatsii syvorotochnogo albumina cheloveka v vodno-spirovoyh i vodno-solevyh rastvorah v prisutstvii organicheskikh ligandov [Study of heat

Литература

Rozhkova N. N. Нанougлерод шунгитов. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2011. 100 с.

Stepuro I. I., Lapshina E. A., Chaykovskaya N. A. Исследование тепловой денатурации сывороточного альбумина человека в водно-спиртовых и водно-солевых растворах в присутствии органических лигандов // Молекулярная биология. 1991. Т. 25. С. 337–347.

Tiktopulo E. I., Privalov P. L., Borisenko S. N., Troitskiy G. V. Микрокалориметрическое исследование доменной структуры альбумина // Мол. биология. 1985. Т. 19, № 4. С. 1072–1078.

Brandes N., Welzel P. B., Werner C., Kroh L. W. Adsorption-induced conformational changes of proteins onto ceramic particles: differential scanning calorimetry and FTIR analysis // J. Colloid Interface Sci. 2006. Vol. 299, no. 1. P. 56–69. doi: 10.1016/j.jcis.2006.01.065

Gossmann R., Fahrländer E., Hummel M. et al. Comparative examination of adsorption of serum proteins on HSA- and PLGA-based nanoparticles using SDS-PAGE and LC-MS // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2015. Vol. 93. P. 80–87. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.03.021

Narayanan S. S., Sarkar R., Pal S. K. Structural and Functional Characterization of Enzyme-Quantum Dot Conjugates: Covalent Attachment of CdS Nanocrystal to α -Chymotrypsin // J. Phys. Chem. C. 2007. Vol. 111, no. 31. P. 11539–11543. doi: 10.1021/jp072636j

Privalov P. L. Stability of proteins. Proteins which do not present a single cooperative system // Adv. Prot. Chem. 1982. Vol. 35. P. 1–104. doi: 10.1016/S0065-3233(08)60468-4

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Interaction of shungite carbon nanoparticles with blood protein and cell components // Rus. J. Gen. Chem. 2013. Vol. 83, no. 13. P. 2585–2595. doi: 10.1134/S1070363213130021

Rozhkova N. N., Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Natural graphene based shungite nanocarbon // Carbon nanomaterials sourcebook. Graphene, fullerenes, nanotubes, and nanodiamonds / Ed. K. D. Sattler. Boca Raton, CRC Press Taylor and Francis Group, 2016. Vol. 1. P. 153–176. doi: 10.1201/b19679-9

Wang Z., Zhu W., Qiu Y. et al. Biological and environmental interactions of emerging two-dimensional nanomaterials // Chem. Soc. Rev. 2016. Vol. 45, no. 6. P. 1750–1780. doi: 10.1039/c5cs00914f

Поступила в редакцию 20.07.2016

domennoj struktury albumina [Microcalorimetric study of the domain structure of serum albumin]. *Molekulyarnaya biologiya [Molecular Biology]*. 1985. Vol. 19, no. 4. P. 1072–1078.

Brandes N., Welzel P. B., Werner C., Kroh L. W. Adsorption-induced conformational changes of proteins onto ceramic particles: differential scanning calorimetry and FTIR analysis. *J. Colloid Interface Sci.* 2006. Vol. 299, no. 1. P. 56–69. doi: 10.1016/j.jcis.2006.01.065

Gossmann R., Fahrlander E., Hummel M., Mulaca D., Brockmeyer J., Langer K. Comparative examination of adsorption of serum proteins on HSA- and PLGA-based nanoparticles using SDS-PAGE and LC-MS. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2015. Vol. 93. P. 80–87. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.03.021

Narayanan S. S., Sarkar R., Pal S. K. Structural and Functional Characterization of Enzyme-Quantum Dot Conjugates: Covalent Attachment of CdS Nanocrystal to α -Chymotrypsin. *J. Phys. Chem.* 2007. C. Vol. 111, no. 31. P. 11539–11543. doi: 10.1021/jp072636j

Privalov P. L. Stability of proteins. Proteins which do not present a single cooperative system. *Adv. Prot. Chem.* 1982. Vol. 35. P. 1–104. doi: 10.1016/S0065-3233(08)60468-4

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Interaction of shungite carbon nanoparticles with blood protein and cell components. *Rus. J. Gen. Chem.* 2013. Vol. 83, no. 13. P. 2585–2595. doi: 10.1134/S1070363213130021

Rozhkova N. N., Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Natural graphene based shungite nanocarbon. Carbon nanomaterials sourcebook. Graphene, fullerenes, nanotubes, and nanodiamonds. Ed. K. D. Sattler. Boca Raton, CRC Press Taylor and Francis Group, 2016. Vol. 1. P. 153–176. doi: 10.1201/b19679-9

Wang Z., Zhu W., Qiu Y., Yi X., von dem Bussche A., Kane A., Gao H., Koski K., Hurt R. Biological and environmental interactions of emerging two-dimensional nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* 2016. Vol. 45, no. 6. P. 1750–1780. doi: 10.1039/c5cs00914f

Received July 20, 2016

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Горюнов Андрей Сергеевич

ведущий научный сотрудник, к. ф.-м. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: goryunov@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 765264

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

Суханова Галина Антоновна

главный физик
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: goryunov@krc.karelia.ru

Борисова Александра Григорьевна

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

CONTRIBUTORS:

Goryunov, Andrey

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: goryunov@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 765264

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

Sukhanova, Galina

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

Borisova, Alexandra

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

УДК 577.152.34.032:597.553.2_113.32

АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ГИДРОЛАЗ (ПРОТЕИНАЗ И НУКЛЕАЗ) У РАЗНОВОЗРАСТНОЙ МОЛОДИ ЛОСОСЯ (*SALMO SALAR* L.) ИЗ Р. ИНДЕРА

**М. Ю. Крупнова, Е. А. Вдовиченко, Р. У. Высоцкая,
Д. А. Ефремов, А. Е. Веселов, Н. Н. Немова**

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Приведены результаты исследования активности лизосомальных гидролаз (нуклеаз и протеиназ – катепсинов) у сеголеток 0+, пестряток 1+, 2+, смолтов 2+ и 3+ лосося (*Salmo salar* L.) из р. Индера бассейна Белого моря, свидетельствующие об их возможном участии в процессах, сопровождающих рост и развитие молоди. Максимальные значения уровня активности исследуемых ферментов обнаружены у сеголеток в возрасте 0+, что связано, по-видимому, с обеспечением «строительными блоками» биосинтетических процессов накопления белка, необходимого для последующих структурных преобразований растущей молоди в период, когда завершается эндогенное и начинается переход на смешанное питание. В дальнейшем развитии молоди лосося (пестрятки возраста 1+, 2+ и смолты возраста 2+, 3+) активность катепсина D (основного протеолитического фермента лизосом с катаболической функцией) в печени несколько снижается, а в скелетных мышцах она практически не обнаруживается. Такие изменения в активности катепсина D согласуются с недетерминированностью процессов роста у рыб, в основе которой лежит преобладание синтетических процессов над катаболическими. Сравнительно высокая активность катепсина B (цистеиновой протеиназы лизосом с регуляторной функцией) и нуклеаз (РНказы и ДНказы) у молоди лосося более старших возрастов (3+ смолты), скорее всего, отражает роль этих ферментов в процессах формирования смолтов, способных к последующей миграции для нагула в море. Выявленная динамика активности лизосомальных гидролаз у молоди лосося свидетельствует о наличии корреляции между активностью исследуемых ферментов и возрастом рыб, что указывает на участие лизосомальных ферментов в перестройках белкового обмена, сопровождающих процессы роста и раннего развития лососевых.

Ключевые слова: лизосомы; протеазы; нуклеазы; раннее развитие; лосось *Salmo salar* L.; р. Индера.

**M. Yu. Krupnova, E. A. Vdovichenko, R. U. Vysotskaya, D. A. Efremov,
A. E. Veselov, N. N. Nemova. THE ACTIVITY OF LYSOSOMAL
HYDROLASES (PROTEASES AND NUCLEASES) IN SALMON (*SALMO
SALAR* L.) JUVENILES OF DIFFERENT AGE CATEGORIES FROM THE
INDERA RIVER**

The results on the activity of lysosomal hydrolases (proteases (cathepsins) and nucleases) in salmon (*Salmo salar* L.) underyearlings (0+), 1+ and 2+ parr, and smolts (2+, 3+) from the Indera River (White Sea drainage basin) are reported, testifying their possible

involvement in the processes accompanying the growth and development of juveniles. The highest levels of the enzymes' activity found in 0+ fish were probably related to the demand for "building blocks" for the biosynthetic processes of protein accumulation necessary for the subsequent structural changes in growing juveniles switching from endogenous nutrition to a mixed diet. Further on, in 1+ & 2+ parr and 2+ & 3+ smolts, the activity of cathepsin D (lysosomal proteolytic enzyme with a catabolic function) decreased somewhat in the liver and was virtually undetectable in skeletal muscles. These changes in the activity of cathepsin D are consistent with the indeterminacy of growth processes in fish, which is based on the prevalence of synthetic processes over catabolic ones. The relatively high activity of cathepsin B (lysosomal cysteine protease with a regulatory function) and nucleases (RNase and DNase) in older salmon smolts (3+) most likely reflects the role of these enzymes in forming the smolts' fitness for foraging migration to the sea. The revealed changes in the activity of lysosomal hydrolases in salmon juveniles indicates there is a correlation between the activity of the enzymes and the fish age, showing that lysosomal enzymes are involved in protein metabolism rearrangements accompanying the processes of growth and development in salmonids.

Key words: lysosomes; proteases; nucleases; early development; salmon *Salmo salar* L.; Indera River.

Введение

На реках Кольского полуострова воспроизводится крупнейшая в России популяция атлантического лосося *Salmo salar* L., в жизненном цикле которого центральное место занимают размножение и нерест [Веселов, Калюжин, 2001]. Подготовка к реализации репродукции начинается в раннем онтогенезе и продолжается вплоть до наступления половой зрелости [Казаков, Веселов, 1998]. На каждом этапе онтогенеза происходят определенные морфологические и физиологические изменения, в основе которых лежат биохимические процессы, которые обеспечиваются взаимодействием различных метаболических систем клетки. К числу таких систем с реконструктивной и защитной функциями относятся лизосомы, обладающие широким комплексом гидролитических ферментов, активных при кислых значениях pH, которые способны расщеплять все органические компоненты клетки [Покровский, Тутельян, 1976; Дин, 1980; Высоцкая, Немова, 2008]. Одними из важнейших лизосомальных гидролаз являются ферменты, обеспечивающие нуклеиновый и тесно с ним связанный белковый обмен в лизосомах, катализирующие гидролиз нуклеотидов и белков, продукты которого могут использоваться в дальнейшем в процессах биосинтезов, сопровождающих рост и развитие организма. Изучение биохимических особенностей процесса роста рыб проводится главным образом на белых мышцах, так как они вносят наибольший вклад в синтез и запасание белка растущего организма рыбы, составляют значительную часть тела (около 60 % веса) и отражают темпы роста рыб [Houlihan et al., 1995].

Печень – орган полифункциональный, чрезвычайно важный для процессов роста и развития любого организма. Практически все вещества (нутриенты, микроэлементы, ксенобиотики), тем или иным путем поступающие в организм, подвергаются химическим преобразованиям в печени и перераспределяются по органам и тканям. В этих процессах участвуют самые разнообразные ферменты, в том числе кислые гидролазы, роль которых не сводится только к гидролизу экзогенных веществ, они также выполняют и ряд вспомогательных функций. В частности, высокая интенсивность и многообразие выполняемых гепатоцитами функций сопряжены с частыми перестройками метаболического аппарата, сопровождающимися дифференциальной активацией клеточного генома для обеспечения синтеза новых структурных и каталитических белков. При этом вовлечение кислых нуклеаз обеспечивает реутилизацию отработанных матриц белков (мРНК), рибосом, тРНК цитоплазмы. У костистых рыб в печени рассеяны участки экзокринной ткани поджелудочной железы [Аминева, Яржомбек, 1984], поэтому повышенное количество лизосом в печени и, как следствие, высокая активность лизосомальных ферментов могут быть обусловлены участием в процессах регуляции секреции – кринофагии [Покровский, Крыстев, 1977].

В настоящей работе изучалась динамика активности основных лизосомальных протеиназ (катепсинов В и D) и нуклеаз (РНКаза, ДНКаза) в целом организме, скелетных мышцах и печени разновозрастной молоди лосося, отловленной в р. Индера (Кольский п-ов, Терский берег Белого моря), в процессах раннего развития и смолтификации.

Таблица 1. Размерно-весовые характеристики молоди лосося *Salmo salar* L. разных возрастов

Показатели	Возраст				
	0+ сеголетки	1+ пестрятки	2+ пестрятки	2+ смолты	3+ смолты
Длина тела, см	2,8 ± 0,10	6,1 ± 0,3	10,8 ± 0,4	11,9 ± 0,6	14,0 ± 0,2
Масса тела, г	0,16 ± 0,1	1,5 ± 0,1	10,8 ± 0,6	13,5 ± 0,4	21,0 ± 0,5
<i>n</i>	5	7	5	7	5

Материалы и методы

При проведении исследований использовались субстраты протеиназ и нуклеаз и химические вещества, произведенные Sigma-Aldrich (США); приборы ЦКП ИО ИБ КарНЦ РАН: гомогенизатор Tissue Lyser LT (Qiagen, Германия), центрифуга Allegra 64R Beckman Coulter (США), термостатирующая водяная баня УТ-4334 (Россия), спектрофотометр СФ-2000 (ЗАО «ОКБ-Спектр», Россия).

Отлов молоди лосося разных возрастов проводили с помощью аппарата электролова Fa-2 (Норвегия) [Нефедова и др., 2014] на пороговых и перекатных участках реки Индера в середине июня (температура воды 11,5 °С) (рис. 1).

Отбирали молодь лосося разных возрастов: 0+ (сеголетки), 1+ и 2+ (пестрятки), 2+ и 3+ (смолты). После вылова молодь выдерживали в течение суток в садках, затем помещали в жидкий азот и транспортировали в лабораторию для дальнейших биохимических исследований. Следует заметить, что поскольку сеголетки имеют сравнительно небольшие размеры и вес, их брали на биохимический анализ целиком, а у пестряток и смолтов масса тела

и размеры позволяли отделить мышцы и печень. Данные о длине и массе тела исследуемой молоди лосося приведены в таблице 1.

Количественное содержание растворимого белка в тканях (мг/г ткани) определяли по методу М. Бредфорда [Bradford, 1976], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Определение активности лизосомальных ферментов

Активность лизосомальных протеиназ. Гомогенизацию образцов проводили в соотношении 1:9 (вес/об.) в растворе 0,25 М сахарозы с добавлением 0,1% Тритона X-100 (Merck) (1200 об./мин, 60 с) и последующего центрифугирования (10 000 г, 30 мин). В супернатанте определяли активность цистеиновой протеиназы лизосом – катепсина В (КФ 3.4.22.1) по расщеплению 0,065 М раствора этилового эфира гидрохлорида N-бензоил L-аргинина в 0,1 М ацетатном буфере (pH 5,0) [Matsuda, Misaka, 1974] и аспартатной протеиназы лизосом – катепсина D (КФ 3.4.23.5) по гидролизу 1%-го бычьего гемоглобина в 0,1 М ацетатном буфере (pH 3,6) согласно модифицированному

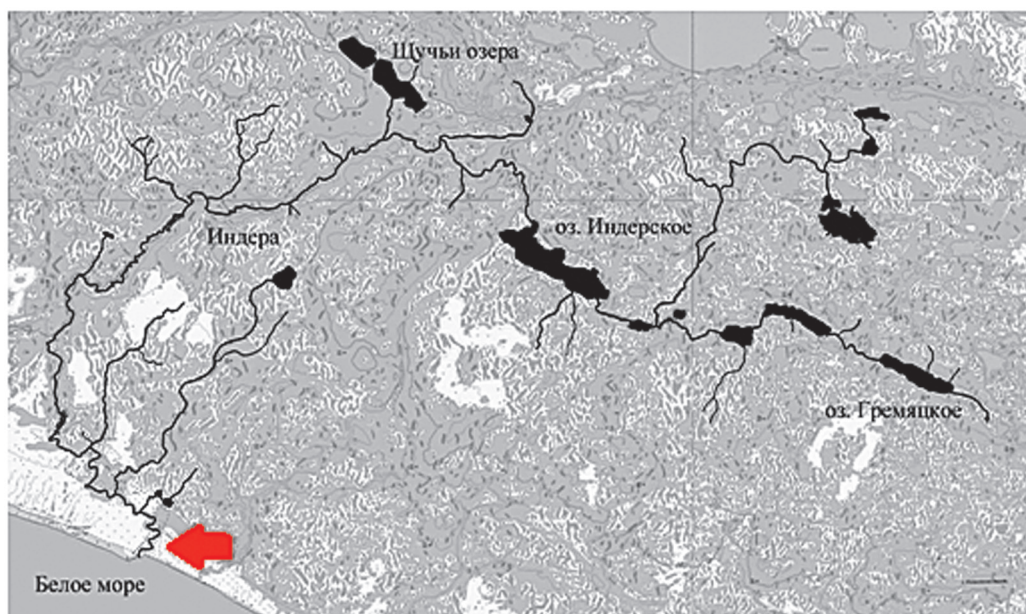


Рис. 1. Спутниковая фотография р. Индера (из Google Earth)

методу Ансона [Barrett, Heath, 1977]. Активность протеиназ (ед. акт.) выражали в единицах изменения оптического поглощения при E_{525} и E_{280} соответственно на 1 мг белка за 1 ч инкубации (37 °С).

Активность лизосомальных нуклеаз – РНКазы (КФ 3.1.4.23) и ДНКазы (КФ 3.1.4.6) – определяли по методам А. П. Левицкого и др. [1973] и А. А. Покровского с соавт. [Покровский, Арчаков, 1968]. Субстратами служили 0,1%-е растворы РНК и ДНК на 0,2 М растворе ацетатного буфера (рН 5,2 и 5,0 соответственно). Принцип методов основан на способности нуклеаз расщеплять соответствующие нуклеиновые кислоты на низкомолекулярные фрагменты, количество которых определяли спектрофотометрически при 260 нм после осаждения нерасщепленных нуклеиновых кислот и их крупных фрагментов 0,5 М раствором хлорной кислоты и 0,25%-м раствором уранилацетата в 0,5 М растворе хлорной кислоты (для ДНК и РНК соответственно). Активность ферментов выражали в условных единицах ΔD_{260} в расчете на 1 мг белка за единицу времени.

Полученные данные обработаны статистически с помощью Microsoft Office Excel 2007. Результаты представлены в виде средних и их ошибок ($M \pm m$). Достоверность различий оценивали по непараметрическому критерию U Вилкоксона – Манна – Уитни при уровне значимости $p \leq 0,05$ [Гублер, Генкин, 1969].

Результаты и обсуждение

Существенных различий в содержании белка в скелетных мышцах молоди лосося разных

возрастов не было обнаружено, в то время как в печени содержание белка было сравнительно высоким у пестряток возраста до 2+, а затем оно снижалось у смолтов возраста 2+ к уровню смолтов возраста 3+ (рис. 2).

Результаты исследования динамики активности лизосомальных гидролаз (протеиназ и нуклеаз) у молоди лосося различных возрастов представлены в таблице 2.

У цельных личинок (сеголеток 0+) активность лизосомальных протеиназ сравнительно высока. Обращает на себя внимание высокая активность катепсина В в мышцах смолтов возраста 3+ (вдвое выше, чем у сеголеток, и почти в четыре раза выше, чем в мышцах смолтов возраста 2+). Активность катепсина D в печени всех исследуемых возрастов молоди лосося относительно низка по сравнению со значениями, полученными для сеголеток. В мышцах разновозрастной молоди лосося активность катепсина D имеет очень низкие значения или вовсе не обнаружена. Активность катепсина В имеет максимальные значения в органах смолтов возраста 3+, готовых к скату в море. Данные по динамике активности лизосомальных нуклеаз свидетельствуют о наличии зависимости между уровнем активности изученных гидролаз и возрастом молоди рыб (табл. 2). Так, активность лизосомальной РНКазы в печени молоди лосося линейно возрастала при переходе от пестряток (1+, 2+) к смолтам (2+, 3+). В мышцах пестряток возраста 2+ активность РНКазы немного снижалась, а у смолтов с возрастом наблюдалось увеличение активности РНКазы. Аналогичные зависимости отмечались и для кислой ДНКазы. При этом

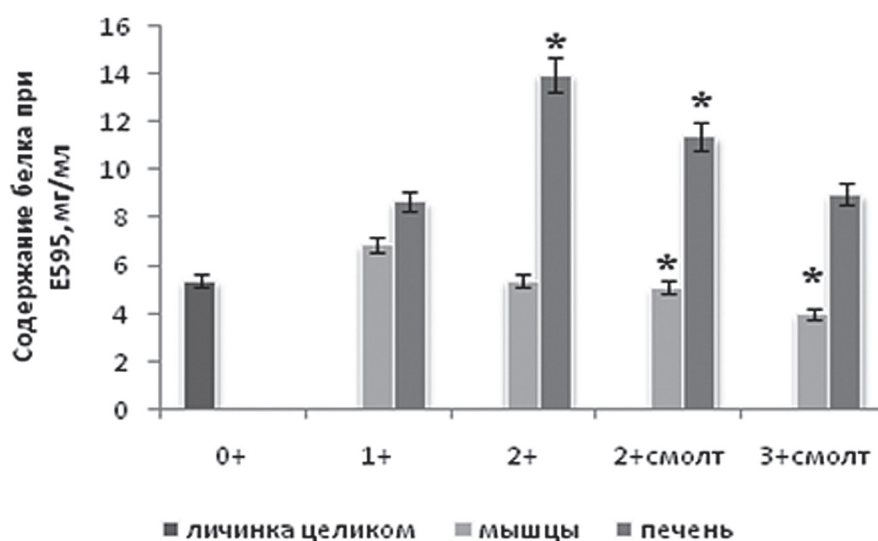


Рис. 2. Содержание белка у молоди 0+, 1+ и 2+ (пестрятки), 2+ и 3+ (смолты) лосося из р. Индера. *Статистически достоверные отличия ($p \leq 0,05$) по сравнению с возрастной группой 1+

Таблица 2. Активность лизосомальных гидролаз (катепсинов и нуклеаз) у молоди лосося разных возрастов из р. Индера ($n = 5$)

Орган	Возраст	Активность ферментов, ед. акт.			
		Катепсин В	Катепсин D	Кислая РНКазы	Кислая ДНКазы
Личинка целиком	0+	1,00 ± 0,10	0,55 ± 0,09	1,47 ± 0,05	0,92 ± 0,11
печень	1+	0,70 ± 0,00	0,29 ± 0,00	1,01 ± 0,00	0,48 ± 0,00
	2+	0,30 ± 0,10*	0,11 ± 0,03*	1,28 ± 0,09*	0,62 ± 0,06*
	2+ смолт	0,50 ± 0,02	0,24 ± 0,04	1,86 ± 0,10*	0,88 ± 0,05*
	3+ смолт	0,80 ± 0,02	0,20 ± 0,06*	1,87 ± 0,09*	1,12 ± 0,02*
мышцы	1+	0,90 ± 0,06	0,01 ± 0,01	1,17 ± 0,06	0,82 ± 0,08
	2+	0,80 ± 0,06*	0,00 ± 0,00	0,96 ± 0,04*	0,74 ± 0,05*
	2+ смолт	0,50 ± 0,08	0,03 ± 0,00	1,44 ± 0,13*	1,14 ± 0,07*
	3+ смолт	2,10 ± 0,07*	0,004 ± 0,00	1,47 ± 0,04*	1,29 ± 0,15*

Примечание. *Результаты достоверны при $p \leq 0,05$.

абсолютные значения РНКазной активности в печени были в среднем в два раза выше, чем ДНКазной, а в мышцах активность РНКазы была на 43, 25 и 13 % выше, чем ДНКазы, у молоди возраста 1+, 2+ (пестрятки и смолты) и 3+ соответственно.

В настоящей работе, как и в ранее проведенных исследованиях на молоди лосося из р. Варзуга [Вдовиченко и др., 2015; Немова и др., 2015] и на молоди кумжи из р. Ольховка [Немова и др., 2016], показано, что наиболее интенсивный рост молоди лососевых рыб происходит в первый год жизни. Так, масса тела сеголеток лосося из р. Индера составляла менее одного грамма (0,16 г), а пестряток возраста 1+ – 1,5 г. В дальнейшем также отмечен рост массы тела, хотя и менее интенсивный. Аналогичная динамика прослеживается и для длины тела молоди лосося – увеличение ее от 2,8 см в возрасте 0+ до 6,1 см в возрасте 1+. Ранее было показано, что наибольшая изменчивость линейного и весового роста балтийского лосося приходится на первый год речной жизни и первый год выхода в море [Никольский, 1980]. Столь интенсивный процесс роста у рыб, в ходе которого происходит преобразование пищевых веществ и энергии, имеет некоторые особенности, связанные с его недетерминированностью, в основе которой лежит преобладание синтетических процессов над катаболическими на протяжении всего жизненного цикла [Hochachka, Somero, 2002; Bureau et al., 2006; Lysenko et al., 2015]. Можно полагать, что в метаболические превращения белков и нуклеиновых кислот в процессе роста и развития молоди лосося наряду с другими ферментами вовлечены и лизосомальные гидролазы, активные при кислых значениях pH. Известно, что в процессах биосинтеза белка важную роль играют нуклеиновые кислоты, в метаболизме которых участвуют и лизосомальные нуклеазы,

осуществляющие гидролитическое расщепление межнуклеотидных фосфодиэфирных связей в их молекулах [Покровский, Тутельян, 1976; Высоцкая, Немова, 2008; Pizzo et al., 2008]. Продукты расщепления используются для построения новых нуклеиновых кислот, участвующих в биосинтезе белковых веществ, необходимых на новом этапе развития. Для класса костистых (*Teleostei*) рыб, в том числе лососевых (*Salmonidae*), интенсивность белковой деградации служит регуляторным фактором недетерминированного роста рыб, т. е. синтезированные белки используются не только для построения структур и тканей молоди, но и выполняют каталитическую и регуляторную функцию в организме. Обнаруженный в исследовании высокий уровень активности изученных лизосомальных ферментов рыб у сеголеток (0+) лосося, скорее всего, связан с обеспечением «строительными блоками» биосинтетических процессов накопления белка, необходимого для последующих структурных преобразований растущей молоди в период, когда завершается эндогенное питание и начинается переход на смешанное питание (при повышении температуры воды выше 11 °С, июнь, 500 градусо-дней). Для дальнейшего развития молоди лосося, по-видимому, очень важен интенсивный протеолиз именно в самом начале постэмбрионального развития, после выклева личинок из оболочек, когда молодь должна адаптироваться к изменению среды, и те особи, которые расселяются в биотопы с так называемыми «благоприятными» для роста и развития условиями [Nemova et al., 2015]. В процессе дальнейшего развития молоди лосося (2+ пестрятки, 2+, 3+ смолты) на фоне повышения активности кислых нуклеаз активность катепсинов несколько снижается в печени, а в скелетных мышцах практически не обнаруживается. Показано, что рост

и увеличение размеров и массы молоди лососевых связаны обратной зависимостью с активностью катепсина D в их мышцах. Снижение активности основного фермента лизосом, с которым связывают полную деградацию белковой молекулы до аминокислот и пептидов [Дин, 1980] при смолтификации, согласуется с данными литературы о том, что в мышцах смолтов атлантического лосося *S. salar* наблюдается активизация синтетических процессов и супрессия белкового катаболизма [Seear et al., 2010], направленные на ускорение прироста массы особей и накопление резервных веществ, включая структурные белки скелетных мышц. Обнаруженная сравнительно высокая активность катепсина B (протеиназы лизосом с регуляторной функцией) и нуклеаз у молоди лосося более старших возрастов (3+ смолты) отражает роль этих ферментов в процессах подготовки молоди к смолтификации и переходу в морскую среду. Смолты приобретают способность к осморегуляции в гипертонической среде, происходит увеличение Na^+ , K^+ -АТФазной активности, усиливается азотистый и жировой обмен [Шустов, 1983; McCormick et al., 1998]. Биохимические, морфологические и поведенческие изменения у молоди лосося в период смолтификации связаны с их подготовкой к новым условиям обитания.

Результаты исследований активности лизосомальных протеиназ и нуклеаз позволяют сделать вывод о том, что исследованные ферменты функционируют в процессах роста и развития молоди лосося взаимосвязанно, хотя и разнонаправленно, в зависимости от соотношения активизации/супрессии синтетических и катаболических процессов. Катепсины и нуклеазы катализируют деградацию выполнивших свои функции биополимеров, тем самым обеспечивая организм компонентами, участвующими в биосинтезе необходимых на начальном этапе развития белковых веществ. Синтезированные белки используются не только для построения структур и тканей молоди рыб, но и выполняют каталитическую и регуляторную функции в организме. Полученные данные позволяют предположить, что условия обитания в реке Индера являются достаточно благоприятными и способствуют ускоренному темпу роста молоди атлантического лосося. Динамика активности лизосомальных протеиназ и нуклеаз может рассматриваться как дополнительный биохимический критерий оценки состояния молоди атлантического лосося после выхода личинок из нерестовых гнезд и последующего их роста, развития, формирования смолтов, способных к последующей миграции для нагула в море.

Вылов и исследования лососевых видов рыб (атлантический лосось) проведены в соответствии с разрешением Федерального агентства по рыболовству Баренцево-Беломорского территориального управления № 51 2015 03 0119.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 14-24-00102 «Лососевые рыбы Северо-Запада России: эколого-биохимические механизмы раннего развития».

Литература

- Аминева В. А., Яржомбек А. А. Физиология рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. 200 с.
- Вдовиченко Е. А., Высоцкая Р. У., Ефремов Д. А., Веселов А. Е. Активность лизосомальных нуклеаз у молоди лосося *Salmo salar* L. разных возрастных групп // Труды КарНЦ РАН. Сер. Экспериментальная биология. № 11. 2015. С. 92–98. doi: 10.17076/eb239
- Веселов А. Е., Калюжин С. М. Экология, поведение и распределение молоди атлантического лосося. Петрозаводск: Карелия, 2001. 160 с.
- Высоцкая Р. У., Немова Н. Н. Лизосомы и лизосомальные ферменты рыб. М.: Наука, 2008. 284 с.
- Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение критериев непараметрической статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследованиях. М.: Медицина, 1969. 29 с.
- Дин Р. Процессы распада в клетке. М.: Мир, 1980. 120 с.
- Казаков Р. В., Веселов А. Е. Атлантический лосось // Популяционный фонд атлантического лосося России. СПб.: Наука, 1998. С. 383–395.
- Левицкий А. П., Барабаш Р. Д., Коновец В. М. Сезонные особенности активности рибонуклеазы и α -амилазы слюны и слюнных желез у крыс линии Вистар // Биохимическая эволюция. Л.: Наука, 1973. С. 192–195.
- Немова Н. Н., Крупнова М. Ю., Ефремов Д. А., Веселов А. Е. Активность лизосомальных протеиназ (катепсинов B и D) в мышцах молоди (0+, 1+ 2+) атлантического лосося из р. Варзуга // Труды КарНЦ РАН. Сер. Экспериментальная биология. № 11. 2015. С. 85–91. doi: 10.17076/eb237
- Немова Н. Н., Крупнова М. Ю., Вдовиченко Е. А. и др. Активность лизосомальных гидролаз молоди кумжи (*Salmo trutta* L.) из приполярной реки Ольховка // Ученые записки ПетрГУ. Биологические науки. 2016. № 4 (157). С. 7–12.
- Нефедова З. А., Мурзина С. А., Веселов А. Е. и др. Разнокачественность липидных и жирнокислотных спектров у сеголеток атлантического лосося *Salmo salar* L., различающихся размерно-весовыми характеристиками // Сибирский экологический журнал. № 4. 2014. С. 639–645.
- Никольский Г. В. Структура вида и закономерности изменчивости рыб. М.: Пищ. пром., 1980. 184 с.
- Покровский А. А., Арчаков А. И. Методы разделения и ферментной идентификации субклеточных

фракций // Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1968. С. 5–59.

Покровский А. А., Крыстев Л. П. Печень, лизосомы и питание. София, 1977. 208 с.

Покровский А. А., Тутьельян В. А. Лизосомы. М.: Наука, 1976. 351 с.

Спирин А. С. Биосинтез белков, мир РНК и происхождение жизни // Вестник Российской академии наук. 2001. Т. 71, № 4. С. 320–328.

Шустов Ю. А. Экология молоди атлантического лосося. Петрозаводск: Карелия, 1983. 152 с.

Barrett A. J., Heath M. Lysosomal enzymes // In: Dingle J. T. (ed.). Lysosomes. A laboratory handbook. Amsterdam, 1977. P. 19–27.

Bashan A., Yonath A. Correlating ribosome function with high-resolution structures // Trends in Microbiology. 2008. Vol. 16, no. 7. P. 326–335. doi: 10.1016/j.tim.2008.05.001

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analit. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

Bureau D., Hua K., Cho C. Y. Effect of feeding level on growth and nutrient deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) growing from 150 to 600 g // Aquac. Res. 2006. Vol. 37. P. 1090–1098.

Hoilhan D. E., Carter C. G., McCarthy L. D. Protein synthesis in fish // In Biochemistry and Molecular Biology of fishes (eds. Hochachka P., Mommsem T.) Amsterdam: Elsevier. Chapter 8. 1995. Vol. 4. P. 62–75.

References

Amineva V. A., Yarzhombek A. A. Fiziologiya ryb [Physiology of fishes]. Moscow: Legkaya i pishhevaya promyshlennost', 1984. 200 p.

Vdovichenko E. A., Vysotskaya R. U., Efremov D. A., Veselov A. E. Aktivnost' lizosomalnykh nukleaz u molodi lososya *Salmo salar* L. raznykh vozrastnykh grupp [The activity of lysosomal nucleases in different age groups of juvenile *Salmo salar* L. salmon]. *Trudy KarNTs RAN [Trans. of KarRC of RAS]*. 2015. No. 11. P. 92–98. doi: 10.17076/eb239

Veselov A. E., Kalyuzhin S. M. Ekologiya, povedenie i raspredelenie molodi atlanticheskogo lososya [Ecology, behavior and distribution of juvenile Atlantic salmon]. Petrozavodsk: Kareliya, 2001. 160 p.

Vysotskaya R. U., Nemova N. N. Lizosomy i lizosomal'nye fermenty ryb [Fish lysosomes and lysosomal enzymes]. Moscow: Nauka, 2008. 284 p.

Gubler E. V., Genkin A. A. Primenenie kriteriev neparametricheskoy statistiki dlya otsenki razlichiy dvukh grupp nablyudeniy v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh [Application of nonparametric statistics criteria to assess the differences between two groups of observations in biomedical research]. Moscow: Meditsina, 1969. 29 p.

Din R. Protsessy raspada v kletke [Decay processes in cells]. Moscow: Mir, 1980. 120 p.

Kazakov R. V., Veselov A. E. Atlanticheskii losos [The Atlantic salmon]. Populyatsionnyy fond atlantiche-

Hochachka P. W., Somero G. N. Biochemical adaptation / mechanisms and process in physiological evolution, 2nd edition // Oxford University Press, New York. 2002. 466 p.

Lysenko L., Kantserova N. P., Krupnova M. Yu., Nemova N. N. Protein degradation systems in the control of salmonid fish growth // Protein Science. Special Issue: The 29th Annual Symposium of the Protein Society, Barcelona, Spain, July 22–25, 2015. Vol. 24, iss. S1. P. 262.

Matsuda K., Misaka E. Studies on cathepsins of rat liver lysosomes. I. Purification and multiple forms // J. Biochem. 1974. Vol. 76, no. 3. P. 639–649.

McCormick S. D., Hansen L. P., Quinn T. P., Saunders R. L. Movement, migration, and smolting of Atlantic salmon (*Salmo salar*) // Can. J. Fish. Aquat. Sci. Vol. 55, suppl. 1. 1998. P. 77–92. doi: 10.1139/d98-011

Nemova N. N., Pavlov D. S., Veselov A. E. et al. The activity of intracellular proteolytic enzymes in Atlantic salmon young-of-the-year from various habitats in the Varzuga River (White Sea basin). SEB. Animal main meetings. Prague, 2015. P. 10.

Pizzo E., Varcamonti M., Maro A. D. et al. Ribonucleases with angiogenic and bactericidal activities from the Atlantic salmon // FEBS Journal. 275. 2008. P. 1283–1295. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06289.x

Seear P., Carmichael S., Talbot R. et al. Differential gene expression during smoltification of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): a first large-scale microarray study. *Mar Biotechnol* (2010) 12:126–140.

Поступила в редакцию 20.07.2016

skogo lososya Rossii [Population's Fund of Atlantic Salmon in Russia]. St. Petersburg: Nauka, 1998. P. 383–395.

Levitskiy A. P., Barabash R. D., Konovets V. M. Sezonnaya osobennost' aktivnosti ribonukleazy i α -amilazy slyuny i slyunnykh zhelez u krysa linii Vistar [Seasonal characteristics of ribonuclease and α -amylase activity of saliva and salivary glands of Wistar rats]. *Biokhimičeskaya evolyutsiya [Biochemical Evolution]*. Leningrad: Nauka, 1973. P. 192–195.

Nemova N. N., Krupnova M. Yu., Efremov D. A., Veselov A. E. Aktivnost' lizosomal'nykh proteinaz (kathepsinov B i D) v myshtsakh molodi (0+, 1+, 2+) atlanticheskogo lososya iz r. Varzuga [The activity of lysosomal proteases (cathepsins B and D) in the muscles of juvenile (0+, 1+, 2+) Atlantic salmon from the Varzuga River]. *Trudy KarNTs RAN [Trans. of KarRC of RAS]*. 2015. No. 11. P. 85–91. doi: 10.17076/eb237

Nemova N. N., Krupnova M. Yu., Vdovichenko E. A., Efremov D. A., Veselov A. E. Aktivnost' lizosomalnykh gidrolaz u molodi kumzhi (*Salmo trutta* L.) iz pripolyarnoi reki Ol'khovka [The activity of lysosomal hydrolases in juvenile trout (*Salmo trutta* L.) from the subpolar Olkhovka River]. *Uch. Zap. PetrGU. Biologicheskie nauki [Proceedings of Petrozavodsk State University. Biological Sciences]*. No. 4 (157). 2016. P. 7–12.

Nefedova Z. A., Murzina S. A., Veselov A. E., Ripatti P. O., Nemova N. N. Raznokachestvennost' lipidnykh

i zhirnokislотноykh spektrov u segoletok atlanticheskogo lososya *Salmo salar* L., razlichayushchikhsya razmernovosovymi kharakteristikami [Heterogeneity of lipids and fatty acids of fingerlings of the Atlantic salmon *Salmo salar* L. different in weight and size]. *Sibirskii ekologicheskii zhurnal [Siberian Journal of Ecology]*. No. 4. 2014. P. 639–645.

Nikolskij G. V. Struktura vida i zakonomernosti izmenchivosti ryb [Species structure and regularities of fish variability]. Moscow: Pishhevaya prom., 1980. 184 p.

Pokrovskiy A. A., Archakov A. I. Metody razdeleniya I fermentnoy identifikatsii subkлетochnykh fraktsiy [Methods of separation and enzymatic identification of subcellular fractions]. *Sovremennye metody v biokhimi [Modern Methods in Biochemistry]*. Moscow: Meditsina, 1968. P. 5–59.

Pokrovskiy A. A., Krystev L. P. Pechen, lizosomy i pitanie [Liver, lysosomes and nutrition]. Sofiya, 1977. 208 p.

Pokrovskiy A. A., Tutel'yan V. A. Lizosomy [Lysosomes]. Moscow: Nauka, 1976. 351 p.

Spirin A. S. Biosintez belkov, mir RNK i proiskhozhdenie zhizni [Protein biosynthesis, the RNA world and the origin of life]. *Vest. RAN [Herald of the Russian Academy of Sciences]*. 2001. Vol. 71, no. 4. P. 320–328.

Shustov Yu. A. Ekologiya molodi atlanticheskogo lososya [Ecology of juvenile Atlantic salmon]. Petrozavodsk: Kareliya, 1983. 152 p.

Barrett A. J., Heath M. Lysosomal enzymes. In: Dingle J. T. (ed.). *Lysosomes. A laboratory handbook*, Amsterdam. 1977. P. 19–27.

Bashan A., Yonath A. Correlating ribosome function with high-resolution structures. *Trends in Microbiology*. Vol. 16, no. 7. 2008. P. 326–335. doi: 10.1016/j.tim.2008.05.001

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analit. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

Bureau D., Hua K., Cho C. Y. Effect of feeding level on growth and nutrient deposition in rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) growing from 150 to 600 g. *Aquac. Res.* 2006. Vol. 37. P. 1090–1098.

Hoiilhan D. E., Carter C. G., McCarthy L. D. Protein synthesis in fish. In *Biochemistry and Molecular Biology of fishes* (eds. P. Hochachka, T. Mommsem). Amsterdam: Elsevier. Chapter 8. 1995. Vol. 4. P. 62–75.

Hochachka P. W., Somero G. N. Biochemical adaptation mechanisms and process in physiological evolution, 2nd edition. Oxford University Press, New York. 2002. 466 p.

Lysenko L., Kantserova N. P., Krupnova M. Yu., Nemova N. N. Protein degradation systems in the control of salmonid fish growth. *Protein Science*. Special Issue: The 29th Annual Symposium of the Protein Society, Barcelona, Spain, July 22–25, 2015. Vol. 24, iss. S1. P. 262.

Matsuda K., Misaka E. Studies on cathepsins of rat liver lysosomes. I. Purification and multiple forms. *J. Biochem.* 1974. Vol. 76, no. 3. P. 639–649.

McCormick S. D., Hansen L. P., Quinn T. P., Saunders R. L. Movement, migration, and smolting of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* Vol. 55. Suppl. 1. 1998. P. 77–92. doi: 10.1139/d98-011

Nemova N. N., Pavlov D. S., Veselov A. E., Kaivarainen E. I., Krupnova M. Yu. The activity of intracellular proteolytic enzymes in Atlantic salmon young-of-the-year from various habitats in the Varzuga River (White Sea basin). SEB. Animal main meetings. Prague, 2015. P. 10.

Pizzo E., Varcamonti M., Maro A. D., Zanfardino A., Giancola C., D'Alessio G. Ribonucleases with angiogenic and bactericidal activities from the Atlantic salmon. *FEBS Journal*. 275. 2008. P. 1283–1295. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06289.x

Seear P., Carmichael S., Talbot R., Taggart J., Bron J., Sweeney G. Differential gene expression during smoltification of atlantic salmon (*Salmo salar* L.): a first large-scale microarray study. *Mar Biotechnol* (2010) 12:126–140.

Received July 20, 2016

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Крупнова Марина Юрьевна

старший научный сотрудник лаб. экологической биохимии, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: mukrupnova@rambler.ru
тел.: (8142) 571879

Вдовиченко Елизавета Андреевна

младший научный сотрудник
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: elizaveta.vdovichenko@gmail.com
тел.: (8142) 571879

CONTRIBUTORS:

Krupnova, Marina

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

Vdovichenko, Elizaveta

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

Высоцкая Римма Ульяновна

главный научный сотрудник, д. б. н., проф.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: rimma@bio.karelia.ru
тел.: (8142) 571879

Ефремов Денис Александрович

научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: denisefremov@list.ru
тел.: (8142) 571679

Веселов Алексей Елпидифорович

главный научный сотрудник, д. б. н., проф.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: veselov@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 571679

Немова Нина Николаевна

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

Vysotskaya, Rimma

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

Efremov, Denis

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: denisefremov@list.ru
tel.: (8142) 571679

Veselov, Aleksey

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: veselov@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 571679

Nemova, Nina

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

УДК: 576.89:574.24

ОСОБЕННОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ГЛУТАТИОН S-ТРАНСФЕРАЗЫ И УРОВЕНЬ ВОССТАНОВЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА У ЩУКИ *ESOX LUCIUS L.* И ЕЕ ОБЛИГАТНОГО ПАЗАРИТА ЦЕСТОДЫ *TRIAENOPHORUS NODULOSUS*

А. А. Кочнева¹, Е. В. Борвинская^{2,3}, И. В. Суховская²,
Е. П. Иешко², Л. П. Смирнов²

¹ Петрозаводский государственный университет

² Институт биологии Карельского научного центра РАН

³ НИИ биологии, Иркутский государственный университет

Гельминты – это группа беспозвоночных животных, обитающих во внутренних органах широкого круга хозяев. Гельминты эволюционно приспособлены к обитанию в относительно стабильной среде, сформированной за счет способности хозяина поддерживать гомеостаз в изменяющихся условиях окружающей среды и при загрязнении мест обитания. В связи с этим представляет интерес оценка способности паразитов самостоятельно приспосабливаться к последствиям воздействия негативных факторов внешней среды. Выдвигается гипотеза, предполагающая, что в условиях трансформации среды обитания защитные механизмы хозяина проявляются более выражено, чем у паразита, обитающего в его теле. Для изучения степени активации защитных механизмов на уровне биохимической системы биотрансформации ксенобиотиков и антиоксидантной защиты была исследована активность фермента глутатион S-трансферазы (GST) и концентрация восстановленного глутатиона (GSH) у щуки *Esox lucius L.*, обитающей в водоеме, загрязненном отходами Костомукшского горнорудного комбината (северная Карелия), и цестоды *Triaenophorus nodulosus* – ее облигатного паразита. В качестве условного контроля использовали особей из чистого водоема озеро Каменное. У рыб-хозяев, обитающих в условиях трансформированной среды, наблюдается повышение уровня восстановленного глутатиона во всех исследованных органах, в то время как активность фермента глутатион S-трансферазы была повышена только в почках и мышцах рыб. У цестод *T. nodulosus* из техногенного водоема обнаружено снижение активности GST и отсутствие реакции со стороны GSH по сравнению с гельминтами из условно чистого водоема. Полученные результаты свидетельствуют о том, что среда второго порядка влияет на кишечного паразита опосредованно, через вариабельность физиолого-биохимического статуса хозяина, как результат сопряженной эволюции системы «паразит – хозяин».

Ключевые слова: паразитизм; адаптации; биотрансформация ксенобиотиков; антиоксиданты; токсикология.

A. A. Kochneva, E. V. Borvinskaya, I. V. Sukhovskaya, E. P. Ieshko, L. P. Smirnov. ENZYMATIC ACTIVITY OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE AND THE LEVEL OF REDUCED GLUTATHIONE IN PIKE *ESOX LUCIUS* L. AND ITS OBLIGATE PARASITE CESTODE *TRIAENOPHORUS NODULOSUS*

Helminthes are a group of invertebrates living in the internal organs of a wide range of hosts. Helminthes are evolutionarily adapted to a relatively stable environment, formed by the host's ability to maintain homeostasis under variable environmental conditions and pollution. Therefore, it is interesting to evaluate the ability of the parasite to independently adapt to adverse environmental factors. In this paper, we hypothesized that the host's defense system response to a challenging environment is more pronounced than that of the parasite living inside the host. To study the activation of the protective mechanisms involving biotransformation of xenobiotics and antioxidant defense, the activity of the enzyme glutathione S-transferase (GST) and the concentration of reduced glutathione (GSH) were measured in an obligate parasite *Triaenophorus nodulosus* and its host – pike *Esox lucius* L. living in a pond contaminated by wastes from the Kostomuksha iron mine and ore dressing mill (Northern Karelia). Biological samples obtained from intact Lake Kamennoe were used for reference. The fish collected from the disturbed environment had an elevated level of reduced glutathione in all organs, whereas the activity of glutathione S-transferase increased only in kidneys and muscles. In *T. nodulosus* from the contaminated lake a decline of GST activity and the absence of response from GSH were observed. The results show that the external environment affects the intestinal parasite indirectly, via the variations of the physiological and biochemical status of the host, as a result of the host-parasite co-evolution.

Key words: parasitism; adaptation; biotransformation of xenobiotics; antioxidants; toxicology.

Введение

Гельминты – это группа беспозвоночных животных, эволюционно приспособленных к существованию во внутренних органах широкого круга хозяев. Особенностью взаимодействия паразита с окружающей средой является то, что для него характерно одновременное обитание в двух средах – среде I порядка (организм хозяина), оказывающей непосредственное воздействие на паразита, и среде II порядка (среда, окружающая хозяина).

Паразиты эволюционно приспособлены к обитанию в среде, сформированной под действием базовых и неспецифических защитных адаптаций хозяина. Это означает известную стабильность условий обитания для паразита, обеспеченную гомеостазом хозяина, который имеет широкий набор молекулярных и биохимических механизмов для регуляции основных показателей жизнедеятельности в изменяющихся условиях окружающей среды и при загрязнении мест обитания. В этой связи, рассматривая отношения «паразит – хозяин» на биохимическом уровне, мы можем предпринять попытку оценить справедливость утверждения о возможном возложении паразитом на своего хозяина отношений со средой второго порядка. В данной работе нами выдвигается гипотеза, которая предполагает, что в условиях

трансформации среды обитания защитные механизмы у хозяина проявляются более выражено, чем у паразита, обитающего в его теле.

Известно, что нормальное протекание процессов жизнедеятельности и способность приспосабливаться к изменениям окружающей среды как у гельминтов, так и у их хозяев определяется в том числе специализированными биохимическими механизмами защиты. К таким механизмам относятся система биотрансформации ксенобиотиков (СБК) и антиоксидантной защиты (АОЗ), которые находятся в тесном взаимодействии. Биотрансформация ксенобиотиков – это каскад биохимических реакций, направленных на обезвреживание и выведение широкого круга токсинов, тогда как система антиоксидантной защиты обеспечивает обезвреживание молекул, активированных кислородными радикалами, образующимися в процессе дыхания или иммунного ответа хозяина. Фермент глутатион S-трансфераза и пептид восстановленный глутатион – необходимые компоненты систем АОЗ и СБК и могут быть рассмотрены как биомаркеры, характеризующие способность организмов преодолевать последствия стресса.

В задачу настоящей работы входило сравнить концентрацию восстановленного глутатиона и активность фермента глутатион S-трансферазы в тканях цестоды *Triaenophorus*

Таблица 1. Физико-химические характеристики воды в оз. Костомукшском и оз. Каменном

Показатель	оз. Каменное	оз. Костомукшское
Минерализация, мг/л	9,5 ^{1,2}	623 ^{1,2}
pH, ед.	5,97–6,49 ^{1,2}	8,5 ^{1,2}
K ⁺ , мг/л	0,6 ^{2,3}	134 ^{2,3}
Na ⁺ , мг/л	1 ^{2,3}	20 ^{2,3}
Ca ²⁺ , мг/л	4 ^{2,3}	37 ^{2,3}
Mg ²⁺ , мг/л	0,6 ^{2,3}	19 ^{2,3}
Cl ⁻ , мг/л	0,6 ^{1,2}	7 ^{1,2}
SO ₄ ²⁻ , мг/л	1,6 ^{1,2}	298 ^{1,2}
HCO ₃ ⁻ , мг/л	4,3 ^{1,2}	128 ^{1,2}
Fe, мкг/л	189 ³	103 ³
Li, мкг/л	0,6 ³	83 ³
Zn, мкг/л	11 ³	1,6 ³
Pb, мкг/л	0,3 ³	0,04 ³
Ni, мкг/л	0,65 ³	2,6 ³
Cu, мкг/л	1,9 ³	2,1 ³
Mn, мкг/л	12 ³	13 ³
Cr, мкг/л	19 ³	0,8 ³
Cd, мкг/л	0,02 ³	0,06 ³

Примечание. Данные по: ¹Лозовик и др., 2001; ²Лозовик, Кулакова, 2012; ³наши данные.

nodulosus и ее окончательного хозяина – щуки из озера с низким уровнем антропогенной нагрузки и водоема, подвергшегося техногенной трансформации.

Материалы и методы

Сбор материала осуществлялся в 2013–2014 гг. на двух водоемах северной Карелии. Оз. Каменное (64°28' с. ш., 30°13' в. д.) – это олиготрофный водоем, расположенный в природоохранной зоне Костомукшского государственного заповедника (условный контроль). Озеро Костомукшское (64°41' с. ш., 30°49' в. д.) – верхний водоем системы р. Кентти, преобразованный в технологический резервуар (хвостохранилище), используемый для сброса промывных вод (хвостов обогащения) Костомукшского горно-обогатительного комбината. За тридцать лет работы комбината произошла полная техногенная трансформация водоема, в первую очередь изменился минеральный состав и повысилось содержание тяжелых металлов (табл. 1).

В 2013 году собраны образцы тканей щук в озере Каменном (6 самок и 5 самцов) и озере Костомукшском (9 самок и 2 самца). Сразу после вылова рыба была измерена и взвешена, органы (жабры, мышцы, печень, почки) извлечены и заморожены в жидком азоте. Размер рыб варьировал в озере Каменном от 41 до 54 см, масса от 600 до 1500 г. В озере Костомукшском длина рыб составляла 34–53

сантиметра, вес от 300 до 1300 г. Возраст пойманных рыб, согласно подсчету годовых колец на чешуе, в озере Каменном составил 6–8 лет (в среднем 6,4), в озере Костомукшском 3–9 лет (в среднем 6,1).

В 2014 году собраны образцы цестод *Triaenophorus nodulosus* у щук из исследуемых озер. Пойманных щук вскрывали, из кишечника извлекали паразитов и отмывали от частичек химуса в физиологическом растворе, затем замораживали в жидком азоте и хранили до анализа при –80 °С. Для биохимического анализа *T. nodulosus* формировали суммарные пробы из 5–10 особей цестод до достижения минимальной навески образца 50–100 мг.

Замороженные биологические образцы гомогенизировали с помощью гомогенизатора Поттера – Эльвейэма в 50 мМ буферном растворе трис-HCl, pH 7,5. Гомогенат центрифугировали при 110 000 г в течение часа при 4 °С. Полученный супернатант использовали для анализа.

Активность GST в супернатанте определяли спектрофотометрически с использованием субстрата 1-хлор-2,4-динитробензола в соответствии с общепринятой методикой [Nabig et al., 1974]. Относительную активность выражали в μM субстрата, распавшегося за 1 мин, в пересчете на мг растворимого белка в ткани.

Для определения GSH растворимые белки гомогената осаждали с помощью 5% трихлоруксусной кислоты. В полученном супернатанте концентрацию восстановленного глутатиона

Таблица 2. Содержание восстановленного глутатиона у *T. nodulosus* и в тканях щуки (мкг/мг белка)

Объект исследования	оз. Каменное	оз. Костомукшское
Половозрелые особи <i>T. nodulosus</i>	4,00 ± 0,93	5,60 ± 0,41
Жабры щуки	0,17 ± 0,03	0,26 ± 0,05*
Почки щуки	0,27 ± 0,02	0,36 ± 0,18*
Печень щуки	0,24 ± 0,28	0,33 ± 0,41*
Мышцы щуки	0,90 ± 0,10	1,09 ± 0,12*

Примечание. Здесь и далее данные представлены в виде медианы ± половина межквартильного размаха; *отличия между контрольным и опытным вариантами статистически значимы ($p < 0,05$).

определяли флуориметрически [Cohn, Lyle, 1966; Hissin, Hilf, 1976], используя в качестве оптически активного соединения ортофталевый альдегид. Относительную концентрацию выражали в мкг GSH, отнесенного к содержанию растворимого белка в ткани.

Растворимый белок определяли спектрофотометрически по поглощению при длине волны 205–215 нм [Козлов, Слепышева, 2005; Noble, Bailey, 2009; Суховская и др., 2010].

Математическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ Past 3.x. Достоверность различий оценивали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона – Манна – Уитни, многофакторного дисперсионного анализа (MANOVA) и коэффициента корреляции Спирмена. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

При выполнении исследований использовалась приборно-аналитическая база Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН.

Результаты и обсуждение

Использование озера Костомукшского в качестве резервуара для хранения хвостов обогащения привело к кардинальному изменению его экосистемы, включая значительную редукцию числа видов, а также замену одних доминирующих видов на другие [Kalinkina et al., 2003; Ильмаст и др., 2013]. Ведущий фактор негативного воздействия вод хвостохранилища на биоту озера на данный момент не определен. Ранее было показано, что содержание калия в воде в концентрациях, регистрируемых в хвостохранилище, является токсичным для гидробионтов, в особенности в сочетании с избытком сульфатов и карбонатов [Trama, 1954; Fischer et al., 1991; Mount et al., 1997]. Также было показано, что в органах рыб из озера Костомукшского происходит накопление тяжелых металлов [Такшеев, 2004, 2005]. Хроническое воздействие совокупности факторов, действующих в техногенном водоеме, привело к изменениям, последствия которых уже заметны на популяционном уровне.

Цестода *T. nodulosus* является одним из многочисленных представителей паразитофауны, популяция которых сохранилась в озере, более того, экстенсивность и интенсивность заражения щуки этим паразитом значительно выше, чем в чистых озерах региона [Иешко и др., 2012]. В настоящем исследовании показано, что у цестод *T. nodulosus* из щук, пойманных в контрольном водоеме, уровень восстановленного глутатиона в среднем был в 4–22 раза выше, чем в исследованных тканях хозяев (табл. 2), у гельминтов из щук хвостохранилища эта разница была еще выше (5–24 раза). В свою очередь, среднее значение активности фермента GST в тканях червя сравнимо по уровню с активностью в метаболически активных органах хозяина (почки, жабры) (табл. 3). В доступной нам литературе отсутствует какая-либо информация о содержании GSH у гельминтов, однако высокий уровень данного пептида поднимает вопрос о значительной роли тиолсодержащих соединений в поддержании гомеостаза у паразитов. Известно, что глутатион в основном участвует в регуляции окислительно-восстановительного баланса клеток, препятствуя окислению белков и других молекул. Полученные данные косвенно указывают на то, что гельминт обладает арсеналом средств защиты от стресса, вызванного в том числе действием свободных радикалов. Данные механизмы, вероятно, задействованы в защите паразита от агрессивной среды, окружающей его в кишечнике, но также могут быть использованы в процессе адаптации к опосредованному действию факторов среды II порядка [Brophy, Barrett, 1990; Geerts, Gryseels, 2000].

При сравнении особей щук из озер Костомукшское и Каменное были обнаружены выраженные различия: в 2013 году у рыб из хвостохранилища уровень GSH был статистически достоверно выше, чем у рыб из контрольного водоема (табл. 2). Увеличение доли GSH является адаптивным ответом на изменение условий среды обитания. Например, повышение уровня восстановленного глутатиона наблюдается у рыб, обитающих в закисленных водоемах с пониженным содержанием кислорода,

Таблица 3. Активность GST у цестоды *T. nodulosus* и в тканях щуки (мкМ/мин/мг белка)

Объект исследования	оз. Каменное	оз. Костомукшское
Половозрелые особи <i>T. nodulosus</i>	169 ± 27	67 ± 9*
Жабры щуки	199 ± 41	195 ± 29
Печень щуки	900 ± 41	916 ± 159
Почки щуки	16 ± 5	40 ± 10*
Мышцы щуки	6 ± 1	9 ± 2*

а также при изменении температуры окружающей среды [Carvalho et al., 2012; Madeira et al., 2013; Machado et al., 2014]. У паразитов рыб из экспериментального водоема в 2014 году концентрация глутатиона в тканях также была выше, чем в контрольных образцах, однако наличие статистически значимой разницы не доказано. Исходя из допущения, что нетипичный гидрохимический состав вод хвостохранилища является ведущим фактором стресса для его обитателей, полученные результаты свидетельствуют в пользу предположения о том, что под действием техногенных вод в тканях хозяина в первую очередь и паразита в незначительной степени происходит активация защитных молекулярных механизмов. Однако, так как щуки и гельминты были отобраны в разные годы, различия ответной реакции также могут быть вызваны совокупностью иных факторов, сложившихся в период сбора.

Другая картина была получена при сравнении активности фермента глутатион S-трансферазы у *T. nodulosus* и в тканях щуки. И у паразита, и у хозяина была зафиксирована выраженная реакция на нетипичные параметры среды обитания в хвостохранилище Костомукшского ГОК.

Активность глутатион S-трансферазы в почках и мышцах щуки из хвостохранилища была выше, чем у рыб из контрольного водоема (табл. 3). Известно, что рост активности фермента указывает на усиление процессов выведения экзогенных токсикантов, а также эндогенных токсичных метаболитов, образующихся в результате активации окислительного стресса, превышающего физиологический уровень [Carvalho et al., 2012; Baysouy et al., 2012; Grim et al., 2013].

Помимо этого у рыб из контрольного водоема было выявлено влияние пола и размеров рыб на изучаемые биохимические показатели. Концентрация восстановленного глутатиона была выше в почках, мышцах и жабрах, а активность GST выше в почках и ниже в жабрах самок щук из озера Каменное. В озере Костомукшском влияние пола не было определено из-за недостаточной выборки самцов. Корреляционный анализ также показал, что среди рыб из

оз. Каменного активность GST выше в мышцах особей с большей массой ($r = 0,76$) и длиной ($r = 0,73$), тогда как в оз. Костомукшском такая взаимосвязь не выявляется.

У *T. nodulosus* в 2014 году была зафиксирована противоположная относительно щук в 2013 году реакция: у паразитов из хвостохранилища активность GST была в 2,5 раза ниже, чем в образцах из контрольного водоема. Изменение такого биохимического показателя, как активность GST, у цестод из хвостохранилища свидетельствует о том, что среда второго порядка способна оказывать влияние на метаболизм гельминтов. При этом возникает вопрос о способности *T. nodulosus* адаптироваться к изменениям среды II порядка не только как сочлена эволюционно древней системы «паразит – хозяин», но и самостоятельно. Так как активация защитных механизмов, в том числе физиолого-биохимических, подразумевает расходование энергии на синтез макромолекул и перестройку их микроокружения, можно предположить, что однонаправленность ответных реакций паразита и хозяина может свидетельствовать об их независимости, так как каждый из компонентов системы осуществляет энергозатраты на решение одной и той же проблемы. В свою очередь, разнонаправленный характер ответа, как в случае *T. nodulosus* и щук из хвостохранилища, вероятно, указывает на то, что в пределах одной системы один из членов берет на себя часть нагрузки, что позволяет «партнеру» экономить энергию. Хотя различия ответной реакции гельминтов и их хозяев могут быть связаны с межгодовой вариабельностью в большей степени, чем с влиянием вод хвостохранилища, однако сходные с полученными нами тенденции наблюдали в другом исследовании Р. У. Высоцкая с соавт. [2015]. Под влиянием отходов железорудного производства в печени щуки повышалась активность лизосомальных ферментов – кислой фосфатазы, нуклеаз, β-галактозидазы и снижалась активность β-глюкозидазы, катепсина D, а у *T. nodulosus* активность большинства ферментов изменялась в противоположном направлении. При снижении техногенной нагрузки по мере удаления от источника загрязнения для большинства

изученных показателей гельминта отмечалась тенденция к увеличению активности исследованных ферментов. Таким образом, полученные данные не позволяют говорить о наличии у *T. nodulosus* на уровне изученных биохимических показателей признаков полноценной реализации собственных механизмов приспособления к стрессу, вызванному повышением минерализации, дисбалансом ионов в окружающей среде, и непосредственному действию потенциально опасных веществ в составе вод хвостохранилища, таких как избыток ионов калия, сульфатов и повышенный фон тяжелых металлов.

Заключение

Проведенные исследования показали, что антропогенная трансформация водоема приводит к определенным изменениям в функционировании некоторых компонентов СБК и АОЗ сочленов системы «паразит – хозяин». В ответ на техногенную трансформацию среды у щуки увеличиваются значения обоих исследованных биохимических показателей, тогда как у цестод происходит снижение активности GST, а уровень GSH не изменяется. Эти результаты укладываются в представление о том, что среда второго порядка влияет на кишечного паразита опосредованно, через вариабельность физиолого-биохимического статуса хозяина, как результат сопряженной эволюции системы «паразит – хозяин». Для детального описания аспектов процесса совместного приспособления цестод и их хозяев к среде обитания требуются дальнейшие исследования с привлечением более широкого спектра биохимических показателей.

Работа выполнялась в рамках бюджетной темы № 51.3 «Биохимические и молекулярно-генетические механизмы развития приспособительных реакций у гидробионтов: экологические аспекты» (№ г. р. 01201358735, 2014–2016 гг.), Программы Президиума РАН № 21 «Биоразнообразии природных систем. Биологические ресурсы России: оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга», проект № 0221-2015-0003 «Динамика изменений ихтиофауны пресноводных экосистем Европейского Севера России при климатическом и антропогенном воздействии».

Литература

Высоцкая Р. У., Крупнова М. Ю., Иешко Е. П. и др. Эколого-биохимические аспекты паразито-хо-

зьянных отношений в трансформированных водоемах (на примере цестоды *Triaenophorus nodulosus* и ее хозяина щуки обыкновенной *Esox lucius*) // Известия РАН. Серия биологическая. 2015. № 3. С. 302–309. doi: 10.7868/S0002332915030145

Иешко Е. П., Аникиева Л. В., Лебедева Д. И., Ильмаст Н. В. Особенности популяционной биологии цестод рода *Triaenophorus* в естественных и техногенно трансформированных водоемах // Паразитология. 2012. Т. 46, № 6. С. 434–443.

Ильмаст Н. В., Стерлигова О. П., Кучко Я. А., Павловский С. А. Гидробиоценозы Костомукшского водохранилища (бассейн Белого моря) в условиях техногенного загрязнения // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013. Т. 15, № 3. С. 916–920.

Козлов А. В., Слепышева В. В. Определение белка в сыворотке крови // TerraMedica, прил. «Лабораторная диагностика». 2005. № 3 [Электронный ресурс]. URL: http://www.terramedica.spb.ru/ld3_2005/kozlov.htm (дата обращения: 21.05.2016).

Лозовик П. А., Кулакова Н. Е. Гидрохимический состав вод хвостохранилища и оз. Окунеево // Биота северных озер в условиях антропогенного воздействия / Под ред. Н. Н. Немовой, Н. В. Ильмаста, Е. П. Иешко, О. В. Мещеряковой. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2012. С. 128–136.

Лозовик П. А., Маркканен С. Л., Морозов А. К. и др. Поверхностные воды Калевальского района и территории Костомукши в условиях антропогенного воздействия. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2001. 168 с.

Суховская И. В., Борвинская Е. В., Смирнов Л. П., Немова Н. Н. Сравнительный анализ методов определения концентрации белка – спектрофотометрии в диапазоне 200–220 нм и по Бредфорд // Труды КарНЦ РАН. Сер. Экспериментальная биология. 2010. № 2. С. 68–71.

Такшеев С. А. Содержание некоторых тяжелых металлов в печени и мышцах рыб Костомукшского хвостохранилища // Экологические проблемы северных регионов и пути их решения: материалы межд. конф. Часть 1. Апатиты, 2004. С. 215–216.

Такшеев С. А. Состояние рыбной части сообщества Костомукшского хвостохранилища и его оценка биохимическими методами: дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 2005. 171 с.

Baysoy E., Atli G., Gürler C. Ö. et al. The effects of increased freshwater salinity in the bioavailability of metals (Cr, Pb) and effects on antioxidant systems of *Oreochromis niloticus* // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2012. Vol. 84, no. 249. P. 53. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.07.017

Brophy P. M., Barrett J. Glutathione transferases in helminths // Parasitology. 1990. Vol. 100. P. 345–349.

Carvalho C. dos S., Bernusso V. A., de Araújo H. S. S. et al. Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus* // Chemosphere. 2012. Vol. 89, no. 1. P. 60–69. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.04.013

Cohn V. H., Lyle J. A. Fluorometric assay for glutathione // Analytical biochemistry. 1966. Vol. 14. P. 434–440.

Fischer S. W., Stromberg P., Bruner K. A., Boulet L. D. Molluscicidal activity of potassium to the zebra

mussel, *Dreissena polymorpha*: toxicity and mode of action // Aquatic Toxicology. 1991. Vol. 20. P. 219–234.

Geerts S., Gryseels B. Drug resistance in human helminths: current situation and lessons from livestock // Clin. Microbiol. Rev. 2000. Vol. 13. P. 207–222.

Grim J. M., Simonik E. A., Semones M. C. et al. The glutathione-dependent system of antioxidant defense is not modulated by temperature acclimation in muscle tissues from striped bass, *Morone saxatilis* // Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol. 2013. Vol. 16, no. 2. P. 383–390. doi: 10.1016/j.cbpa.2012.11.018

Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // J. of Biol. Chem. 1974. Vol. 249, no. 22. P. 7130–7139.

Hissin P. J., Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues // Analytical Biochemistry. 1976. Vol. 74. P. 214–226.

Kalinkina N. M., Kulikova T. P., Morozov A. K., Vlasova L. I. Causes of technogenic changes in a freshwater zooplanktonic community // Biol. Bull. 2003. Vol. 30, no. 6. P. 627–632.

Machado C., Zaleski T., Rodrigues E. et al. Effect of temperature acclimation on the liver antioxidant defence

system of the Antarctic nototheniids *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii* // Comparative Biochemistry and Physiology. 2014. Vol. B, no. 172–173. P. 21–28.

Madeira D., Narciso L., Cabral H. N. et al. Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish // Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol. 2013. Vol. 166. P. 237–243. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.06.008

Mount D. R., Gulley D. D., Hockett J. R. et al. Statistical models to predict the toxicity of major ions to *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna* and *Pimephales promelas* (fathead minnows) // Environ Tox and Chem. 1997. Vol. 16, no. 10. P. 2009–2019.

Noble J. E., Bailey M. J. A. Quantitation of Protein // Methods in Enzymology. 2009. Vol. 463. P. 73–95. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63008-1

Trama F. B. The acute toxicity of some common salts of sodium, potassium and calcium to the common bluegill (*Lepomis macrochirus* Rafinesque) // Proc of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia. 1954. Vol. 106. P. 185–205.

Поступила в редакцию 24.06.2016

References

Ieshko E. P., Anikieva L. V., Lebedeva D. I., Il'mast N. V. Osobennosti populacionnoj biologii cestod roda *Triaenophorus* v estestvennyh i tehnogenno transformirovannyh vodoemah [Characteristics of population biology of the cestode *Triaenophorus* sp. in natural and transformed aquatic bodies]. *Parazitologija* [Parasitology]. 2012. Vol. 46, no. 6. P. 434–443.

Il'mast N. V., Sterligova O. P., Kuchko Ja. A., Pavlovskij S. A. Gidrobiocenozy Kostomukshskogo vodohranilishha (bassejn Belogo morja) v usloviyah tehnogenogo zagraznenija [Kostomuksha water reservoir hydrobiocenoses (the White Sea Basin) in the conditions of technogenic pollution]. *Izvestija Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk* [Proceed. of the Samara Scientific Center of the RAS]. 2013. Vol. 15, no. 3. P. 916–920.

Kozlov A. V., Slepysheva V. V. Opredelenie belka v syvorotke krvi [Protein determination in blood serum]. TerraMedica, prilozhenie "Laboratornaja diagnostika". 2005. No. 3. URL: http://www.terramedica.spb.ru/ld3_2005/kozlov.htm. (accessed: 21.05.2016).

Lozovik P. A., Kulakova N. E. Gidrohimicheskij sostav vod hvostohranilishha i oz. Okunevoe [Hydrochemistry of the tailing pond and Okunevoe Lake]. Biota severnyh ozer v usloviyah antropogennogo vozdejstviya [Biota of the northern lakes under human impact]. Eds N. N. Nemova, N. V. Il'mast, E. P. Ieshko, O. V. Meshherjakova. Petrozavodsk: KarRC of RAS, 2012. P. 128–136.

Lozovik P. A., Markkanen S. L., Morozov A. K. i dr. Poverhnostnye vody Kaleval'skogo rajona i territorii Kostomukshi v usloviyah antropogennogo vozdejstviya [The surface water of the Kalevala District and Kostomuksha under human impact]. Petrozavodsk: KarRC of RAS, 2001. 168 p.

Suhovskaja I. V., Borvinskaja E. V., Smirnov L. P., Nemova N. N. Sravnitel'nyj analiz metodov opredelenija koncentracii belka – spektrofotometrii v diapazone 200–220 nm i po Bredford [Comparative analysis of the methods to determine protein concentration: spectrophotometry in 200–220 nm range and the Bradford protein assay]. *Trudy KarNC RAN* [Trans. of KarRC of RAS]. 2010. No. 2. P. 68–71.

Taksheev S. A. Soderzhanie nekotoryh tyajelih metallov v pecheni i mishcah rib Kostomukshskogo hvostohranilishha [Some heavy metals in the livers and muscles of fishes in the Kostomuksha tailing pond]. *Ekologicheskie problemi Severnyh regionov i puti ih resheniya: materialy Mejd. konf. Chast' 1* [Ecological Problems of the Northern Regions and their Solution: Proceed. of the International Conference. Part 1]. Apatity, 2004. P. 215–216.

Taksheev S. A. Sostoyanie ribnoi chasti soobschestva Kostomukshskogo hvostohranilishha i ego ocenka biokhimicheskimi metodami [The state of the fishing community in the Kostomuksha tailing pond and its assessment with biochemical methods]: PhD (Cand. of Biol.) thesis. Petrozavodsk, 2005. 171 p.

Vysockaja R. U., Krupnova M. Ju., Ieshko E. P., Anikieva L. V., Lebedeva D. I. Jekologo-biokhimicheskie aspekty parazito-hozjainnyh otnoshenij v transformirovannyh vodoemah (na primere cestody *Triaenophorus nodulosus* i ee hozjaina shhuki obyknovenoj *Esox lucius*) [Ecological and biochemical aspects of parasite-host interactions in transformed aquatic bodies: a case study of the cestode *Triaenophorus nodulosus* and its host, the northern pike *Esox lucius*]. *Izvestija RAN. Serija biologicheskaja* [Biology Bulletin]. 2015. No. 3. P. 302–309. doi: 10.7868/S0002332915030145

Baysoy E., Atli G., Gürlür C. Ö., Dogan Z., Eroglu A., Kocalar K., Canli M. The effects of increased freshwater

salinity in the bioavailability of metals (Cr, Pb) and effects on antioxidant systems of *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2012. Vol. 84, no. 249. P. 53.

Brophy P. M., Barrett J. Glutathione transferases in helminthes. *Parasitology*. 1990. Vol. 100. P. 345–349.

Carvalho C. dos S., Bernusso V. A., de Araújo H. S. S., Espindola E. L. G., Fernandes M. N. Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere*. 2012. Vol. 89, no. 1. P. 60–69. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.04.013

Cohn V. H., Lyle J. A. Fluorometric assay for glutathione. *Analytical biochemistry*. 1966. Vol. 14. P. 434–440.

Fischer S. W., Stromberg P., Bruner K. A., Boulet L. D. Molluscicidal activity of potassium to the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*: toxicity and mode of action. *Aquatic Toxicology*. 1991. Vol. 20. P. 219–234.

Geerts S., Gryseels B. Drug resistance in human helminths: current situation and lessons from livestock. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000. Vol. 13. P. 207–222.

Grim J. M., Simonik E. A., Semones M. C., Kuhn D. E., Crockett E. L. The glutathione-dependent system of antioxidant defense is not modulated by temperature acclimation in muscle tissues from striped bass, *Morone saxatilis*. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 2013. Vol. 164, no. 2. P. 383–390.

Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. of Biol. Chem.* 1974. Vol. 249, no. 22. P. 7130–7139.

Hissin P. J., Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*. 1976. Vol. 74. P. 214–226.

Kalinkina N. M., Kulikova T. P., Morozov A. K., Vlasova L. I. Causes of technogenic changes in a freshwater zooplanktonic community. *Biol. Bull.* 2003. Vol. 30, no. 6. P. 627–632.

Machado C., Zaleski T., Rodrigues E., Carvalho C. dos S., Cadena S. M., Gozzi G. J., Krebsbach P., Rios F. S., Donatti L. Effect of temperature acclimation on the liver antioxidant defence system of the Antarctic nototheniids *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2014. Vol. B, no. 172–173. P. 21–28.

Madeira D., Narciso L., Cabral H. N., Vinagre C., Diniz M. S. Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 2013. Vol. 166. P. 237–243.

Mount D. R., Gulley D. D., Hockett J. R., Garrison T. D., Evans J. M. Statistical models to predict the toxicity of major ions to *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna* and *Pimephales promelas* (fathead minnows). *Environ Tox and Chem.* 1997. Vol. 16, no. 10. P. 2009–2019.

Noble J. E., Bailey M. J. A. Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology*. 2009. Vol. 463. P. 73–95.

Trama F. B. The acute toxicity of some common salts of sodium, potassium and calcium to the common bluegill (*Lepomis macrochirus* Rafinesque). *Proc. of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*. 1954. Vol. 106. P. 185–205.

Received June 24, 2016

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кочнева Альбина Александровна

студентка
Петрозаводский государственный университет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: ko4neva93@yandex.ru

Борвинская Екатерина Витальевна

научный сотрудник лаб. экологической биохимии, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910

научный сотрудник лаб. биосенсорики и биофотоники
Научно-исследовательский институт биологии
Иркутского государственного университета
ул. Ленина, 3, Иркутск, Россия, 664003

эл. почта: borvinska@gmail.com

Суховская Ирина Викторовна

научный сотрудник лаб. экологической биохимии, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: sukhovskaya@inbox.ru

CONTRIBUTORS:

Kochneva, Albina

Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: ko4neva93@yandex.ru

Borvinskaya, Ekaterina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia

Institute of Biology, Irkutsk State University
3 Lenin St., 664003 Irkutsk, Russia

e-mail: borvinska@gmail.com

Sukhovskaya, Irina

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

Иешко Евгений Павлович

заведующий лаб. паразитологии животных и растений,
д. б. н., проф.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: ieshko@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769810

Смирнов Лев Павлович

ведущий научный сотрудник лаб. экологической биохимии,
д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: levps@rambler.ru

Ieshko, Evgueny

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

Smirnov, Lev

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

УДК 581. 1

РЕАКЦИЯ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА НА НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ РАЗНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ

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

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Изучалась реакция проростков огурца (*Cucumis sativus* L.) гибрида F1 Зозуля на 3-суточное воздействие низких положительных температур разной интенсивности (12 и 4 °С). Установлено, что низкая закалывающая (12 °С) и повреждающая (4 °С) температура в начальный период действия вызывает торможение процесса накопления сырой и сухой биомассы семядольных листьев проростков, увеличение в них активности антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы (СОД), повышение содержания свободного пролина и конечного продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ) – малонового диальдегида (МДА). Увеличение экспозиции до 3 сут в условиях закалывающей температуры 12 °С сопровождалось возобновлением ростовых процессов на фоне дальнейшего повышения активности СОД и уровня свободного пролина в листьях, что способствовало формированию повышенной холодоустойчивости проростков огурца. В отличие от этого воздействие повреждающей температуры 4 °С в течение 1–3 сут вызывало необратимое подавление процесса накопления сырой и сухой биомассы семядольных листьев огурца, значительное увеличение в них содержания МДА и уровня свободного пролина и уменьшение активности фермента СОД, которые сопровождалось снижением холодоустойчивости, что в конечном итоге приводило к повреждению и гибели проростков. На основании полученных данных сделан вывод о том, что характер и динамика физиолого-биохимических показателей у растений огурца, подвергнутых действию низких закалывающих и повреждающих температур, могут изменяться как количественно, так и качественно в зависимости от интенсивности и продолжительности низкотемпературного воздействия.

Ключевые слова: *Cucumis sativus* L.; низкие положительные температуры; устойчивость; рост; малоновый диальдегид; супероксиддисмутаза; пролин.

A. A. Ignatenko, N. S. Repkina, A. F. Titov, V. V. Talanova. THE RESPONSE OF CUCUMBER PLANTS TO LOW TEMPERATURE IMPACTS OF VARYING INTENSITY

We studied the response of cucumber seedlings (*Cucumis sativus* L.) of the hybrid F1 Zozulya to 3-day exposure to low positive temperatures of different intensities (12 °C and 4 °C). It was found that at initial phases of the impact low hardening (12 °C) and damaging (4 °C) temperatures inhibit the process of accumulation of cotyledons' wet and dry biomass, promote the activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD), enlarge the content of free proline and the final product of lipid peroxidation (LPO) – malondialdehyde (MDA). Extended 3-day exposure to the hardening 12 °C temperature re-launched growth processes with further increase of SOD activity and the level of free proline in leaves, thus promoting the cold tolerance of cucumber seedlings. In contrast,

exposure to the damaging 4 °C temperature for 1–3 days caused irreversible inhibition of the accumulation of cotyledons' wet and dry biomass, a significant increase of MDA and free proline, a decrease of SOD activity, and a decline of cold tolerance, eventually leading to damage and death of the seedlings. It was concluded based on these data that the character and dynamics of physiological and biochemical parameters in the cucumber plants exposed to low hardening and damaging temperatures can vary both quantitatively and qualitatively depending on the intensity and duration of the impact.

Key words: *Cucumis sativus* L.; low positive temperatures; resistance, growth; malondialdehyde; superoxide dismutase; proline.

Введение

Низкие температуры являются одним из факторов внешней среды, оказывающих наиболее сильное негативное воздействие на все стороны жизнедеятельности растений. Особенно зависимы от них растения тропического и субтропического происхождения, большинство которых не способны выдерживать продолжительного действия даже положительных низких температур [Титов и др., 2006]. Как показывают наблюдения и исследования, многие из них повреждаются уже при температурах ниже 8–10 °C [Borowski, 2009; Попов и др., 2010; Fariduddin, 2011; Sayyari, 2012; Jouyban et al., 2013]. Тем не менее известно, что теплолюбивые растения, подобно холодостойким видам, способны в определенном диапазоне температур к холодовому закаливанию, хотя их адаптивные возможности крайне ограничены [Титов и др., 2006; Титов, Таланова, 2009]. Этот диапазон закаливающих температур зависит от вида (сорта, генотипа) растений, их возраста и ряда сопутствующих условий (свет, влажность и т. д.). Например, для проростков кукурузы (гибрид Днепропетровский 185) он представлен температурами от 9 до 16 °C, для томата (сорт Московский осенний 3405) – от 6 до 14 °C, для огурца (гибрид Алма-Атинский 1) – от 8 до 18 °C [Титов и др., 2006]. В этих же исследованиях установлено, что характер изменения многих физиолого-биохимических показателей может варьировать в зависимости от интенсивности низкотемпературного воздействия не только количественно, но и качественно.

Учитывая вышеизложенное, цель данного исследования заключалась в изучении некоторых ответных реакций растений огурца на низкотемпературные воздействия разной интенсивности.

Материалы и методы

Опыты проводили с проростками огурца (*Cucumis sativus* L.) гибрида F1 Зозуля,

выращенными в течение 7 сут на питательном растворе (рН 6,2–6,4) с добавлением микроэлементов в камере искусственного климата при температуре воздуха 22 °C, его относительной влажности 60–70 %, освещенности около 10 клк и 14-часовом фотопериоде. Затем их в течение 3 сут подвергали воздействию низкой закаливающей (12 °C) или повреждающей (4 °C) температуры, сохраняя прочие условия неизменными. Выбор температур и продолжительности их воздействия основан на результатах предыдущих исследований [Титов и др., 2006; Титов, Таланова, 2009].

Накопление сырой и сухой биомассы листьев растений определяли в соответствии со стандартной методикой [Рогожин, Рогожина, 2013].

О холодоустойчивости проростков огурца судили по изменению выхода электролитов из тканей листьев с использованием кондуктометра (HANNA, Италия) [Гришенкова, Лукаткин, 2005]. Степень повреждения клеток оценивали по величине коэффициента повреждения (КП), который рассчитывали по формуле:

$$\text{КП} = (L_D - L_0) / (100 - L_0) \cdot 100 \%,$$

где L_D – выход электролитов из охлажденной ткани, в процентах от полного выхода; L_0 – выход электролитов из тканей контрольных растений, в процентах от полного выхода [Лукаткин и др., 2013].

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) в листьях оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА) [Stewart, Bewley, 1980].

Активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) определяли по способности фермента ингибировать фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия [Beauchamp, Fridovich, 1971]. Содержание белка анализировали методом Бредфорда [Bradford, 1976].

Содержание свободного пролина определяли с помощью нингидринового реактива [Bates et al., 1973].

Таблица 1. Накопление сырой и сухой биомассы листьев у проростков огурца, подвергнутых действию температуры 12 и 4 °С

Экспозиция, ч	Сырая биомасса листа, мг			Сухая биомасса листа, мг		
	22 °С	12 °С	4 °С	22 °С	12 °С	4 °С
24	306,2 ± 19,3	250,4 ± 5,0*	214,6 ± 4,9*	21,0 ± 1,8	18,1 ± 0,5	18,1 ± 1,0
48	331,4 ± 12,9*	242,0 ± 9,2*	128,0 ± 10,4*	22,2 ± 2,6	18,2 ± 0,7	18,1 ± 3,5
72	353,6 ± 3,0*	265,4 ± 7,2	81,0 ± 7,8*	27,7 ± 2,6*	20,0 ± 0,5*	18,0 ± 0,7

Примечание. Исходный уровень: сырая биомасса листа 274,1 ± 7,0, сухая биомасса листа 17,1 ± 0,05. *Отличия от исходного уровня достоверны при $p \leq 0,05$.

Повторность в пределах одного варианта опыта при анализе выхода электролитов из клеток растений, активности СОД, содержания пролина и МДА – 3-кратная, при измерении сырой и сухой биомассы – 5-кратная. Каждый опыт повторяли не менее 2–3 раз. О достоверности различий между вариантами судили по критерию Стьюдента при $p < 0,05$. На рисунках представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

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

Результаты

Проведенные исследования показали, что накопление сырой биомассы листьев проростков огурца снижается (по сравнению с контрольными проростками того же возраста, выращенными при 22 °С) как при действии температуры 12 °С, так и при 4 °С (табл. 1). Однако при 12 °С накопление сырой биомассы листьев тормозилось в первые двое суток опыта, а затем (на третьи сутки) оно возобновлялось. В отличие от этого при 4 °С накопление сырой биомассы ингибировалось в течение всего опыта.

Прирост сухой биомассы листьев огурца при 12 °С был также ингибирован в течение первых двух суток опыта, но в дальнейшем он частично восстанавливался, тогда как при 4 °С – полностью подавлялся.

В дальнейшем нами было проанализировано изменение выхода электролитов из клеток листьев огурца в условиях действия температур 12 и 4 °С. Установлено, что в начальный период (1–24 ч) их действия происходит увеличение выхода электролитов из клеток листьев. Но если при 12 °С через двое суток его уровень снижился и к концу опыта (третьи сутки) возвращался к исходным значениям (рис. 1, а), то при 4 °С выход электролитов продолжал увеличиваться в течение всего периода низкотемпературного воздействия и был примерно в 9 раз выше, чем при 12 °С (рис. 1, а). Расчет коэффициента повреждения (КП) листьев у растений огурца также выявил значительные различия между вариантами опыта. Его максимальная величина, составившая около 90 %, была отмечена на третьи сутки при 4 °С (рис. 1, б).

Анализ динамики накопления конечного продукта ПОЛ – МДА – показал, что температура 12 °С не вызывает существенных изменений в его содержании, хотя некоторое повышение этого показателя было отмечено на 2–3-и сутки (рис. 2). В отличие от этого при температуре 4 °С содержание МДА в листьях огурца

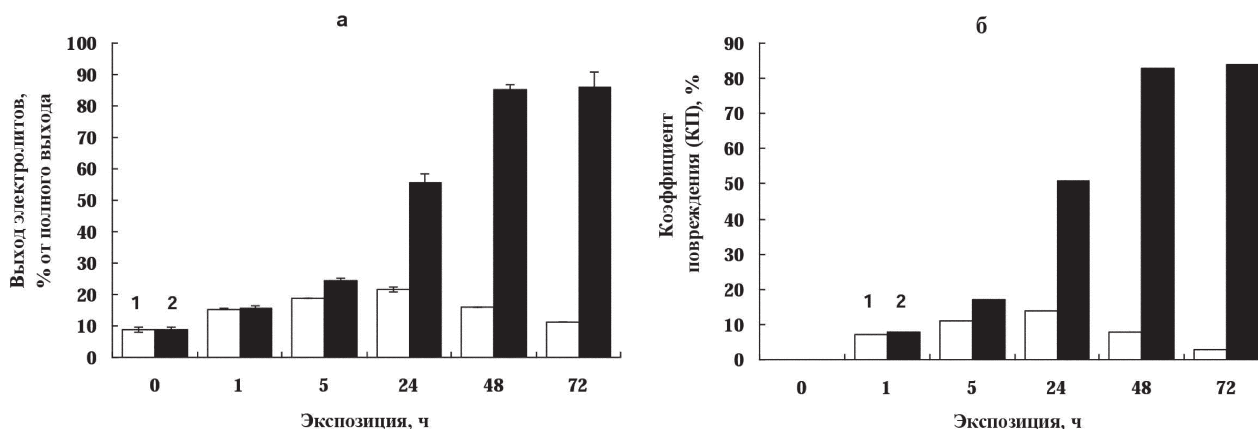


Рис. 1. Выход электролитов (% от полного выхода) (а) и коэффициент повреждения клеток листьев проростков огурца (б), подвергнутых действию температуры 12 °С (1) и 4 °С (2)

увеличивалось уже в первые часы (1–5 ч) низкотемпературного воздействия и в дальнейшем продолжало монотонно возрастать (рис. 2).

Исследование активности СОД выявило, что уже через 1 ч действия температуры 12 °С она постепенно возрастала, достигая максимума на третьи сутки (рис. 3). При температуре 4 °С активность СОД также увеличивалась в первые часы опыта, однако в дальнейшем она заметно снижалась (рис. 3).

Действие температуры 12 и 4 °С вызывало повышение содержания пролина в листьях огурца в первые 1–5 и последующие часы воздействия (рис. 4). При этом наибольший уровень пролина отмечен в листьях растений, подвергнутых действию температуры 4 °С.

Обсуждение результатов

Исследование реакции растений огурца на низкотемпературные воздействия разной интенсивности (12 и 4 °С) позволило выявить как определенное сходство, так и ряд существенных различий в характере изменений и динамике физиолого-биохимических показателей, вносящих свой вклад в холодоустойчивость (табл. 2).

В наших опытах при температуре 12 °С происходило первоначальное снижение накопления сырой биомассы листьев огурца, которое в дальнейшем (3 сут) сменялось процессом восстановления (табл. 2). Прирост сухой биомассы также отмечен в этот период, что свидетельствует о частичном восстановлении ростовых процессов. Действие повреждающей температуры (4 °С) вызывало необратимое подавление накопления сырой и сухой биомассы растений, что ранее было отмечено другими авторами у огурца при 5/3 °С [Fariduddin et al., 2011], а у кукурузы при 3 °С [Лукаткин и др., 2013].

Установлено, что одной из главных причин низкотемпературного повреждения растений является нарушение структуры клеточных мембран [Saltveit, 2001; Колмыкова и др., 2012; Jouyban et al., 2013], а основным процессом деградации мембранных липидов является ПОЛ, который вызывается интенсивной генерацией АФК [Prasad, 1996; Foyer, Noctor, 2005; Радюкина и др., 2011; Синькевич и др., 2011]. Одним из показателей активности ПОЛ принято считать уровень МДА [Abbas, 2012; Noctor et al., 2015]. Тот факт, что при 12 °С в листьях огурца не происходило существенных изменений в содержании МДА (табл. 2), говорит об отсутствии необратимых нарушений липидного комплекса мембран. В отличие от этого быстрое повышение содержания МДА уже в начальный период

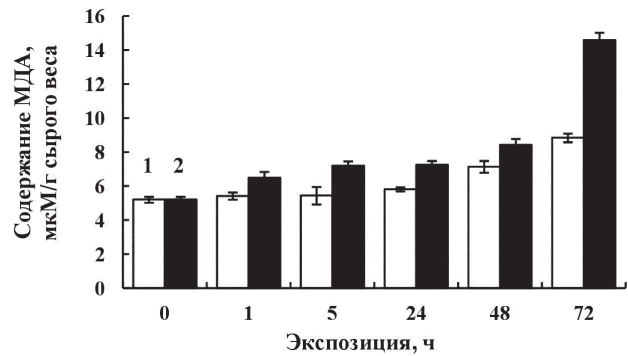


Рис. 2. Содержание МДА в листьях проростков огурца, подвергнутых действию температуры 12 °С (1) и 4 °С (2)

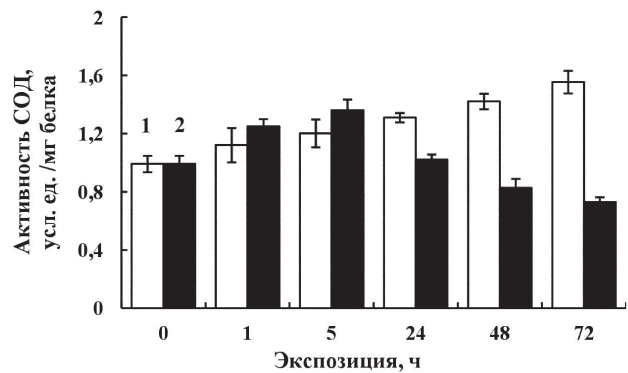


Рис. 3. Активность СОД в листьях проростков огурца, подвергнутых действию температуры 12 °С (1) и 4 °С (2)

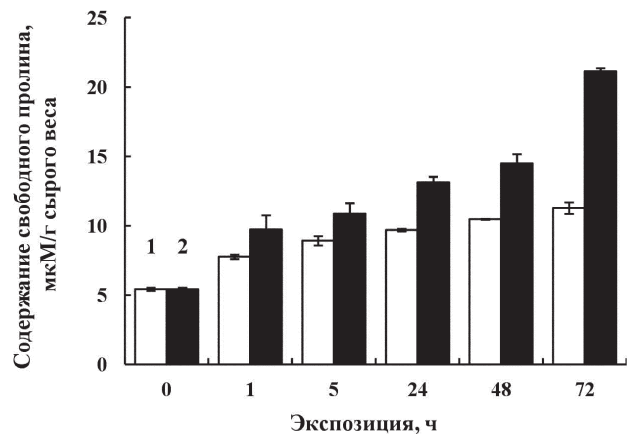


Рис. 4. Содержание свободного пролина в листьях проростков огурца, подвергнутых действию температуры 12 °С (1) и 4 °С (2)

действия температуры 4 °С и дальнейшее усиление его накопления (3 сут) указывает на развитие окислительного стресса в клетках листьев, что очевидно является одной из причин, приводящих к повреждению растений.

Обнаруженное нами снижение выхода электролитов (табл. 2) и величина КП клеток листьев при действии температуры 12 °С также могут указывать на отсутствие нарушения

Таблица 2. Характер и относительная величина изменения физиологических и биохимических показателей у проростков огурца, подвергнутых действию температуры 12 и 4 °С

Показатель	Значение показателя по отношению к исходному уровню, %				
	экспозиция, ч				
	1	5	24	48	72
	12 °С				
Сырая биомасса листа	–	–	91*	88*	94
Сухая биомасса листа	–	–	105	105	118*
Выход электролитов	170*	215*	238*	181*	124
Содержание МДА	104	105	111*	136*	169*
Активность СОД	113	115	132*	143*	156*
Содержание свободного пролина	144*	165*	279*	194*	209*
	4 °С				
Сырая биомасса листа	–	–	78*	47*	29*
Сухая биомасса листа	–	–	105	105	105
Выход электролитов	179*	275*	630*	964*	972*
Содержание МДА	125*	138*	140*	161*	280*
Активность СОД	126*	137*	103	82	73*
Содержание свободного пролина	179*	200*	242*	267*	390*

Примечание. *Отличия от исходного уровня достоверны при $p \leq 0,05$. Значения показателей у контрольных растений приняты за 100 %. Прочерк – определение не проводили.

целостности клеточных мембран и свидетельствовать о формировании повышенной холодоустойчивости растений. Эти данные согласуются с результатами наших предыдущих исследований, в которых с использованием других методов зафиксировано повышение холодоустойчивости огурца при 10 °С [Титов и др., 2006] и 12 °С [Шерудило и др., 2013]. Попутно отметим, что в листьях табака при действии температуры 8 °С также сохраняются барьерные свойства клеточных мембран и наблюдается повышение устойчивости [Попов и др., 2010]. В отличие от этого значительное увеличение (в 9 раз) выхода электролитов из листьев огурца (табл. 2) и повышение КП при температуре 4 °С указывают на существенное повреждение мембранной системы клеток, что в конечном счете, очевидно, выступает одной из причин гибели растений. Сходные данные о негативном действии температур 2–4 °С получены и в отношении растений огурца других сортов [Шаркаева, 2001; Лукаткин, 2002; Lukatkin et al., 2003; Gupta et al., 2012].

Как известно, растения обладают устойчивостью к окислительному стрессу, который вызывается избыточным накоплением АФК, благодаря активной работе антиоксидантных систем, включающих в себя антиоксидантные ферменты и низкомолекулярные протекторные соединения [Blokchina et al., 2003; Карташов и др., 2008; Радюкина и др., 2008, 2011; Прадедова и др., 2009, 2011; Колупаев и др., 2011, 2014; Креславский и др., 2012; Noctor

et al., 2012]. При этом ключевая роль в защите растений от окислительного стресса отводится СОД – ферменту, катализирующему превращение супероксидного радикала до перекиси водорода [Карташов и др., 2008]. Однако имеющиеся в литературе данные об изменении активности СОД при охлаждении противоречивы. Одни авторы указывают на ее повышение [Kuk et al., 2003; Xu et al., 2008; Fariduddin et al., 2011; Cui et al., 2013; Dong et al., 2014], вызванное активацией латентных форм СОД и синтезом новых молекул фермента. Другие исследователи отмечают у теплолюбивых видов снижение активности этого фермента под влиянием холода [Wang et al., 1986; Jahnke et al., 1991; Лукаткин, 2002; Колмыкова и др., 2012; Шибаева и др., 2015], что связывают с истощением пула фермента при его повышенном расходовании на гашение супероксидных радикалов, снижением синтеза (или усилением деградации) молекул СОД [Бараненко, 2006]. Кроме того, динамика активности фермента может зависеть от интенсивности и длительности воздействия стресс-фактора [Бараненко, 2006].

В наших опытах при температуре 12 °С наблюдалось повышение активности фермента в листьях проростков (табл. 2). При действии других пониженных температур – 8, 10 и 15 °С – также отмечено повышение активности СОД у огурца [Xu et al., 2008; Fariduddin et al., 2011; Dong et al., 2014] и при 6–7 °С у табака [Cui et al., 2013]. В отличие от этого в условиях более низкой температуры (4 °С) активность СОД

Таблица 3. Особенности динамики отдельных физиолого-биохимических показателей у проростков огурца в зависимости от типа низкотемпературного воздействия

Показатель	Температура	
	закаливающая (12 °С)	повреждающая (4 °С)
Холодоустойчивость	увеличивается	снижается
Сырая биомасса листа	увеличивается к концу 3-х суток	снижается
Сухая биомасса листа	увеличивается к концу 3-х суток	не изменяется
Содержание МДА	увеличивается	увеличивается
Активность СОД	увеличивается	снижается
Содержание свободного пролина	увеличивается	увеличивается

первоначально (1–5 ч) увеличивалась и была даже несколько выше, чем при 12 °С, что, вероятно, обусловлено большим уровнем продукции супероксидного радикала, однако в дальнейшем отмечено ее снижение (табл. 2), что согласуется с данными, полученными как на огурце [Лукаткин, 2002], так и на других теплолюбивых видах – кукурузе, рисе и томате [Wang et al., 1986; Jahnke et al., 1991; Gianinetti et al., 1993; Лукаткин, 2002].

Наряду с антиоксидантными ферментами в защите растений от АФК участвуют и низкомолекулярные соединения, такие как, например, пролин [Verbruggen, Hermans, 2008; Szabados, Savoure, 2009; Маевская, Николаева, 2013; Rejeb et al., 2014]. Нами было выявлено определенное сходство в динамике накопления пролина в листьях огурца в условиях действия температур 12 и 4 °С. Уровень пролина повышался уже в первые часы действия этих температур и в дальнейшем продолжал возрастать (табл. 2). Эти результаты согласуются с данными об аккумуляции пролина в растениях огурца при других вариантах низкотемпературных воздействий – при 10 и 15 °С [Fariduddin et al., 2011; Cao et al., 2014] и при 4–6 °С [Feng, 2003; Gupta et al., 2012; Абилова, 2014].

В целом анализ динамики содержания МДА, активности СОД и уровня пролина в листьях огурца при низкотемпературных воздействиях разной интенсивности показал, что в условиях действия температуры 12 °С не происходит существенного развития окислительного стресса, т. к. в этом случае повышается активность СОД и увеличивается содержание свободного пролина, которые наряду с другими антиоксидантами обеспечивают защиту клеток от избыточного накопления АФК, что в конечном итоге способствует формированию повышенной холодоустойчивости растений (табл. 3). При более сильном охлаждении (4 °С, 24–72 ч) при снижении активности СОД в листьях огурца наблюдалось значительное повышение уровня пролина. Но поскольку низкомолекулярные антиоксиданты, в частности пролин, имеют

существенно меньшие константы скоростей взаимодействия с супероксидными радикалами и перекисями [Мерзляк, 1989; Лукаткин, 2002], то именно активность антиоксидантных ферментов определяет главным образом защиту клеток растений от АФК при охлаждении. Видимо, снижение активности СОД в листьях огурца при температуре 4 °С приводило к усилению интенсивности ПОЛ и последующей гибели растений, поскольку активизации другой антиоксидантной реакции (накопление пролина) было недостаточно, чтобы компенсировать пониженную активность СОД и соответственно обеспечить защиту клеток от повреждающего действия холода.

Заключение

Изучение ответных реакций растений огурца на действие низких положительных температур различной интенсивности показало, что характер и динамика изученных физиолого-биохимических показателей могут существенно изменяться как количественно, так и качественно в зависимости от типа низкотемпературного воздействия. Низкие закаливающая (12 °С) и повреждающая (4 °С) температуры в начальный период действия (часы) вызывают торможение роста растений, увеличение активности фермента СОД, повышение содержания свободного пролина и МДА в листьях. Однако к концу 3-суточного воздействия температуры 12 °С происходило возобновление ростовых процессов на фоне дальнейшего повышения активности СОД и уровня пролина, что положительно сказывалось на процессе формирования повышенной холодоустойчивости проростков. В отличие от этого повреждающая температура (4 °С) вызывала необратимое подавление ростовых процессов, значительное увеличение содержания МДА, повышение содержания свободного пролина на фоне снижения активности СОД, что сопровождалось снижением устойчивости и в конечном итоге вело к повреждению и гибели растений.

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

Литература

Абилова Г. А. Влияние салициловой кислоты на перекисное окисление липидов и содержание пролина в растениях огурца в связи с преадаптацией к холодному стрессу // Вестник Дагестанского государственного университета. 2014. № 6. С. 66–70.

Бараненко В. В. Супероксиддисмутаза в клетках растений // Цитология. 2006. Т. 48. С. 465–473.

Грищенко Н. Н., Лукаткин А. С. Определение устойчивости растительных тканей к абиотическим стрессам с использованием кондуктометрического метода // Поволжский экологический журнал. 2005. № 1. С. 3–11.

Карташов А. В., Радюкина Н. Л., Иванов Ю. В. и др. Роль систем антиоксидантной защиты при адаптации дикорастущих видов растений к солевому стрессу // Физиология растений. 2008. Т. 55, № 4. С. 516–522.

Колмыкова Т. С., Клокова Е. В., Шаркаева Э. Ш. Активность супероксиддисмутаза растений томата при изменении температурных режимов // Сб. науч. тр. SWorld: материалы Международной научно-практической конференции «Научные исследования и их практическое применение. Современное состояние и пути развития». Одесса. 2012. Т. 31. С. 68–70.

Колупаев Ю. Е., Карпец Ю. В., Обозный А. И. Антиоксидантная система растений: участие в клеточной сигнализации и адаптации к действию стрессоров // Вестник Харьковского национального аграрного университета. Сер. Биология. 2011. Вып. 1, № 22. Р. 6–34.

Колупаев Ю. Е., Вайнер А. А., Ястреб Т. О. Проллин: физиологические функции и регуляция содержания в растениях в стрессовых условиях // Вестник Харьковского национального аграрного университета. Сер. Биология. 2014. Вып. 2, № 32. Р. 6–22.

Креславский В. Д., Лось Д. А., Аллахвердиев С. И., Кузнецов Вл. В. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений // Физиология растений. 2012. Т. 59, № 2. С. 163–178.

Лукаткин А. С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. Саранск: Мордовск. ун-т, 2002. 208 с.

Лукаткин А. С., Каштанова Н. Н., Духовскис П. Влияние эпибрассинолида на термоустойчивость проростков кукурузы // Агрехимия. 2013. № 6. С. 24–31.

Лукаткин А. С., Каштанова Н. Н. Влияние тидиазурана на термоустойчивость растений кукурузы // Труды Карельского научного центра РАН. № 3. Сер. Экспериментальная биология. 2013. С. 129–135.

Маевская С. Н., Николаева М. К. Реакция антиоксидантной и осмопротекторной систем проростков пшеницы на засуху и регидратацию // Физиология растений. 2013. Т. 60, № 3. С. 351–359. doi: 10.7868/S0015330313030081

Мерзляк М. Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки // Итоги науки и техники. 1989. Т. 6. 167 с.

Попов В. Н., Антипина О. В., Трунова Т. И. Перекисное окисление липидов при низкотемпературной адаптации листьев и корней теплолюбивых растений табака // Физиология растений. 2010. Т. 57, № 1. С. 153–156.

Прадедова Е. В., Ишеева О. Д., Салаяев Р. К. Супероксиддисмутаза вакуолей клеток растений // Биол. мембраны. 2009. Т. 26, № 1. С. 21–30.

Прадедова Е. В., Ишеева О. Д., Салаяев Р. К. Ферменты антиоксидантной защиты вакуолей клеток корнеплодов столовой свеклы // Физиология растений. 2011. Т. 58, № 1. С. 40–48.

Радюкина Н. Л., Шашукова А. В., Шевякова Н. И., Кузнецов Вл. В. Участие пролина в системе антиоксидантной защиты у шалфея при действии NaCl и параквата // Физиология растений. 2008. Т. 55. С. 721–730.

Радюкина Н. Л., Шашукова А. В., Макарова С. С., Кузнецов Вл. В. Экзогенный пролин модифицирует дифференциальную экспрессию генов супероксиддисмутаза в растениях шалфея при UV-B облучении // Физиология растений. 2011. Т. 58, № 1. С. 49–57.

Рогожин В. В., Рогожина Т. В. Практикум по физиологии и биохимии растений: учеб. пособие. СПб.: ГИОРД, 2013. 352 с.

Синькевич М. С., Нарайкина Н. В., Трунова Т. И. Процессы, препятствующие повышению интенсивности перекисного окисления липидов у холодостойких растений при гипотермии // Физиология растений. 2011. Т. 58, № 6. С. 875–882.

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.

Титов А. Ф., Таланова В. В. Устойчивость растений и фитогормоны. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2009. 206 с.

Шаркаева Э. Ш. Анатомические и физиологические изменения теплолюбивых растений при различной интенсивности охлаждения: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Саранск, 2001. 20 с.

Шерудило Е. Г., Сысоева М. И., Илюха В. А. Реакция антиоксидантной системы огурца на постоянное и кратковременное периодическое действие низкой температуры // Труды Карельского научного центра РАН. Сер. Экспериментальная биология. 2013. № 3. С. 166–172.

Шибяева Т. Г., Шерудило Е. Г., Икконен Е. Н., Титов А. Ф. Влияние кратковременных ежесуточных понижений температуры на активность антиоксидантных ферментов // Труды Карельского научного центра РАН. Сер. Экспериментальная биология. 2015. № 12. С. 107–115. doi: 10.17076/eb241

Abbas S. M. Effects of low temperature and selenium application on growth and the physiological changes in sorghum seedlings // J. Stress Physiol. Biochem. 2012. Vol. 8, no. 1. P. 268–286.

Bates L. S., Waldren R. P., Teare I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // Plant and Soil. 1973. Vol. 39, no. 1. P. 205–207.

Beauchamp Ch., Fridovich I. Superoxide Dismutase improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // *Anal. Biochem.* 1971. Vol. 44, no. 1. P. 276–287. doi: 10.1016/0003-2697(71)90370-8

Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review // *Ann. Bot.* 2003. Vol. 91. P. 179–194. doi: 10.1093/aob/mcf118

Borowski E. Response to chilling in cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants treated with triacontanol and Asahi SL // *Acta Agrobot.* 2009. Vol. 62, no. 2. P. 165–172.

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.

Cao Y.-Y., Yang M.-T., Li X. et al. Exogenous sucrose increases chilling tolerance in cucumber seedlings by modulating antioxidant enzyme activity and regulating proline and soluble sugar contents // *Sci. Horti.* 2014. Vol. 179. P. 67–77.

Cui C., Zhou Q. Y., Zhang C. B. et al. Effects of chilling stress on membrane lipid peroxidation and antioxidant system of *Nicotiana tabacum* L. seedling // *Afr. J. Agric. Res.* 2013. Vol. 8, no. 47. P. 6079–6085.

Dong C.-J., Li L., Shang Q.-M. et al. Endogenous salicylic acid accumulation is required for chilling tolerance in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings // *Planta.* 2014. Vol. 240, no. 4. P. 687–700. doi: 10.1007/s00425-014-2115-1

Fariduddin Q., Yusuf M., Chalkoo S. et al. 28-Homobrassinolide improves growth and photosynthesis in *Cucumis sativus* L. through an enhanced antioxidant system in the presence of chilling stress // *Photosynthetica.* 2011. Vol. 49, no. 1. P. 55–64. doi: 10.1007/s11099-011-0022-2

Feng Z., Guo A., Feng Z. Amelioration of chilling stress by triadimefon in cucumber seedlings // *Plant Growth Regul.* 2003. Vol. 39. P. 277–283.

Foyer C. H., Noctor G. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a reevaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context // *Plant Cell Environ.* 2005. Vol. 29. P. 1056–1071.

Gianinetti A., Cantoni M., Lorenzoni C. et al. Changes in superoxide dismutase and catalase activities in response to low temperatures in tomato mutants // *J. Genet. Breeding.* 1993. Vol. 47, no. 4. P. 353–356.

Gupta N., Rathore M., Goyary D. et al. Marker-free transgenic cucumber expressing *Arabidopsis cbf1* gene confers chilling stress tolerance // *Biol. Plant.* 2012. Vol. 56, no. 1. P. 57–63.

Jahnke L. S., Hull M. R., Long S. P. Chilling stress and oxygen metabolizing enzymes in *Zea mays* and *Zea*

diploperennis // *Plant Cell Environ.* 1991. Vol. 14, no. 1. P. 97–104.

Jouyban Z., Rohola H., Sharafi S. Chilling stress in plants // *Intl. J. Agri and Crop Sci.* 2013. Vol. 5, no. 24. P. 2961–2968.

Kuk Y. I., Shin J. S., Burgos N. R. et al. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants // *Crop Sci.* 2003. Vol. 43, no. 6. P. 2109–2117.

Lukatkin A. S., Bashmakov D. I., Kipaikina N. V. Protective role of thidiazuron treatment on cucumber seedlings exposed to heavy metals and chilling // *J. Plant Physiol.* 2003. Vol. 50, no. 3. P. 346–348.

Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S. et al. Glutathione in plants: an integrated overview // *Plant Cell Environ.* 2012. Vol. 35. P. 454–484.

Noctor G., Lelarge-Trouverie C., Mhamdi A. The metabolic of oxidative stress // *Phytochemistry.* 2015. Vol. 112. P. 33–53.

Prasad T. K. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities // *The Plant J.* 1996. Vol. 10, no. 6. P. 1017–1026.

Rejeb K. B., Abdelly C., Savoure A. How reactive oxygen species and proline face stress together // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. Vol. 80. P. 278–284.

Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // *Trends Plant Sci.* 2009. Vol. 15, no. 2. P. 89–97.

Saltveit M. E. Chilling injury is reduced in cucumber and rice seedlings and in tomato pericarp discs by heat-shocks applied after chilling // *Postharvest Biol. Tec.* 2001. Vol. 21. P. 169–177.

Sayyari M. Improving chilling resistance of cucumber seedlings by salicylic acid // *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 2012. Vol. 12, no. 2. P. 204–209.

Stewart R. R. C., Bewley J. D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes // *Plant Physiol.* 1980. Vol. 65. P. 245–248.

Verbruggen N., Hermans C. Proline accumulation in plants: a review // *Amino acid.* 2008. Vol. 35. P. 753–759. doi: 10.1007/s00726-008-0061-6

Wang Y.-R., Liu H.-X., 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. Sinica.* 1986. Vol. 12, no. 3. P. 244–251.

Xu P.-L., Guo Y.-K., Bai J.-G. et al. Effect of long-term chilling on ultrastructure and antioxidant activity in leaves of two cucumber cultivars under low light // *Physiol. Plant.* 2008. Vol. 132. P. 467–478. doi: 10.1111/j.1399-3054.2007.01036.x

Поступила в редакцию 01.07.2016

References

Abilova G. A. Vliyanie salitsilovoi kisloty na perekisnoe okislenie lipidov i sodержanie prolina v rasteniyakh ogurtsa v svyazi s preadaptatsiei k kholodovomu stressu [Effect of salicylic acid on lipid peroxidation and proline content in cucumber plants in relation to pre-adaptation to chilling stress]. *Vestnik Dagestanskogo gosu-*

darstvennogo universiteta [Herald of Dagestan State University]. 2014. No. 6. P. 66–70.

Baranenko V. V. Superoksidismutaza v kletkakh rastenii [Superoxide dismutase in plant cells]. *Tsitologiya [Cell and Tissue Biology].* 2006. Vol. 48. P. 465–473.

Grishenkova N. N., Lukatkin A. S. Opredelenie ustoychivosti rastitel'nykh tkanei k abioticheskim stressam s ispol'zovaniem konduktometrcheskogo metoda [A conductometric technique to estimate plants tissues tolerance to abiotic stresses]. *Povolzhskii ekologicheskii zhurnal [Povolzhskiy Journal of Ecology]*. 2005. No. 1. P. 3–11.

Kartashov A. V., Radyukina N. L., Ivanov Yu. V., Pashkovskii P. P., Shevyakova N. I., Kuznetsov V. V. Rol' sistem antioksidantnoi zashchity pri adaptatsii dikorastushchikh vidov rastenii k solevomu stressu [Role of antioxidant systems in wild plant adaptation to salt stress]. *Fiziologiya rastenii [Russian Journal of Plant Physiology]*. 2008. Vol. 55, no. 4. P. 516–522.

Kolmykova T. S., Klokova E. V., Sharkaeva E. Sh. Aktivnost' superoksidmutazy rastenii tomata pri izmenenii temperaturnykh rezhimov [Superoxide dismutase activity of tomato plants in response to temperature regimes changes]. Sb. nauch. tr. SWorld: materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii "Nauchnye issledovaniya i ikh prakticheskoe primeneniye. Sovremennoe sostoyaniye i puti razvitiya" [Research Bulletin SWorld: Proceedings of International Research and Practice Conference *Modern Scientific Research and their Practical Application. Current Status and Development Trends*]. Odessa. 2012. Vol. 31. P. 68–70.

Kolupaev Yu. E., Karpets Yu. V., Oboznyi A. I. Antioksidantnaya sistema rastenii: uchastie v kletochnoi signalizatsii i adaptatsii k deistviyu stressorov [Antioxidant system of plants: role in cell signaling and adaptation to stress factors impact]. *Vestnik Khar'kovskogo natsional'nogo agrarnogo universiteta. Ser. Biologiya [Bulletin of Kharkiv National Agricultural University. Biology Series]*. 2011. Iss. 1, no. 22. P. 6–34.

Kolupaev Yu. E., Vainer A. A., Yastreb T. O. Proline: fiziologicheskie funktsii i regulyatsiya sodержaniya v rasteniyakh v stressovykh usloviyakh [Proline: physiological functions and content regulation in plants under stress conditions]. *Vestnik Khar'kovskogo natsional'nogo agrarnogo universiteta. Ser. Biologiya [Bulletin of Kharkiv National Agricultural University. Biology Series]*. 2014. Iss. 2, no. 32. P. 6–22.

Kreslavskii V. D., Los' D. A., Allakhverdiev S. I., Kuznetsov V. V. Signal'naya rol' aktivnykh form kisloroda pri stresse u rastenii [Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress]. *Fiziologiya rastenii [Russian Journal of Plant Physiology]*. 2012. Vol. 59, no. 2. P. 163–178.

Lukatkin A. S. Kholodovoe povrezhdenie teplolyubivyykh rastenii i oksilitel'nyi stress [Chilling-induced injury to cold-sensitive plants and oxidative stress.]. Saransk: Mordovsk. un-t [Ogarev Mordovia State University]. 2002. 208 p.

Lukatkin A. S., Kashtanova N. N., Dukhovskis P. Vliyanie epibrassinolida na termoustoychivost' prorstkov kukuruzy [Effect of epibrassinolide on the thermal resistance of maize seedlings]. *Agrokhimiya [Agricultural Chemistry]*. 2013. No. 6. P. 24–31.

Lukatkin A. S., Kashtanova N. N. Vliyanie tidiazurona na termoustoychivost' rastenii kukuruzy [Effect of thidiazuron on the thermal resistance of maize plants]. *Trudy Karel'skogo nauchnogo tsentra RAN [Trans. of KarRC of RAS]*. No. 3. 2013. P. 129–135.

Maevskaya S. N., Nikolaeva M. K. Reaktsiya antioksidantnoi i osmoprotekturnoi sistem prorstkov pshe-nitsy na zasukhu i regidratatsiyu [Response of antioxidant and osmoprotective systems of wheat seedlings to drought and rehydration]. *Fiziologiya rastenii [Russian Journal of Plant Physiology]*. 2013. Vol. 60, no. 3. P. 351–359. doi: 10.7868/S0015330313030081

Merzlyak M. N. Aktivirovannyi kislorod i oksilitel'nye protsessy v membranakh rastitel'noi kletki [Activated oxygen and oxidation processes in plant cells membranes]. *Itogi nauki i tekhniki. Ser. Fiziologiya rastenii [Results in Science and Technology. Plant Physiology]*. 1989. Vol. 6. 167 p.

Popov V. N., Antipina O. V., Trunova T. I. Perekisnoe okislenie lipidov pri nizkotemperaturnoi adaptatsii list'ev i kornei teplolyubivyykh rastenii tabaka [Lipid peroxidation during low-temperature adaptation of cold-sensitive tobacco leaves and roots]. *Fiziologiya rastenii [Russian Journal of Plant Physiology]*. 2010. Vol. 57, no. 1. P. 153–156.

Pradedova E. V., Isheeva O. D., Salyaev R. K. Superoksidmutaza vakuolei kletok rastenii [Superoxide dismutase of plant cells vacuoles]. *Biol. Membrany [Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology]*. 2009. Vol. 26, no. 1. P. 21–30.

Pradedova E. V., Isheeva O. D., Salyaev R. K. Fermenty antioksidantnoi zashchity vakuolei kletok korneplodov stolovoi svekly [Antioxidant defense enzymes in cell vacuoles of red beet roots]. *Fiziologiya rastenii [Russian Journal of Plant Physiology]*. 2011. Vol. 58, no. 1. P. 40–48.

Radyukina N. L., Shashukova A. V., Shevyakova N. I., Kuznetsov V. V. Uchastie prolina v sisteme antioksidantnoi zashchity u shalfeya pri deistvii NaCl i parakvata [Proline involvement in the common sage antioxidant system in the presence of NaCl and paraquat]. *Fiziologiya rastenii [Russian Journal of Plant Physiology]*. 2008. Vol. 55. P. 721–730.

Radyukina N. L., Shashukova A. V., Makarova S. S., Kuznetsov V. V. Ekzogennyi prolin modifitsiruet differentsial'nyuyu ekspressiyu genov superoksidmutazy v rasteniyakh shalfeya pri UV-B obluchenii [Exogenous proline modifies the differential expression of superoxide dismutase genes in UV-B – irradiated *Salvia officinalis* plants]. *Fiziologiya rastenii [Russian Journal of Plant Physiology]*. 2011. Vol. 58, no. 1. P. 49–57.

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

Sin'kevich M. S., Naraikina N. V., Trunova T. I. Protsessy, prepyatstvuyushchie povysheniyu intensivnosti perekisnogo okisleniya lipidov u kholodostoykikh rastenii pri gipotermii [Processes hindering activation of lipid peroxidation in cold-tolerant plants under hypothermia]. *Fiziologiya rastenii [Russian Journal of Plant Physiology]*. 2011. Vol. 58, no. 6. P. 875–882.

Titov A. F., Akimova T. V., Talanova V. V., Topchieva L. V. Ustoichivost' rastenii v nachal'nyi period deistviya neblagopriyatnykh temperatur [Plant resistance at the initial period of adverse temperatures]. Moscow: Nauka, 2006. 143 p.

Titov A. F., Talanova V. V. Ustoichivost' rastenii i fitogormony [Plant resistance and phytohormones]. Petrozavodsk: KarRC of RAS, 2009. 206 p.

Sharkaeva E. Sh. Anatomicheskie i fiziologicheskie izmeneniya teplolyubivyykh rastenii pri razlichnoi intensivnosti okhlazhdeniya [Anatomical and physiological changes of cold-sensitive plants at different cooling rate]: Summary of PhD (Cand. of Biol.) thesis. Saransk, 2001. 20 p.

Sherudilo E. G., Sysoeva M. I., Ilyukha V. A. Reaktsiya antioksidantnoi sistemy ogurtsa na postoyannoe i kratkovremennoe periodicheskoe deistvie nizkoi temperatury [Response of a cucumber antioxidant system to constant and temporary low temperature]. *Trudy Karel'skogo nauchnogo tsentra RAN [Trans. of KarRC of RAS]*. 2013. No. 3. Ser. P. 166–172.

Shibaeva T. G., Sherudilo E. G., Ikkonen E. N., Titov A. F. Vliyaniye kratkovremennykh ezhesutochnyykh ponizhenii temperatury na aktivnost' antioksidantnykh fermentov [Effect of short-term daily temperature decrease on antioxidant enzymes activity]. *Trudy Karel'skogo nauchnogo tsentra RAN [Trans. of KarRC of RAS]*. 2015. No. 12. P. 107–115. doi: 10.17076/eb241

Abbas S. M. Effects of low temperature and selenium application on growth and the physiological changes in sorghum seedlings. *J. Stress Physiol. Biochem.* 2012. Vol. 8, no. 1. P. 268–286.

Bates L. S., Waldren R. P., Teare I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 1973. Vol. 39, no. 1. P. 205–207.

Beauchamp Ch., Fridovich I. Superoxide Dismutase improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1971. Vol. 44, no. 1. P. 276–287. doi: 10.1016/0003-2697(71)90370-8

Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* 2003. Vol. 91. P. 179–194. doi: 10.1093/aob/mcf118

Borowski E. Response to chilling in cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants treated with triacontanol and Asahi SL. *Acta Agrobot.* 2009. Vol. 62, no. 2. P. 165–172.

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.

Cao Y.-Y., Yang M.-T., Li X., Zhou Z.-Q., Wang X.-J., Bai J.-G. Exogenous sucrose increases chilling tolerance in cucumber seedlings by modulating antioxidant enzyme activity and regulating proline and soluble sugar contents. *Sci. Horti.* 2014. Vol. 179. P. 67–77.

Cui C., Zhou Q. Y., Zhang C. B., Wang L. J. and Tan Z. F. Effects of chilling stress on membrane lipid peroxidation and antioxidant system of *Nicotiana tabacum* L. seedling. *Afr. J. Agric. Res.* 2013. Vol. 8, no. 47. P. 6079–6085.

Dong C.-J., Li L., Shang Q.-M., Liu X.-Y., Zhang Z.-G. Endogenous salicylic acid accumulation is required for chilling tolerance in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. *Planta*. 2014. Vol. 240, no. 4. P. 687–700. doi: 10.1007/s00425-014-2115-1

Fariduddin Q., Yusuf M., Chalkoo S., Haya S., Ahmad A. 28-Homobrassinolide improves growth and photosynthesis in *Cucumis sativus* L. through an enhanced antioxidant system in the presence of chilling stress. *Photosynthetica*. 2011. Vol. 49, no. 1. P. 55–64. doi: 10.1007/s11099-011-0022-2

Feng Z., Guo A., Feng Z. Amelioration of chilling stress by triadimefon in cucumber seedlings. *Plant Growth Regul.* 2003. Vol. 39. P. 277–283.

Foyer C. H., Noctor G. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a reevaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.* 2005. Vol. 29. P. 1056–1071.

Gianinetti A., Cantoni M., Lorenzoni C., Salamini F., Marocco A. Changes in superoxide dismutase and catalase activities in response to low temperatures in tomato mutants. *J. Genet. Breeding*. 1993. Vol. 47, no. 4. P. 353–356.

Gupta N., Rathore M., Goyary D., Khare N., Anandhan S., Pande V., Ahmed Z. Marker-free transgenic cucumber expressing *Arabidopsis cbf1* gene confers chilling stress tolerance. *Biol. Plant*. 2012. Vol. 56, no. 1. P. 57–63.

Jahnke L. S., Hull M. R., Long S. P. Chilling stress and oxygen metabolizing enzymes in *Zea mays* and *Zea diploperennis*. *Plant Cell Environ.* 1991. Vol. 14, no. 1. P. 97–104.

Jouyban Z., Rohola H., Sharafi S. Chilling stress in plants. *Intl. J. Agri and Crop Sci.* 2013. Vol. 5, no. 24. P. 2961–2968.

Kuk Y. I., Shin J. S., Burgos N. R., Hwang T. E., Han O., Cho B. H., Jung S., Guh J. O. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. *Crop Sci.* 2003. Vol. 43, no. 6. P. 2109–2117.

Lukatkin A. S., Bashmakov D. I., Kipaikina N. V. Protective role of thidiazuron treatment on cucumber seedlings exposed to heavy metals and chilling. *J. Plant Physiol.* 2003. Vol. 50, no. 3. P. 346–348.

Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y., Neukermans J., Marquez-Garcia B., Queval G., Foyer C. H. Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ.* 2012. Vol. 35. P. 454–484.

Noctor G., Lelarge-Trouverie C., Mhamdi A. The metabolic of oxidative stress. *Phytochemistry*. 2015. Vol. 112. P. 33–53.

Prasad T. K. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *The Plant J.* 1996. Vol. 10, no. 6. P. 1017–1026.

Rejeb K. B., Abdelly C., Savoure A. How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiol. Biochem.* 2014. Vol. 80. P. 278–284.

Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 2009. Vol. 15, no. 2. P. 89–97.

Saltveit M. E. Chilling injury is reduced in cucumber and rice seedlings and in tomato pericarp discs by heat-shocks applied after chilling. *Postharvest Biol. Tec.* 2001. Vol. 21. P. 169–177.

Sayyari M. Improving chilling resistance of cucumber seedlings by salicylic acid. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 2012. Vol. 12, no. 2. P. 204–209.

Stewart R. R. C., Bewley J. D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol.* 1980. Vol. 65. P. 245–248.

Verbruggen N., Hermans C. Proline accumulation in plants: a review. *Amino acid*. 2008. Vol. 35. P. 753–759. doi: 10.1007/s00726-008-0061-6

Wang Y.-R., Liu H.-X., Li P., Zeng S.-X., Zhen L.-P., Guo J. The Effect of chilling stress on membrane-lipid peroxidation of photosynthetic apparatus in rice seedlings in the dark and light. *Acta Phytophysiol. Sinica*. 1986. Vol. 12, no. 3. P. 244–251.

Xu P.-L., Guo Y.-K., Bai J.-G., Shang L., Wang X.-J. Effect of long-term chilling on ultrastructure and

antioxidant activity in leaves of two cucumber cultivars under low light. *Physiol. Plant*. 2008. Vol. 132. P. 467–478. doi: 10.1111/j.1399-3054.2007.01036.x

Received July 01, 2016

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Игнатенко Анна Анатольевна

аспирант
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: angelina911@ya.ru
тел.: (8142) 762712

Репкина Наталья Сергеевна

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

Титов Александр Федорович

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

Таланова Вера Викторовна

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

CONTRIBUTORS:

Ignatenko, Anna

Institute of Biology, Karelian Research Centre
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: angelina911@ya.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

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

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 581.143.32:577.152.1

КАТАЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В ЛИСТОВОМ АППАРАТЕ У СЕЯНЦЕВ БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ РАЗНЫХ ФОРМ (*BETULA PENDULA* ROTH): VAR. *PENDULA* И VAR. *CARELICA* (MERCKLIN)

**К. М. Никерова, Н. А. Галибина, Ю. Л. Мощенская,
Л. Л. Новицкая, М. Н. Подгорная, И. Н. Софронова**

Институт леса Карельского научного центра РАН

Впервые проведено исследование каталазной активности в листовом аппарате 10-месячных сеянцев обычной березы повислой (*Betula pendula* Roth var. *pendula*) и карельской березы (*B. pendula* var. *carelica* (Mercklin)). Адаптирована методика определения активности каталазы спектрофотометрическим методом для изучаемых объектов. Приведены графики зависимости наблюдаемой оптической плотности от концентрации субстрата (перекиси водорода) и активности фермента от времени протекания реакции. Подобраны условия (время, концентрация субстрата) для определения активности фермента и модифицирована формула для расчета активности каталазы. Протекание реакции каталазного окисления наблюдали на разных фазах развития листа, которые отличались по морфометрическим показателям. Так, листья длиной 1–2 см были отнесены к I фазе, 3–4 см – ко II фазе, 5–6 см – к III фазе, 7–8 см – к IV фазе. Показана динамика изменения активности каталазы отдельно для каждой изучаемой формы (var. *pendula* и var. *carelica* соответственно), а также проведено сравнение активности фермента у разных форм. Установлено, что активность каталазы значительно была выше у сеянцев обычной березы повислой, по сравнению с карельской березой, на всех изучаемых стадиях. У обеих форм активность каталазы возрастала по мере увеличения длины листа. Таким образом, полученные результаты дают основания для обсуждения роли листа как тест-объекта для обнаружения аномалий в строении древесины у разных форм березы повислой уже на ранних этапах онтогенеза.

Ключевые слова: карельская береза; узорчатая древесина; сеянцы; лист; каталаза.

**K. M. Nikerova, N. A. Galibina, Yu. L. Moshchenskaya, L. L. Novitskaya,
M. N. Podgornaya, I. N. Sofronova. CATALASE ACTIVITY IN LEAVES OF
SILVER BIRCH SEEDLINGS OF DIFFERENT FORMS (*BETULA PENDULA*
ROTH): VAR. *PENDULA* AND VAR. *CARELICA* (MERCKLIN)**

In this work we studied catalase activity in the leaves of 10-months seedlings of *Betula pendula* Roth var. *pendula* and *Betula pendula* var. *carelica* (Mercklin). This kind of study was carried out for the first time. We have adapted the spectrophotometric method for the determination of catalase activity for the studied objects. We show how optical density depended on the concentration of the substrate (hydrogen peroxide) and how the enzyme activity depended on the reaction time. We selected the conditions (time, substrate concentration) for the determination of the enzyme activity and modified the formula for catalase activity calculations. The catalase oxidation reaction was observed at different

phases of leaf development, which differed one from another in morphometric indices. The division into phases was as follows: leaves 1–2 cm long – phase I, 3–4 cm long – phase II, 5–6 cm long – phase III, 7–8 cm long – phase IV. Information is provided on the dynamics of catalase activity changes for each of the studied birch forms (*var. pendula* and *var. carelica*, respectively), as well as in comparison. It was found that catalase activity was significantly higher in *var. pendula* seedlings than in *var. carelica* seedlings at all the studied phases. Both forms displayed an increase in catalase activity with increasing leaf length. Thus, the obtained differences have given us the reason to discuss the role of leaves as the test object for detection of anomalies in the wood structure of different birch forms at early stages of ontogeny.

К е y w o r d s: *Betula pendula var. carelica*; figured wood; seedlings; leaves; catalase.

Введение

Для нормальной жизнедеятельности растениям необходимы свет и кислород, без которых невозможно интенсивное протекание процессов дыхания и фотосинтеза. В основе этих процессов лежит огромное количество метаболических реакций, продуктами которых являются активные формы кислорода (АФК). В оптимальных условиях АФК продуцируются на низком уровне главным образом в хлоропластах, митохондриях и пероксисомах. В условиях стресса их образование может резко увеличиться и ингибировать защитные системы организма [Desikan et al., 2001]. Размер пула АФК зависит от относительных скоростей их образования и деструкции, а также от времени жизни. Антиоксидантные ферменты – супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы и другие, наряду с низкомолекулярными антиоксидантами, участвуют в регуляции уровня АФК [Полесская и др., 2004; Apel et al., 2004; Колупаев и др., 2015]. К тому же изменения активности антиоксидантных ферментов опосредованно отражают баланс метаболических процессов в онтогенезе растений, и поэтому им отводится особая роль в растительном организме [Половникова, Воскресенская, 2008].

В Институте леса КарНЦ РАН многие годы проводится изучение карельской березы – древесного растения с ярко выраженными структурными аномалиями. Внешне структурные аномалии представлены наличием узорчатой древесины, что делает карельскую березу интересным объектом для изучения и обуславливает ее высокую декоративную ценность. Одной из причин формирования аномалий является повышенный уровень сахарозы во флоэме в период активной камбиальной деятельности растений. Утилизация сахарозы происходит за счет ферментов ее метаболизации – сахарозосинтазы и инвертазы, причем растения *Betula pendula* Roth *var. pendula* без признаков узорчатости и растения *Betula pendula* Roth *var. carelica*, отличающиеся узорчатой древесиной,

имеют разнонаправленные ферментативные модели расщепления сахарозы. Разгрузка сахарозы у *var. pendula* связана с высокой активностью сахарозосинтазы в ксилеме, а у *var. carelica* – с высокой активностью апопластной инвертазы во флоэме [Галибина и др., 2016б].

Уровень выраженности признака узорчатости может быть неодинаков у разных растений карельской березы, ввиду высокого уровня эндогенной изменчивости. Кроме того, у карельской березы при любом варианте скрещивания родительских форм в потомстве появляются особи как с узорчатой, так и с безузорчатой текстурой древесины [Новицкая, 2008]. Поэтому диагностика этого признака, особенно на ранних этапах онтогенеза, имеет особое значение.

В наших предыдущих исследованиях показано, что в период активного камбиального роста в тканях ствола у взрослых растений с узорчатой древесиной (*B. pendula var. carelica*) активность пероксидазы (ЕС 1.11.1.7) выше, чем у растений без признаков узорчатости (*B. pendula var. pendula*) [Галибина и др., 2013, 2016а]. Высокая активность пероксидазы у *B. pendula var. carelica* коррелирует с высокой активностью апопластной инвертазы. Сахароза в акцепторных тканях у карельской березы метаболизируется преимущественно по инвертазному пути, в результате которого образуются глюкоза и фруктоза [Галибина и др., 2016б]. Утилизация избытка гексоз происходит за счет реакций цикла Кребса и пентозофосфатного пути. При этом продуцируются АФК за счет деятельности ферментов дегидрогеназ и оксигеназ [Донцов и др., 2006; Couée et al., 2006; Wellen, Thompson, 2010], и синтезируются вещества фенольной природы. Фенолы могут стать субстратами пероксидазного окисления и привести к возрастанию пероксидазной активности во флоэме, в результате чего организм избавляется от вредного воздействия АФК [Андреев, 2001; Jansen et al., 2001; Rizhsky et al., 2002; Duroux, Welinder, 2003; Agati et al., 2012]. Кроме того, и сама глюкоза может вступать в реакции

с АФК, образуя субстраты пероксидазного окисления [Синькевич и др., 2009]. Эти сведения, а также полученные в нашей лаборатории экспериментальные данные позволяют использовать пероксидазную активность в ксилеме березы для экспресс-диагностики степени узорчатости древесины [Галибина и др., 2016а].

Поиск критериев (или тест-признаков), позволяющих отличить карельскую березу от других форм уже на ранних этапах онтогенеза, когда еще нет видимых признаков аномалий, относится к числу перспективных задач, требующих решения. Мы считаем возможным к такого рода критериям отнести изменения активности ферментов антиоксидантной системы, в частности, пероксидазы. В наших работах показано, что отличия по пероксидазной активности выявлены не только при изучении тканей ствола, но также и в листовом аппарате березы обычной и карельской [Никерова, Галибина, 2016, в печати]. Так, пероксидазная активность в листьях *var. pendula* была выше, чем в листьях у *var. carelica* [Галибина и др., 2013; Никерова, Галибина, в печати], что связано с усилением акцепторных свойств камбиальной зоны. С другой стороны, первым ферментом, принимающим участие в утилизации АФК, а особенно H_2O_2 , которая накапливается в процессе дыхания, является каталаза (ЕС 1.11.1.6). Однако исследования каталазной активности в листьях карельской березы, насколько нам известно, ранее не проводились. Мы предполагаем, что лист может стать удобным тест-материалом для ранней идентификации узорчатости древесины, а в качестве тестируемого признака предлагаем изучать активность каталазы.

В связи с вышесказанным целью данной работы стало исследование каталазной активности у 10-месячных сеянцев обычной березы повислой и карельской березы на разных стадиях развития листа.

Объекты и методы исследования

Объекты исследования – 10-месячные сеянцы обычной березы повислой (*Betula pendula* Roth *var. pendula*) и карельской березы (*B. pendula* Roth *var. carelica* (Mercklin)). Сеянцы карельской березы были получены из семян от контролируемого опыления деревьев с ярко выраженными признаками узорчатости (Forelia OY, Финляндия). Сеянцы выращивали в светоустановке при температуре воздуха 21–22 °С, освещенности около 5 клк и 16-часовом светопериоде.

Все исследуемые листья находились во внепочечном периоде развития, когда лист имеет

форму, характерную для взрослого, но обладает разными размерами. Поэтому для анализа отбирали листья, обладающие наибольшей длиной, которая составила 7–8 см. Эти листья были отнесены к IV фазе развития. Остальные фазы выделяли в процентах от длины наибольшего листа (75, 50 и 25 % соответственно). Так, листья, длина которых составила 5–6 см, были отнесены к III фазе развития, листья длиной 3–4 см – ко II фазе, 1–2 см – к I фазе. Навески составили 0,3–0,4 г. Для листьев IV фазы (масса листа 0,27–0,5 г) использовали 1 лист, для листьев III фазы (масса листа 0,13–0,25 г) – 1–2 листа, для листьев I и II фаз (ввиду их малого веса – 0,025–0,1 г) для анализа отбирали 2–5 листьев, взятых с разных растений.

Растительный материал растирали с жидким азотом и гомогенизировали в среде следующего состава: 50 мМ К, Na-фосфатный буфер (рН 7,8), 0,5 мМ ЭДТА; соотношение ткань : буфер – 1 : 10. После 20-минутной экстракции при 4 °С гомогенат дважды центрифугировали при 10 000 g в течение 15 минут (центрифуга Sigma 2-16PK, Германия).

Активность каталазы в супернатанте определяли на спектрофотометре (СФ 2000, Россия) по ферментативному разложению перекиси водорода при 240 нм [Beers, Sizer, 1952]. Инкубационная среда содержала 67 мМ К, Na-фосфатный буфер (рН 7,8) и 14,7 мМ перекись водорода. Активность каталазы выражали в мкмоль перекиси водорода на мг белка, восстановленной за 4 мин (мкмоль H_2O_2 /мг белка). Содержание белка определяли по методу Бредфорда [Bradford, 1976].

Статистическая обработка данных осуществлялась в среде Microsoft Excel. Для определения активности фермента на каждой фазе развития листа проводили по 5–7 независимых опытов. На диаграммах приведены средние значения и их стандартные ошибки ($n \geq 5$). Для оценки достоверности различий использовали t-критерий Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Данные были получены на оборудовании ЦКП «Аналитическая лаборатория» ИЛ КарНЦ РАН.

Результаты

Подбор условий для определения активности каталазы

При подборе условий для определения активности каталазы необходимо учитывать ее чрезвычайную активность [Чеснокова и др., 2006; Mhamdi et al., 2010], которая в начале

реакции может возрастать за доли секунды. Концентрации H_2O_2 , с которыми работает каталаза, во много раз превышают концентрации, нейтрализующиеся пероксидазами [Загоскина, Назаренко, 2016]. Таким образом, при незначительном скачке во времени реакции активность изменяется значительно, поэтому так важно достичь времени выхода фермента в более стабильную фазу. Об активности каталазы мы судили по интенсивности уменьшения оптической плотности в области поглощения перекиси водорода ($\lambda = 240$ нм). Для этого был построен калибровочный график в диапазоне изучаемых концентраций H_2O_2 , который показывает зависимость оптической плотности от концентрации субстрата (рис. 1).

На рисунке 2 приведена зависимость активности каталазы от времени реакции. Измерения были проведены на одном из опытных образцов. Линейная зависимость активности каталазы от времени реакции наблюдалась в диапазоне 3–6 мин (рис. 2), поэтому для реакции каталазного окисления было выбрано время 4 мин.

Для изучаемых объектов была адаптирована следующая схема определения каталазной активности. В качестве контрольного варианта использовали 1,9 мл фосфатного буфера; в качестве опытного варианта использовали 0,9 мл фосфатного буфера с добавлением 1 мл перекиси. Измеряли оптические плотности контрольного и опытного образцов (D_1 и D_2 соответственно в формуле для расчета активности каталазы) при 240 нм относительно холостой кюветы, содержащей фосфатный буфер. Затем добавляли в контрольный и опытный образцы по 100 мкл супернатанта и вновь измеряли значения оптических плотностей (D_3 и D_4 соответственно в формуле для расчета активности каталазы).

Для нахождения активности каталазы (A) использовали формулу:

$$A = \frac{20 * (((D_2 - D_1) - (D_4 - D_3)) * 1000 * V)}{(45,4 * m)}$$

где D – оптическая плотность при длине волны 240 нм; 45,4 – калибровочный коэффициент перекиси водорода, $M^{-1} \text{ см}^{-1}$; V – объем супернатанта, мл; m – масса растительной ткани, взятой для анализа, г; 20 – коэффициент, показывающий разведение супернатанта.

Анализ активности каталазы в листьях сеянцев обычной и карельской березы

В результате проведенных опытов установлено, что у обеих изучаемых форм березы каталазная активность в листьях возрастала при

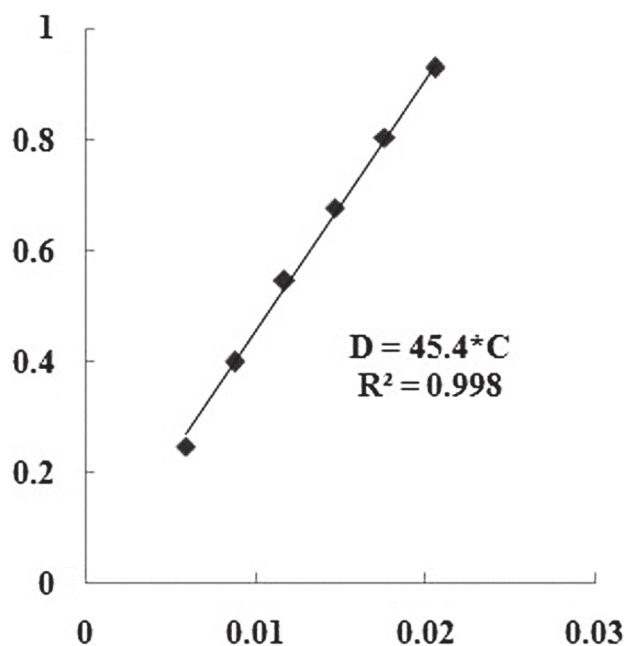


Рис. 1. Зависимость оптической плотности от концентрации перекиси (по оси абсцисс – концентрация перекиси водорода в моль/л, по оси ординат – оптическая плотность в единицах оптической плотности). На графике приведены уравнение зависимости оптической плотности (D) от концентрации перекиси водорода (C) и значение коэффициента аппроксимации (R^2)

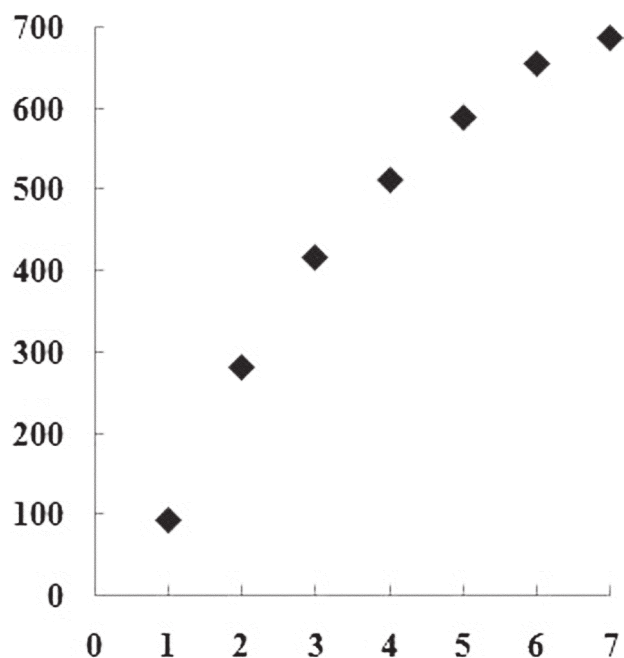


Рис. 2. Зависимость активности каталазы (количество восстановленной перекиси) от времени (по оси абсцисс – время в минутах, по оси ординат – каталазная активность в мкмоль восстановленной перекиси/г сырой ткани)

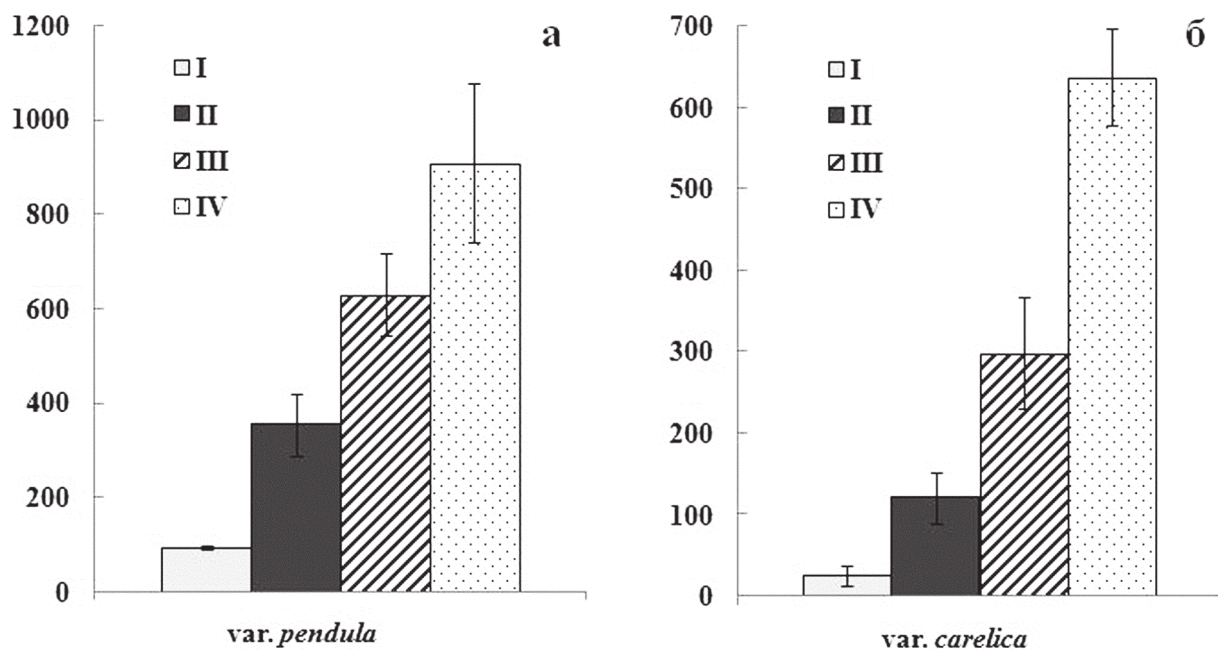


Рис. 3. Активность каталазы ($\mu\text{моль H}_2\text{O}_2/\text{мг белка}$) в листьях, отличающихся стадией развития (I–IV), у 10-месячных сеянцев *B. pendula* var. *pendula* (а) и *B. pendula* var. *carelica* (б):

I фаза – лист 1–2 см, II фаза – лист 3–4 см, III фаза – лист 5–6 см, IV фаза – лист 7–8 см

переходе их от I к IV фазе развития, то есть с увеличением длины листовой пластинки. У *var. pendula* она изменялась в диапазоне от 93 до 909, а у *var. carelica* – от 26 до 638 $\mu\text{моль H}_2\text{O}_2/\text{мг белка}$ (рис. 3). В частности, у обычной березы при переходе листа из первой фазы во вторую активность каталазы возрастала в 3,8 раза; между II и III фазами она увеличивалась в 1,8 раза, а между III и IV фазами – еще в 1,4 раза (рис. 3, а).

У сеянцев карельской березы активность каталазы в листьях II фазы развития была в 4,7 раза выше, чем в листьях I фазы; в листьях III фазы – в 2,5 раза выше, чем в листьях II фазы; а в листьях с наибольшей длиной – в 2,1 раза выше, чем в листьях III фазы (рис. 3, б).

Сравнительный анализ полученных результатов позволил установить, что активность каталазы в листьях обычной березы на всех фазах развития была выше, чем у сеянцев карельской березы. При этом увеличение каталазной активности от молодого к зрелому листу у карельской березы происходило более динамично. В частности, активность фермента в листьях длиной 1–2 см, по сравнению с листьями длиной 7–8 см, у карельской березы была ниже в 24,5 раза, а у обычной березы – всего в 9,8 раза. При увеличении размеров листа отмеченная разница между обычной и карельской березой снижалась. Так, на первой фазе активность каталазы у сеянцев *var. pendula* была выше, чем у сеянцев *var. carelica*,

в 3,6 раза, на второй фазе – в 2,9 раза, на третьей фазе – в 2,1 раза, а на четвертой фазе – всего в 1,4 раза.

Отдельно отметим результаты визуального анализа растений. Сеянцы карельской березы были более облиственны, чем сеянцы обычной березы повислой. Кроме того, у карельской березы листовой аппарат был равномерно представлен листьями всех изучаемых фаз развития, а у обычной березы молодые листья (II и особенно I фаз) встречались единично и возобновление листового аппарата происходило не так интенсивно.

Обсуждение

Известно, что у многих растений активность антиоксидантных ферментов возрастает от молодого листа к зрелому [Prochazkova et al., 2001], что связано с увеличением уровня дыхания и затрат энергии на метаболизм [Sairam et al., 2003; Мазей и др., 2009]. В процессах, происходящих в клетках и тканях сеянцев, то есть на ранних этапах онтогенеза, особенно важна роль каталазы [Willekens et al., 1995]. Высокие показатели активности этого фермента наблюдали именно в молодых жизнеспособных органах и тканях растений [Карасев и др., 2015]. В результате нашего исследования установлено, что у сеянцев обычной и карельской березы возрастание активности каталазы коррелировало с увеличением длины листа

(рис. 3). С одной стороны, это может свидетельствовать об интенсификации процессов дыхания и фотосинтеза, а с другой стороны, логично связано с накоплением активных форм кислорода, содержание которых увеличивается по мере старения листа.

Определение каталазной активности в листовом аппарате имеет особое значение с точки зрения функционирования листа в целостной системе донорно-акцепторных отношений. Акцепторные зоны (зоны роста или запасаения), в нашем случае это формирующиеся ствольные ткани, получают ассимиляты, которые образовались в листе в ходе фотосинтеза и дыхания [Шелякин и др., 2016]. Тот факт, что разница в активности каталазы между I и IV фазами развития листа у сеянцев карельской березы значительно превышает таковую у сеянцев обычной березы, может свидетельствовать о более интенсивном протекании у нее метаболических процессов в связи с донорной функцией листа. Визуально изученные сеянцы карельской березы имели больше листьев, особенно молодых, по сравнению с сеянцами обычной березы повислой. К тому же онтогенез листа у карельской березы протекал быстрее, чем у обычной формы. Подобные отличия в развитии листового аппарата были выявлены на примере взрослых деревьев. В проведенных ранее исследованиях показано, что взрослые растения карельской березы отличались по общему количеству листьев (особенно брахибластов и их площади) и по суммарной ассимилирующей поверхности в большую сторону по сравнению с растениями обычной березы [Николаева, Новицкая, 2007], в связи с чем, вероятно, лучше снабжали ствольные ткани ассимилятами. У 8-летних растений карельской березы было выше суммарное содержание фотосинтетических пигментов и их количество в светособирающем комплексе по сравнению с обычной березой [Галибина и др., 2013]. Такая же тенденция наблюдалась на ранних этапах онтогенеза (неопубликованные данные). Особенности формирования фотосинтетического аппарата у исследованных видов обеспечивают интенсивный приток фотоассимилятов, особенно сахарозы, в ткани ствола, что может приводить к нарушению камбиальной деятельности и развитию структурных аномалий. Так, во флоэме 2-летних сеянцев карельской березы по сравнению с обычной березой содержание сахарозы было выше [Галибина и др., 2014]. У сеянцев обычной и карельской березы в возрасте нескольких месяцев в стебле выявлены отличия в распределении активности сахарозосинтазы и инвертазы, главных ферментов утилизации сахарозы

[Мощенская, Галибина, 2016]. Как показали наши опыты, обычная и карельская формы березы на начальных стадиях онтогенеза различаются и по активности каталазы в листьях. Мы предполагаем, что выявленные закономерности могут составить основу для ферментативной идентификации признака узорчатости ствола березы в самом начале ее развития.

Заключение

Таким образом, нами впервые была определена каталазная активность в листьях у 10-месячных сеянцев двух форм березы повислой (обычной и карельской), морфологически не отличающихся между собой. Как показали результаты данного и предыдущих исследований, различный метаболический статус изучаемых растений складывается на самых ранних этапах онтогенеза, и это выражается в различных значениях биохимических показателей и разнонаправленности метаболических стратегий. Изменения активности каталазы, как важного фермента, участвующего в формировании донорно-акцепторных отношений между листовым аппаратом и тканями ствола, также отражают различный метаболический статус растений березы повислой двух форм – обычной и карельской. Полученные результаты дают основание рассматривать лист как орган первичной диагностики для выявления предрасположенности к возникновению узорчатой структуры древесины березы карельской уже в самом раннем возрасте.

Исследование выполнено при финансовой поддержке из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (тема № 0220-2014-0001) и гранта РФФИ № 16-04-100639_p_a.

Литература

Андреев И. М. Функции вакуоли в клетках высших растений // Физиология растений. 2001. Т. 48, № 5. С. 777–778.

Галибина Н. А., Мошкина Е. В., Никерова К. М. и др. Активность пероксидазы как индикатор степени узорчатости древесины карельской березы // Лесоведение. 2016а. № 4. С. 294–304.

Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Никерова К. М. Избыток экзогенных нитратов подавляет формирование аномальной древесины у карельской березы // Онтогенез. 2016б. Т. 47, № 2. С. 83–91. doi: 10.7868/S047514501602004X

Галибина Н. А., Теребова Е. Н., Новицкая Л. Л., Софронова И. Н. Динамика неструктурных углеводов в органах и тканях двухлетних сеянцев *Betula*

pendula и *Betula pubescence* в период вегетации // Труды КарНЦ РАН. 2014. № 5. С. 108–116.

Галибина Н. А., Целищева Ю. Л., Андреев В. П. и др. Активность пероксидазы в органах и тканях деревьев березы повислой // Ученые записки ПетрГУ. Серия Естественные и технические науки. 2013. Т. 133, № 4. С. 7–13.

Донцов В. И., Крутько В. Н., Мрикаев Б. М., Уханов С. В. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении // Труды ИСА РАН. 2006. Т. 19. С. 50–69.

Загоскина Н. В., Назаренко Л. В. Активные формы кислорода и антиоксидантная система растений // Вестник Московского городского педагогического университета. Серия Естественные науки. 2016. № 2 (22). С. 9–23.

Карасев В. Н., Карасева М. А., Серебрякова Н. Е., Абрамова Д. А. Активность каталазы как показатель жизненного состояния древесных растений в городских условиях // Актуальные проблемы лесного комплекса. 2015. № 43. С. 88–90.

Колупаев Ю. Е., Рябчун Н. И., Вайнер А. А. и др. Активность антиоксидантных ферментов и содержание осмолитов в проростках озимых злаков при закаливании и криострессе // Физиология растений. 2015. Т. 62, № 4. С. 533–541. doi: 10.7868/S0015330315030112

Мазей Н. Г., Шиленков А. В., Вяль Ю. А. Влияние низких температур на дыхание прорастающих семян гречихи // Известия Пензенского государственного педагогического университета им. В. Г. Белинского. 2009. № 18. С. 36–38.

Мощенская Ю. Л., Галибина Н. А. Активность ферментов диссимиляции сахарозы в раннем онтогенезе разных форм березы повислой // Годичное собрание общества физиологов растений России. Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма: тезисы докл. Всерос. конф. (Санкт-Петербург, 21–24 июня 2016 г.). СПб., 2016. С. 64–65.

Никерова К. М., Галибина Н. А. Донорно-акцепторные отношения листового аппарата и тканей ствола у разных форм березы повислой (*Betula pendula* Roth): var. *pendula* и var. *carelica* (Mercklin) // Годичное собрание общества физиологов растений России. Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма: тезисы докл. Всерос. конф. (Санкт-Петербург, 21–24 июня 2016 г.). СПб., 2016. С. 241–242.

Никерова К. М., Галибина Н. А. Влияние нитратного азота на пероксидазную активность в тканях *Betula pendula* Roth var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* (Mercklin) // Сибирский лесной журнал (в печати).

Николаева Н. Н., Новицкая Л. Л. Структурные особенности ассимиляционного аппарата и формирование аномальной древесины карельской березы // Лесоведение. 2007. № 1. С. 70–73.

Новицкая Л. Л. Карельская береза: механизмы роста и развития структурных аномалий. Петрозаводск: Verso, 2008. 144 с.

Полесская О. Г., Каширина Е. И., Алехина Н. Д. Изменение активности антиоксидантных ферментов

в листьях и корнях пшеницы в зависимости от формы и дозы азота в среде // Физиология растений. 2004. Т. 51, № 5. С. 686–691.

Половникова М. Г., Воскресенская О. Л. Активность компонентов антиоксидантной защиты и полифенолоксидазы у газонных растений в онтогенезе в условиях городской среды // Физиология растений. 2008. Т. 55, № 5. С. 777–785.

Синькевич М. С., Дерябин А. Н., Трунова Т. И. Особенности окислительного стресса у растений картофеля с измененным углеводным метаболизмом // Физиология растений. 2005. Т. 56, № 2. С. 186–192.

Чеснокова Н. П., Понукалина Е. В., Бизенкова М. Н. Общая характеристика источников образования свободных радикалов и антиоксидантных систем // Успехи современного естествознания. 2006. № 7. С. 37–41.

Шелякин М. А., Захожий И. Г., Головкин Т. К. Онтогенетические аспекты дыхания растений (на примере *Rubus chamaemorus* L.) // Физиология растений. 2016. Т. 63, № 1. С. 98–107. doi: 10.7868/S0015330316010164

Agati G., Azzarello E., Pollastri S., Tattini M. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance // Plant Sci. 2012. Vol. 196. P. 67–76. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.07.014

Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction // Annu. Rev. Plant Biol. 2004. Vol. 55. P. 373–399. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701

Beers R. F. Jr., Sizer I. W. A spectrometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase // J. Biol. Chem. 1952. Vol. 195. P. 133–140.

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72, no. 1–2. P. 248–254.

Couée I., Sulmon C., Gouesbet G., El Amrani A. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants // J. Exp. Bot. 2006. Vol. 57, no. 3. P. 449–459. doi: 10.1093/jxb/erj027

Desikan R., Mackerness S. A.-H., Hancock J. T., Neill S. J. Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress // Plant Physiol. 2001. Vol. 127, no. 1. P. 159–172. doi: 10.1104/pp.127.1.159

Duroux L., Welinder K. G. The peroxidase gene family in plants: a phylogenetic overview // J. Mol. Evol. 2003. Vol. 57, no. 4. P. 397–407. doi: 10.1007/s00239-003-2489-3

Jansen M. A. K., Van den Noort R. E., Tan M. Y. et al. Phenol-oxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress // Plant Physiol. 2001. Vol. 126, no. 3. P. 1012–1023. doi: 10.1104/pp.126.3.1012

Mhamdi A., Queval G., Chaouch S. et al. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models // J. Exp. Bot. 2010. Vol. 61, no. 15. P. 4197–4220. doi: 10.1093/jxb/erq282

Prochazkova D., Sairam R. K., Srivastava G. C., Singh D. V. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves // Plant Sci.

2001. Vol. 161, no. 4. P. 765–771. doi: 10.1016/S0168-9452(01)00462-9

Rizhsky L., Hallak-Herr E., Van Breusegem F. et al. Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase // *Plant J.* 2002. Vol. 32, no. 3. P. 329–342. doi: 10.1046/j.1365-313X.2002.01427.x

Sairam R. K., Singh D. V., Srivastava G. C. Changes in activity of activity of antioxidant enzymes in sunflower leaves of different ages // *Biol. Plant.* 2003. Vol. 47, no. 1. P. 61–66. doi: 10.1023/A:1027328814591

Wellen K. E., Thompson C. B. Cellular metabolic stress: Considering how cells respond to nutrient excess // *Mol. Cell.* 2010. Vol. 40, no. 2. P. 323–332. doi: 10.1016/j.molcel.2010.10.004

Willekens H., Inzé D., Van Montagu M., Van Camp W. Catalases in plants // *Molecular Breeding.* 1995. Vol. 1, no. 3. P. 207–228. doi: 10.1007/BF02277422

Поступила в редакцию 02.08.2016

References

Andreev I. M. Functions of the vacuole in higher plant cells. *Russ. J. Plant Physiol.* 2001. Vol. 48, no. 5. P. 777–778. doi: 10.1023/A:1016776523371

Chesnokova N. P., Ponukalina E. V., Bizenkova M. N. Obschaya karakteristika istochnikov obrazovaniya svobodnykh radikalov i antioksidantnykh sistem [General characteristic of the sources of free radical formation and antioxidant systems]. *Uspehi sovremennogo estestvoznaniya [Advances in Current Natural Sciences]*, 2006. No. 7. P. 37–41.

Dontsov V. I., Krutko V. N., Mrikaev B. M., Uhanov S. V. Aktivnyie formy kisloroda kak sistema: znachenie v fiziologii, patologii i estestvennom starenii [Reactive oxygen species as a system: role in physiology, pathology and natural ageing]. *Trudy Instituta sistemnogo analiza Rossiyskoy akademii nauk [Proceedings of the Institute for Systems Analysis of Russian Academy of Sciences (ISA RAS)]*, 2006. Vol. 19. P. 50–69.

Galibina N. A., Moshkina E. V., Nikerova K. M., Moshchenskaya Yu. L., Znamenskii S. R. Aktivnost' peroksidazy kak indikator stepeni uzorchatosti drevesiny karelskoy berezy [Peroxydase activity as a degree indicator of the Karelian birch veining]. *Lesovedenie [Russian Journal of Forest Science]*, 2016a. No. 4. P. 294–304.

Galibina N. A., Novitskaya L. L., Nikerova K. M. Excess of exogenous nitrates inhibits formation of abnormal wood in the Karelian birch. *Russ. J. Dev. Biol.* 2016b. Vol. 47, no. 2. P. 69–76. doi: 10.1134/S106236041602003X

Galibina N. A., Tselishcheva Yu. L., Andreev V. P., Sofronova I. N., Nikerova K. M. Aktivnost' peroksidazy v organah i tkanyah derev'ev berezy povisloy [Peroxydase activity in the organs and tissues of silver birch trees]. *Uchenyie zapiski PetrGU. Seriya Estestvennyie i tehnikeskie nauki [Proceedings of Petrozavodsk State University. Natural and Engineering Sciences]*, 2013. Vol. 133, no. 4. P. 7–13.

Galibina N. A., Terebova E. N., Novitskaya L. L., Sofronova I. N. Dinamika nestrukturnykh uglevodov v organah i tkanyah dvuhletnih seyantsev *Betula pendula* i *Betula pubescence* v period vegetatsii [Nonstructural carbohydrates dynamics in the organs and tissues of two-year-old seedlings of *Betula pendula* and *Betula pubescence* during the growing season]. *Trudy KarNTs RAN [Trans. of KarRC of RAS]*, 2014. No. 5. P. 108–116.

Karasev V. N., Karaseva M. A., Serebryakova N. E., Abramova D. A. Aktivnost' katalazy kak pokazatel'

zhiznennogo sostoyaniya drevesnykh rasteniy v gorodskikh usloviyakh [Catalase activity as an indicator of the vital state of woody plants in urban environments]. *Aktualnyie problemy lesnogo kompleksa [Current Problems of Timber Complex]*, 2015. No. 43. P. 88–90.

Kolupaev Y. E., Vayner A. A., Yastreba T. O., Oboznyi A. I., Ryabchun N. I. Antioxidant enzyme activity and osmolyte content in winter cereal seedlings under hardening and cryostress. *Russ. J. Plant Physiol.* 2015. Vol. 62, no. 4. P. 499–506. doi: 10.1134/S1021443715030115

Mazei N. G., Shilenkov A. V., Vy'ala Yu. A. Vliyanie nizkikh temperatur na dyhanie prorashtayuschih semyan grechihii [Impact of lower temperatures on the respiration of germinating buckwheat seeds]. *Izvestiya Penzenskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta im. V. G. Belinskogo [Proceedings of Penza State Pedagogical University named after V. G. Belinsky]*, 2009. No. 18. P. 36–38.

Moshchenskaya Yu. L., Galibina N. A. Aktivnost' fermentov dissimilyatsii saharozy v rannem ontogeneze raznykh form berezy povisloy [Activity of sucrose dissimilating enzymes in early ontogenesis of different silver birches forms]. *Godichnoe sobranie obshchestva fiziologov rasteniy Rossii. Signalnyie sistemy rasteniy: ot retseptora do otvetnoy reaktsii organizma: tezisy dokl. Vseros. konf. (Sankt-Peterburg, 21–24 iyunya 2016 g.) [Annual Meeting of Russian Society of Plant Physiologists. Signaling System of Plants: from the Receptor to the Response of the Organism: Abstracts of All-Russian Conference (Saint-Petersburg, June 21–24, 2016)]*, St. Petersburg, 2016. P. 64–65.

Nikerova K. M., Galibina N. A. Donorno-aktseptornyye otnosheniya listovogo apparata i tkaney stvola u raznykh form berezy povisloy (*Betula pendula* Roth): var. *pendula* i var. *carelica* (Mercklin) [Donor-acceptor interactions of leaves and trunk tissues in different forms of silver birches (*Betula pendula* Roth): var. *pendula* and var. *carelica* (Mercklin)]. *Godichnoe sobranie obshchestva fiziologov rasteniy Rossii. Signalnyie sistemy rasteniy: ot retseptora do otvetnoy reaktsii organizma: tezisy dokl. Vseros. konf. (Sankt-Peterburg, 21–24 iyunya 2016 g.) [Annual Meeting of Russian Society of Plant Physiologists. Signaling System of Plants: from the Receptor to the Response of the Organism: Abstracts of All-Russian Conference (Saint-Petersburg, June 21–24, 2016)]*, St. Petersburg, 2016. P. 241–242.

Nikerova K. M., Galibina N. A. Vliyanie nitratnogo azota na peroksidaznuyu aktivnost' v tkanyah *Betula pendula* Roth var. *pendula* i *B. pendula* var. *carelica* (Mercklin) [Influence of nitrate nitrogen on peroxidase activity in the tissues of *Betula pendula*: var. *pendula* and *B. pendula* var. *carelica* (Mercklin)]. *Sibirskiy lesnoy zhurnal* [Siberian Journal of Forest Science] (appear).

Nikolaeva N. N., Novitskaya L. L. Strukturnyye osobennosti assimilyatsionnogo apparata i formirovaniye anomalnoy drevesiny karelskoj berezy [Structural peculiarities of the assimilatory apparatus and formation of anomalous wood in the Karelian birch]. *Lesovedenie* [Russian Journal of Forest Science]. 2007. No. 1. P. 70–73.

Novitskaya L. L. Karelskaya bereza: mekhanizmy rosta i razvitiya strukturnykh anomalii [The Karelian birch: mechanisms of growth and development of structural abnormalities]. Petrozavodsk: Verso, 2008. 144 p.

Polesskaya O. G., Kashirina E. I., Alekhina N. D. Changes in the activity of antioxidant enzymes in wheat leaves and roots as a function of nitrogen source and supply. *Russ. J. Plant Physiol.* 2004. Vol. 51, no. 5. P. 615–620. doi: 10.1023/B:RUPP.0000040746.66725.77

Polovnikova M. G., Voskresenskaya O. L. Activities of antioxidant system components and polyphenol oxidase in ontogeny of lawn grasses under megapolis conditions. *Russ. J. Plant Physiol.* 2008. Vol. 55, no. 5. P. 699–705. doi: 10.1134/S1021443708050154

Shelyakin M. A., Zakhochiy I. G., Golovko T. K. Ontogenetic aspects of plant respiration (by the example of *Rubus chamaemorus* L.). *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. Vol. 63, no. 1. P. 92–100. doi: 10.1134/S1021443716010167

Sin'kevich M. S., Deryabin A. N., Trunova T. I. Characteristics of oxidative stress in potato plants with modified carbohydrate metabolism. *Russ. J. Plant Physiol.* 2009. Vol. 56, no. 2. P. 168–174. doi: 10.1134/S1021443709020046

Zagoskina N. V., Nazarenko L. V. Aktivnyie formy kisloroda i antioksidantnaya sistema rasteniy [Active oxygen species and antioxidant system of plants]. *Vestnik Moskovskogo gorodskogo pedagogicheskogo universiteta. Seriya Estestvennyie nauki* [Bulletin of Moscow State Pedagogical University. Natural Sciences Series]. 2016. No. 2 (22). P. 9–23.

Agati G., Azzarello E., Pollastri S., Tattini M. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Sci.* 2012. Vol. 196. P. 67–76. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.07.014

Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004. Vol. 55. P. 373–399. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701

Beers R. F. Jr., Sizer I. W. A spectrometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 1952. Vol. 195. P. 133–140.

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 1976. Vol. 72, no. 1–2. P. 248–254.

Couée I., Sulmon C., Gouesbet G., El Amrani A. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 2006. Vol. 57, no. 3. P. 449–459. doi: 10.1093/jxb/erj027

Desikan R., Mackerness S. A.-H., Hancock J. T., Neill S. J. Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* 2001. Vol. 127, no. 1. P. 159–172. doi: 10.1104/pp.127.1.159

Duroux L., Welinder K. G. The peroxidase gene family in plants: a phylogenetic overview. *J. Mol. Evol.* 2003. Vol. 57, no. 4. P. 397–407. doi: 10.1007/s00239-003-2489-3

Jansen M. A. K., Van den Noort R. E., Tan M. Y., Prinsen E., Lagrimini L. M., Thorneley R. N. Phenol-oxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress. *Plant Physiol.* 2001. Vol. 126, no. 3. P. 1012–1023. doi: 10.1104/pp.126.3.1012

Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Van Breusegem F., Noctor G. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *J. Exp. Bot.* 2010. Vol. 61, no. 15. P. 4197–4220. doi: 10.1093/jxb/erq282

Prochazkova D., Sairam R. K., Srivastava G. C., Singh D. V. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Sci.* 2001. Vol. 161, no. 4. P. 765–771. doi: 10.1016/S0168-9452(01)00462-9

Rizhsky L., Hallak-Herr E., Van Breusegem F., Rachmilevitch S., Barr J. E., Rodermel S., Inzé D., Mittler R. Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *Plant J.* 2002. Vol. 32, no. 3. P. 329–342. doi: 10.1046/j.1365-313X.2002.01427.x

Sairam R. K., Singh D. V., Srivastava G. C. Changes in activity of activity of antioxidant enzymes in sunflower leaves of different ages. *Biol. Plant.* 2003. Vol. 47, no. 1. P. 61–66. doi: 10.1023/A:1027328814591

Wellen K. E., Thompson C. B. Cellular metabolic stress: Considering how cells respond to nutrient excess. *Mol. Cell.* 2010. Vol. 40, no. 2. P. 323–332. doi: 10.1016/j.molcel.2010.10.004

Willekens H., Inzé D., Van Montagu M., Van Camp W. Catalases in plants. *Molecular Breeding.* 1995. Vol. 1, no. 3. P. 207–228. doi: 10.1007/BF02277422

Received August 02, 2016

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Никерова Ксения Михайловна

младший научный сотрудник аналитической лаборатории
Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: knikerova@yandex.ru
тел.: (8142) 768160

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

Мощенская Юлия Леонидовна

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: tselishcheva.yulia@mail.ru
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

Подгорная Марина Николаевна

ведущий биолог лаб. физиологии и цитологии
древесных растений
Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
e-mail: marishka89.11@list.ru
тел.: (8142) 568216

Софронова Ирина Николаевна

ведущий биолог лаб. физиологии и цитологии
древесных растений
Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: sofronova_ira@mail.ru
тел.: (8142) 568216

CONTRIBUTORS:

Nikerova, Kseniya

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

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

Moshchenskaya, Yulia

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: tselishcheva.yulia@mail.ru
tel.: (8142) 568216

Novitskaya, Ludmila

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

Podgornaya, Marina

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: marishka89.11@list.ru
tel.: (8142) 568216

Sofronova, Irina

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: sofronova_ira@mail.ru
tel.: (8142) 568216

УДК 581.1

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ДИССИМИЛЯЦИИ САХАРОЗЫ В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ РАЗНЫХ ФОРМ БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ

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

Институт леса Карельского научного центра РАН

Изучено распределение активности сахарозорасщепляющих ферментов в акцепторных органах (стебли, корни) сеянцев обычной (*Betula pendula* var. *pendula*) и карельской (*B. pendula* var. *carelica*) березы. У 1,5-месячных сеянцев основным аттрагирующим центром является корень, а расщепление сахарозы осуществляется преимущественно за счет сахарозосинтазы. Показано, что у карельской березы метаболизация сахарозы происходила более интенсивно по сравнению с растениями обычной березы. Обнаружена высокая активность ферментов диссимиляции сахарозы в стеблях 5-месячных растений, что свидетельствует о расходовании основной массы метаболитов на образование структуры этих органов. При этом у 5-месячных сеянцев обычной березы наблюдается высокая активность сахарозосинтазы, у карельской березы – апопластной инвертазы. Таким образом, биохимические и молекулярные различия между растениями обычной и карельской березы закладываются еще на ранних этапах онтогенеза до появления у карельской березы видимых признаков аномальной по структуре древесины. Показано влияние уровня доступного азота на активность сахарозорасщепляющих ферментов. Выращивание опытных растений на среде с низким содержанием азота приводило к подавлению метаболизации сахарозы в акцепторных органах. У обычной березы – за счет снижения активности сахарозосинтазы, у карельской березы – активности кислых инвертаз. То есть у сеянцев березы повислой в условиях низкой обеспеченности азотом происходило подавление ксилогенеза и все ресурсы расходовались на поддержание биомассы корней, при этом у карельской березы снижалась метаболизация сахарозы в апопласте, приводящая к паренхиматизации тканей.

Ключевые слова: *Betula pendula* Roth; сахарозосинтаза; апопластная, вакуолярная, цитоплазматическая инвертаза.

Yu. L. Moshchenskaya, N. A. Galibina, K. M. Nikerova, L. L. Novitskaya. ACTIVITY OF SUCROSE DISSIMILATING ENZYMES IN EARLY ONTOGENY IN DIFFERENT FORMS OF SILVER BIRCH

The distribution of interchangeable sucrose-cleaving enzymes' activities in sink organs (stem, root) of silver birch (*Betula pendula* var. *pendula*) and Karelian birch (*B. pendula* var. *carelica*) seedlings was investigated. It is shown that the dominant sink organ in 1.5-month-old seedlings is the root, and sucrose cleavage is mainly performed by sucrose synthase. Early in the ontogeny sucrose metabolism in Karelian birch sink organs is more intensive compared to silver birch. As confirmed by the high activity of sucrose-cleaving enzymes in the stem, the bulk of metabolites in 5-month-old silver birch plants were spent on the formation of the stem's structure. We observed high activity of sucrose synthase in the stem of 5-month-old silver birch seedlings and high activity cell-wall invertase in Karelian birch. Thus, biochemical and molecular differences between silver

birch and Karelian birch originate from the early stages of the plants' ontogeny, before the traits of abnormal wood structure become visible in Karelian birch. The effect nitrogen availability on the activity of alternative sucrose-cleaving enzymes is shown. Cultivation of experimental plants in nitrogen-deficient media suppressed sucrose metabolism in sink organs: through reduced activity of sucrose synthase in silver birch, and through reduced activity of acid invertase in Karelian birch. This means that low nitrogen availability to silver birch seedlings resulted in inhibition of xylogenesis, and all the plant's resources were utilized to support root biomass, whereas in Karelian birch it caused a reduction in sucrose cleavage in the apoplast, thus leading to an increase in the amount of parenchyma cells.

Key words: *Betula pendula* Roth; sucrose synthase; apoplastic invertase; vacuolar invertase; cytosolic invertase.

Введение

Сахароза является важным субстратом многих биохимических превращений, обеспечивающих рост и развитие проводящих тканей ствола древесных растений. На протяжении всего вегетационного периода у березы повислой она представляет собой основную транспортную форму фотоассимилятов [Новицкая и др., 2015]. Ферментная система деградации сахарозы у растений включает в себя сахарозосинтазу (СС, К. Ф. 2.4.1.13), цитоплазматическую (ЦпИнв), вакуолярную (ВакИнв) и апопластную (АпИнв) инвертазы (К. Ф. 3.2.1.26). На взрослых растениях двух форм березы повислой – на обычной березе с нормальным строением тканей ствола (*Betula pendula* Roth var. *pendula*) и карельской березе (*B. pendula* var. *carelica*) с проявившимися признаками структурных аномалий – показаны различия в распределении активности СС и АпИнв в ксилеме в период активного камбиального роста. У растений обычной березы на фоне пониженной активности АпИнв наблюдаются высокие значения активности СС. Переход к узорчатому строению древесины приводит к смене направления дифференцировки клеток камбия в сторону увеличения числа паренхимных клеток и переориентации метаболизма акцепторных тканей на накопление запасных метаболитов. При этом активность СС в ксилеме резко снижается и возрастает вклад АпИнв в процесс деградации сахарозы в акцепторных тканях ствола, о чем свидетельствует высокая активность данного фермента [Галибина и др., 2015а, б]. Дальнейшие исследования показали, что активность СС и АпИнв в ксилеме безузорчатых деревьев карельской березы также отличается от таковой у растений обычной березы [Галибина и др., 2016а]. Выдвинуто предположение, что нарушения функционирования ферментных систем углеводного обмена у карельской березы начинаются еще в ходе раннего онтогенеза, до начала формирования аномальной древесины.

Помимо сахаров для нормального роста растения и увеличения его продуктивности необходимы нитраты, которые не только индуцируют путь ассимиляции азота в растении, но и могут перепрограммировать углеродный метаболизм в направлении создания более благоприятных условий для этой ассимиляции [Coruzzi, Bush, 2001; Chikov, Bakirova, 2004; Crawford, 2006; Tsay et al., 2011]. Анализ характеристик почв вокруг ареала карельской березы показал, что она не распространяется в области как очень бедных (примитивных и горно-тундровых), так и относительно богатых почв (буроземов темноцветных) [Новицкая, 2008]. Было показано, что ограничение ареала карельской березы со стороны плодородных почв может быть обусловлено смещением зоны интенсивного апопластного усвоения сахарозы в сторону флоэмы под влиянием высоких доз азотного питания [Галибина и др., 2016б]. У обычной березы действие избытка нитратов усиливало использование сахарозы через сахарозосинтазный путь ее метаболизации, результатом чего было увеличение прироста древесины. В ксилеме карельской березы нитраты приводили к снижению активности как СС (уменьшение прироста древесины), так и АпИнв (уменьшение количества паренхимы, т. е. нормализация строения древесины) [Галибина и др., 2016б]. Подобного исследования влияния недостатка азота на активность основных сахарозорасщепляющих ферментов березы повислой ранее не проводилось.

Цель работы заключалась в исследовании активности сахарозосинтазы и инвертаз у сеянцев березы повислой на ранних этапах онтогенеза, как в норме, так и в условиях недостатка азотного питания.

Объекты и методы исследования

Исследование проводили на сеянцах, выращенных из семян обычной березы повислой (*Betula pendula* Roth var. *pendula*) и карельской

березы (*B. pendula* var. *carelica* (Merklin)). Растения выращены из семян, полученных от контролируемого опыления (Forelia OY, Финляндия). Семена карельской березы получены от родительских деревьев с ярко выраженными признаками узорчатости древесины. Растения выращивали в камере при температуре 23 °С, 16-часовом фотопериоде, освещенности 8 клк на питательном грунте Terra Vita следующего состава: N – 0,91 %, P – 0,2 %, K – 0,094 %.

Исследование активности ферментов диссимиляции сахарозы на ранних этапах онтогенеза проводили на двух группах растений. Растения первой группы выращивали примерно до 3–5 см в высоту и снимали для анализа в возрасте 1,5 месяца. Возраст растений второй группы на момент отбора составил 5 месяцев, высота надземной части растений данной группы была ~25 см.

Для определения влияния азота на активность ферментов диссимиляции сахарозы часть растений выращивали в условиях недостатка азотного питания на естественном почвогрунте (почвенный горизонт Bf), состав: N – 0,095 %, P – 0,051 %, K – 0,065 %. Отбор тканей проводили по достижении растениями 5-месячного возраста.

На анализ отбирали корни и стебли. Растительный материал фиксировали в жидком азоте и хранили при –80 °С.

Для определения ферментативной активности растительные ткани растирали в жидком азоте и гомогенизировали при 4 °С в 50 мМ буфере Нерес (pH 7,5), содержащем 1мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 3 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl₂, 0,5 мМ PMSF. После 20-минутной экстракции гомогенат центрифугировали при 10 000 g в течение 20 минут (центрифуга Sigma 2-16PK, Германия). Осадок трехкратно промывали буфером. Объединенный супернатант и осадок диализовали при 4 °С в течение 18–20 часов против буфера для гомогенизации, разбавленного в 10 раз. В полученных после диализа ферментативных препаратах свободные гексозы и сахароза не определялись. В осадке определяли активность АпИнв, в супернатанте – ЦпИнв, ВакИнв, СС. Активность ферментов определяли после инкубации полученного препарата при 30 °С в течение 30 минут. Инкубационная среда для определения активности СС содержала 73 мМ трис-НСl (pH 7,5), 2,5 мМ УДФ-глюкозу, 20 мМ фруктозу, 5 мМ MgCl₂, 3 мМ ДТТ. Активность СС определяли в направлении синтеза сахарозы по количеству образовавшейся фруктозы спектрофотометрически (спектрофотометр СФ-2000, Россия) [Галибина и др., 2015а]. Инкубационная среда для определения активности инвертазы содержала 100 мМ ацетатный буфер (pH 4,7) (АИнв и ВакИнв) или 50 мМ Нерес

(pH 7,5) (ЦитИнв) и 25 мМ сахарозу. Количество образовавшейся в процессе инкубации глюкозы определяли глюкозооксидазным методом (набор реагентов «Глюкоза-Агат», Россия) [Галибина и др., 2015б]. Активность ферментов выражали в мкмоль распавшейся сахарозы на г сырой ткани (мкмоль/г сырой ткани).

Обработку данных по результатам исследования проводили с использованием общепринятых методов статистической обработки данных с использованием пакетов программ Microsoft Excel и StatGraphics для Windows.

Приведенные данные представлены в виде средних арифметических значений по биологической повторности в количестве 5–10 деревьев каждой группы. Аналитическая повторность трехкратная. Бары на диаграммах – ошибка средней. Различия в распределении показателей между группами растений определяли методом оценки значимости различий средних величин (t-критерий Стьюдента). Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты

Активность ферментов диссимиляции сахарозы в акцепторных органах 1,5-месячных сеянцев Betula pendula Roth

У сеянцев *B. pendula* var. *pendula* притекающая из листьев сахароза расщеплялась преимущественно в корнях за счет деятельности СС, активность которой достигала 44 мкмоль/г сырой ткани, что в 2,2 раза больше, чем в стебле (рис. 1). В отличие от корня в стебле наблюдалась высокая степень утилизации дисахарида по инвертазному пути, в основном за счет работы АпИнв (10 мкмоль/г сырой ткани), а также ВакИнв (2,4 мкмоль/г сырой ткани) и ЦитИнв (0,9 мкмоль/г сырой ткани) (рис. 1, А). В корнях активность инвертаз была меньше в 1,5–2 раза (рис. 1, Б).

У сеянцев *B. pendula* var. *carelica* метаболизация сахарозы в корнях за счет активности СС (88 мкмоль/г сырой ткани) (рис. 1, Б) была в 3 раза больше, чем в стебле (рис. 1, А). В отличие от сеянцев обычной березы растения, выращенные из семян карельской березы, имели большую активность СС как в стебле (в 1,5 раза), так и в корне (в 2 раза) (рис. 1).

Активность ферментов диссимиляции сахарозы в акцепторных органах 5-месячных сеянцев Betula pendula Roth

У 5-месячных сеянцев *B. pendula* var. *pendula* по сравнению с 1,5-месячными растениями

возрастает интенсивность метаболизма сахаразы, особенно в надземной части. Так, в стебле 5-месячных сеянцев в 7 раз выше активность СС (139 мкмоль/г сырой ткани), в 3,6 раза – активность АпИнв (37 мкмоль/г сырой ткани) и в 2,3 раза – активность ЦитИнв (3,3 мкмоль/г сырой ткани) (рис. 2, А). В корнях к пяти месяцам в 2,5 раза возрастает активность СС, значение ее достигает 111 мкмоль/г сырой ткани (рис. 2, Б).

У 5-месячных сеянцев *B. pendula var. carelica*, по сравнению с 1,5-месячными растениями, в стебле метаболизация сахарозы сахарозосинтазой увеличивается всего в 1,5 раза, в то время как активность апопластной инвертазы возрастает в 6,3 раза, значение ее достигает 54 мкмоль/г сырой ткани (рис. 2, А). В корнях отмечается снижение активности СС до 20 мкмоль/г сырой ткани (рис. 2, Б).

Высокие значения активности сахарозорасщепляющих ферментов в стебле свидетельствуют, что у 5-месячных сеянцев он становится основным аттрагирующим органом. Суммарная активность ферментов в стебле, по сравнению с корнем, преобладает в 1,5 и 3,4 раза у обычной и карельской березы соответственно.

У 5-месячных растений, по сравнению с 1,5-месячными, происходит изменение соотношения активности двух сахарозорасщепляющих ферментов. У обычной березы в акцепторных органах наблюдается высокая активность СС, значение которой в 4 раза выше активности АпИнв. У карельской березы, напротив, при невысокой активности СС (в 3 раза ниже по сравнению с обычной березой) существенно повышается активность АпИнв (рис. 2, А).

Влияние низкой обеспеченности азотом на морфометрические показатели и активность сахарозорасщепляющих ферментов у сеянцев березы повислой

У растений, выращенных на бедных почвах, по сравнению с нормой существенно снизилась длина побега – в 4 и 6 раз у обычной и карельской березы соответственно. При этом длина корней у обеих форм березы повислой уменьшилась всего в 2 раза (рис. 3).

У сеянцев *B. pendula var. pendula*, выращенных на почвах с низким содержанием доступного азота, по сравнению с нормой, снижалась степень метаболизации сахарозы в стебле и в корнях в 13 и 5 раз соответственно (рис. 4). Особенно существенно уменьшилась активность СС. Так, в стебле активность СС снизилась в 31 раз, а активность инвертаз в 3–5 раз; в корне саха-

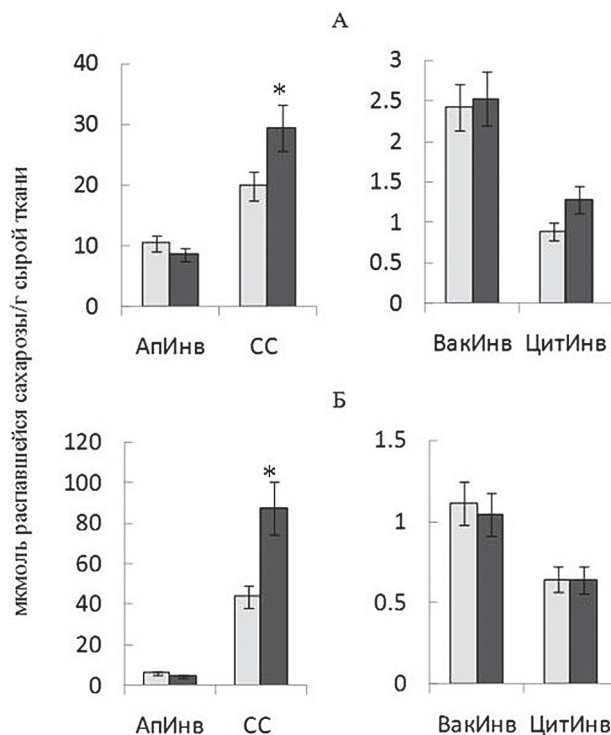


Рис. 1. Активность апопластной (АпИнв), вакуолярной (ВакуИнв), цитоплазматической (ЦитИнв) инвертазы и сахарозосинтазы (СС) в стебле (А) и корне (Б) 1,5-месячных сеянцев обычной (светлые столбики) и карельской (темные столбики) березы. * Здесь и на рис. 2 различия статистически значимы по отношению к растениям *B. pendula var. pendula* ($p < 0,05$)

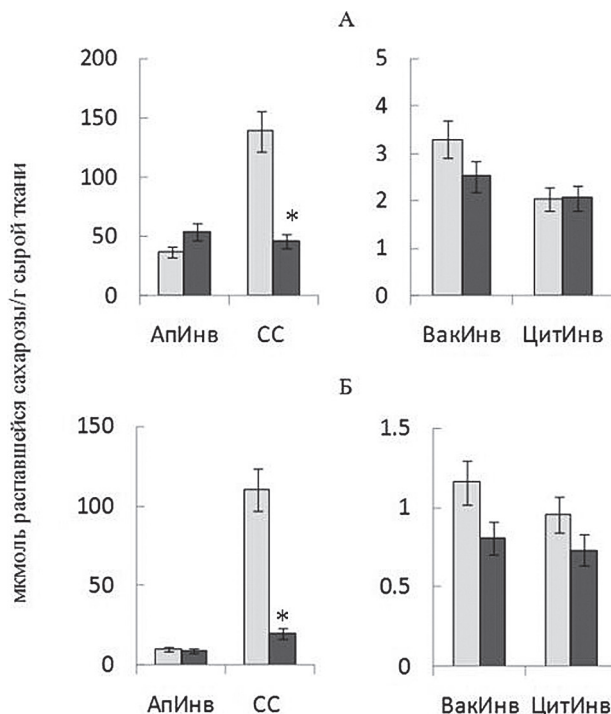


Рис. 2. Активность апопластной (АпИнв), вакуолярной (ВакуИнв), цитоплазматической (ЦитИнв) инвертазы и сахарозосинтазы (СС) в стебле (А) и корне (Б) 5-месячных сеянцев обычной (светлые столбики) и карельской (темные столбики) березы

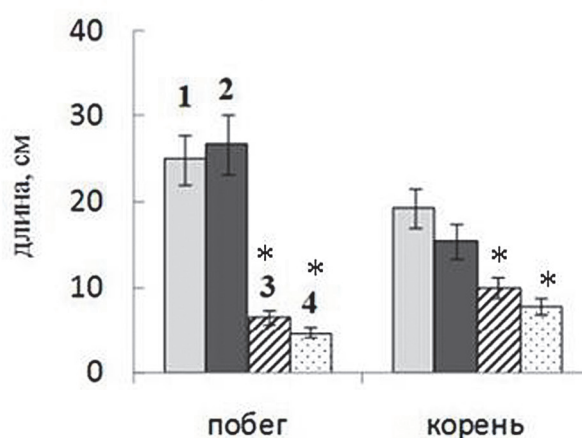
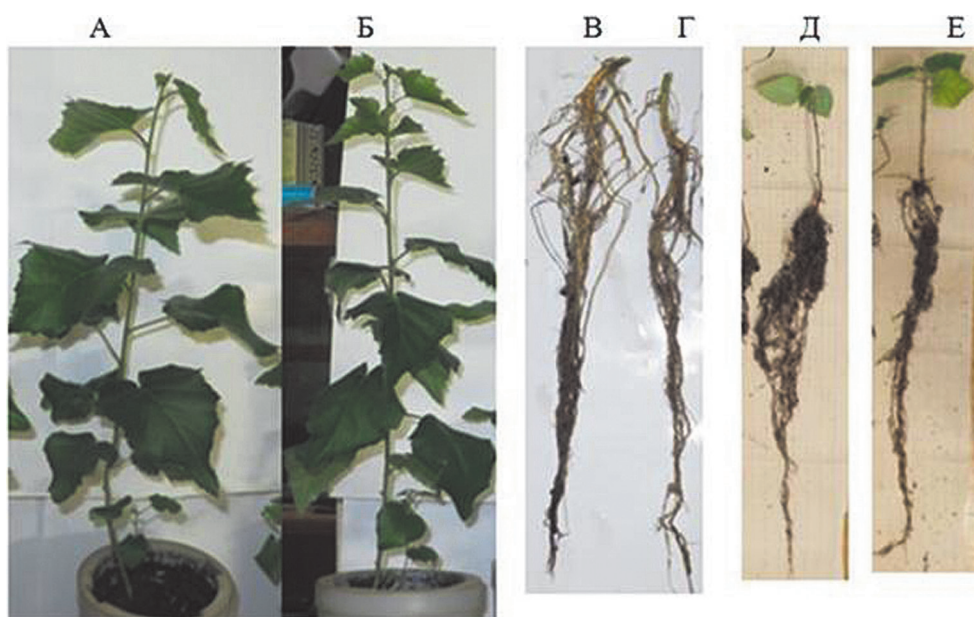


Рис. 3. На фотографиях внешний вид 5-месячных сеянцев обычной (А, В, Д) и карельской (Б, Г, Е) березы, выросших при нормальном уровне азота (А–Г) и недостатке азотного питания (Д, Е). На диаграмме длина побега и корней 5-месячных сеянцев обычной (1, 3) и карельской (2, 4) березы, выросших при нормальном уровне азота (1, 2) и недостатке азотного питания (3, 4). * Здесь и на рис. 4 различия статистически значимы по отношению к контролю ($p < 0,05$)

розосинтазная активность уменьшилась в 7 раз на фоне снижения инвертазной активности в 2–3 раза.

У растений карельской березы метаболизация сахарозы в стебле снизилась в 3 раза, а в корне не изменилась (рис. 4). Уменьшение расщепления дисахарида в стебле произошло в большей степени за счет снижения активности кислых инвертаз АпИнв (в 5 раз) и ВаКИнв (в 4 раза), активность ЦитИнв и СС изменилась не так сильно (уменьшение в 2–3 раза). При этом у растений карельской березы, выращенных при дефиците азота, активность СС в стебле была в 4 раза выше, чем у таких же растений обычной березы.

Обсуждение

Транспорт сахарозы из фотосинтезирующих листьев контролируется способностью акцепторов к ее расщеплению, что поддерживает градиент дисахарида. В повышении акцепторной силы органа важную роль играют апопластная инвертаза [Koch, 2004; Iraqi et al., 2005; Godt, Roitsch, 2006; Canam et al., 2008; Barratt et al., 2009 и др.] и сахарозосинтаза [Godt, Roitsh, 2006; Coleman et al., 2008; Nilsson et al., 2010 и др.]. В акцепторных органах как 1,5-месячных, так и 5-месячных растений активность данных ферментов значимо выше по сравнению с другими сахарозорасщепляющими ферментами (ВаКИнв, ЦпИнв).

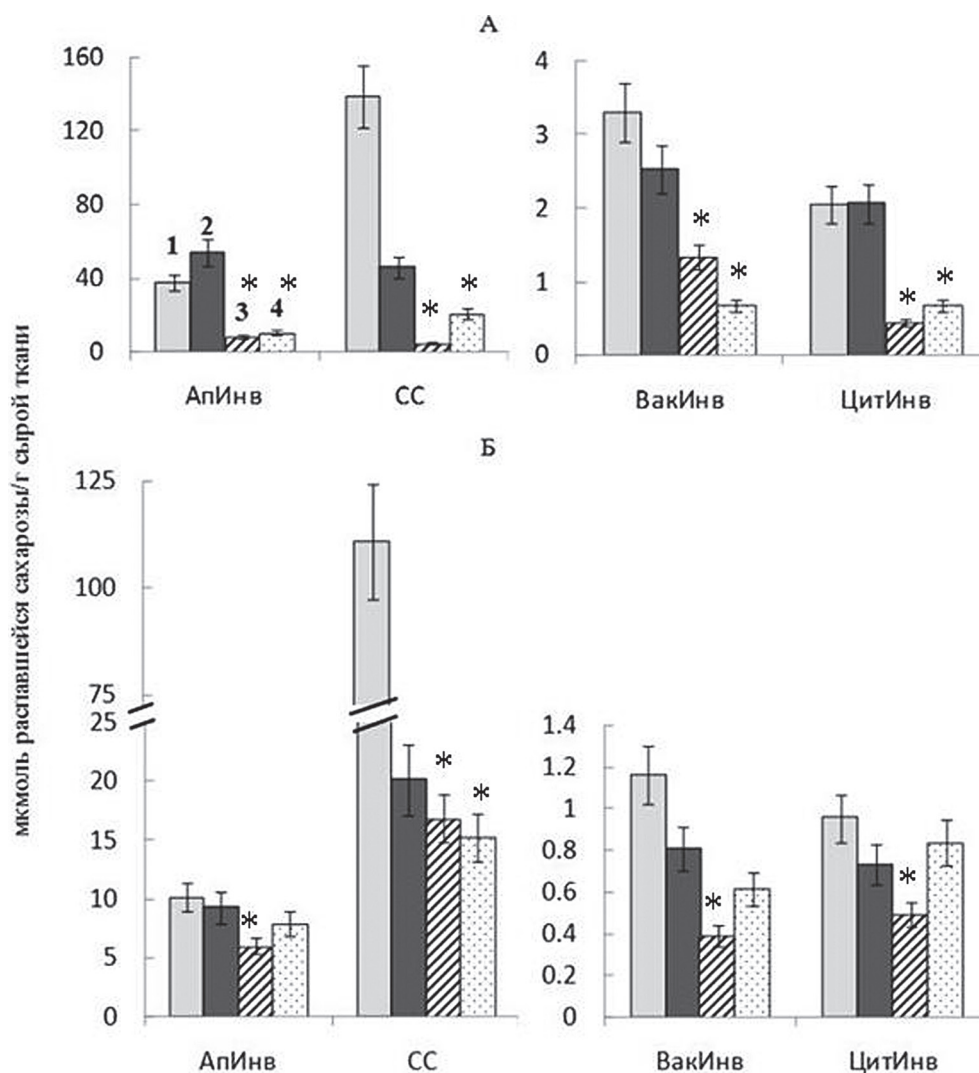


Рис. 4. Активность апопластной (АпИнв), вакуолярной (ВаkИнв), цитоплазматической (ЦитИнв) инвертазы и сахарозсинтазы (СС) в стебле (А) и корне (Б) 5-месячных сеянцев обычной (1, 3) и карельской (2, 4) березы, выросших при нормальном уровне азота (1, 2) и недостатке азотного питания (3, 4)

У 1,5-месячных растений березы повислой корень является основным потребляющим органом (метаболизация сахарозы в корнях выше по сравнению со стеблем) (рис. 1).

Высокая акцепторная сила корня поддерживается в основном за счет активности СС (рис. 1, Б), что согласуется с литературными данными [Никитин, Измайлов, 2016]. Сахарозсинтаза присутствует в растении повсеместно, но наибольшая ее активность обнаружена в молодых растущих тканях [Coleman et al., 2008, 2010]. В клетке СС находится в свободном или связанном с плазматической мембраной состоянии [Amor et al., 1995; Sturm, Tang, 1999]. Мембраносвязанная форма сахарозсинтазы образует комплекс с целлюлозосинтазой [Sturm, Tang, 1999; Winter, Huber, 2000; Ruan et al., 2003], что дает возможность

прямого использования образуемой в результате активности СС УДФ-глюкозы для биосинтеза целлюлозы, входящей в состав клеточных стенок. В результате деятельности СС углерод расходуется на построение клеточных структур и необратимо выводится из метаболизма. Таким образом, у сеянцев березы повислой СС – основной фермент, создающий акцепторную силу гетеротрофных тканей.

У 1,5-месячных сеянцев карельской березы по сравнению с растениями обычной березы активность СС выше как в корне, так и в стебле, что может свидетельствовать о более интенсивном протекании у нее процессов структурообразования уже на ранних этапах развития. Ранее на взрослых растениях карельской березы показано, что наибольшая активность СС на фоне интенсивного протекания ксилогенеза

наблюдается в ксилеме безузорчатых участков ствола узорчатых растений карельской березы [Галибина и др., 2016a].

По результатам наших исследований (рис. 2, А) можно заключить, что уже у 5-месячных растений, по сравнению с 1,5-месячными, основным акцептором ассимилятов становится стебель. Аттрагирующая способность стебля возрастает по мере роста и развития древесных растений, при этом клеточные стенки ксилемы становятся основными аккумуляторами биомассы [Антонова, 2011]. Преимущественное развитие стебля или корня (двух конкурирующих акцепторных органов) регулируется в растении сигнальными процессами, опосредованными растительными гормонами (ауксины, цитокинины). Недавно появились работы, указывающие также на участие сахаров в реакциях быстрого ответа, необходимых для поддержания координации развития корня и стебля в условиях действия эндогенных и экзогенных факторов [Wang, Ruan, 2016].

У 5-месячных сеянцев обычной березы, как и у 1,5-месячных растений, в стебле и в корне выше активность СС, а активность АпИнв значимо ниже (рис. 2). У сеянцев карельской березы, напротив, в стебле на фоне меньшей активности СС (в 4 раза по сравнению с обычной березой) возрастает активность апопластного фермента (в 1,5 раза по сравнению с обычной березой). Таким образом, в стебле карельской березы уменьшение метаболизации сахарозы по сахарозосинтазному пути компенсируется увеличением ее утилизации по инвертазному пути. Эти закономерности согласуются с данными, полученными на взрослых деревьях [Галибина и др., 2015a, б]. То есть уже на ранних этапах развития у двух форм березы повислой наблюдаются различия в путях метаболизации дисахарида. У обычной березы сахароза преимущественно расходуется на синтез клеточных стенок дифференцирующихся клеток ксилемы. У карельской березы наблюдается более низкая активность ферментов с внутриклеточной локализацией (СС, ВакИнв, ЦитИнв) и высокая активность АпИнв, что свидетельствует о расщеплении сахарозы в апопласте и накоплении гексоз, которые, являясь сигнальными молекулами, могут участвовать в реализации морфогенетических эффектов, лежащих в основе аномального ксилогенеза карельской березы. Повышенная активность АпИнв в стебле карельской березы на фоне сниженной активности СС подтверждает высказанные другими авторами предположения [Barratt et al., 2009; Gerber et al., 2014] о возможном участии инвертазы в синтезе компонентов клеточных стенок.

Преимущество использования ассимилятов в растении на развитие различных акцепторных органов определяется не только эндогенными механизмами, но и внешними факторами среды, в том числе плодородием почвы. Выращивание растений двух форм березы повислой на почве с низким содержанием доступного азота привело к сокращению темпов роста надземной биомассы, при этом они имели тонкие, но длинные корни (рис. 3).

У сеянцев обычной березы, выращенных при дефиците минеральных элементов, наблюдалось снижение ферментативной активности всех сахарозорасщепляющих ферментов (рис. 4). Особенно сильно снизилась активность СС (в стебле в 31 раз и в корне в 7 раз) на фоне незначительного снижения инвертазной активности (в 3–5 и 2–3 раза в стебле и в корнях соответственно). Большее падение сахарозосинтазной активности в стебле, по сравнению с корнем, привело и к большей потере надземной биомассы. На горохе посевном показано, что даже низкие (1 мМ) концентрации нитратов могут увеличивать активность СС и приводить к накоплению вегетативной биомассы растений [Никитин, Измайлов, 2016].

У растений карельской березы при недостаточном азотном питании активность СС в стебле снижается всего в 2 раза, при этом в большей степени снижается активность кислых инвертаз – ВакИнв (в 4 раза) и особенно АпИнв (в 5 раз). То есть в условиях недостатка минеральных элементов у карельской березы уменьшается выход свободных гексоз в апопласт, которые в свою очередь могут изменять программу дифференцировки клеток камбиальной зоны и приводить к повышению степени паренхиматизации тканей ствола, придавая древесине карельской березы характерный узор.

Таким образом, при недостатке азотного питания у сеянцев березы повислой происходит подавление ксилогенеза и все ресурсы тратятся на поддержание биомассы корней, при этом у карельской березы снижается метаболизация сахарозы в апопласте, приводящая к паренхиматизации тканей.

Заключение

В ходе проведенной работы показано, что у растений в возрасте 1,5 месяца основным аттрагирующим центром является корень, а расщепление сахарозы в акцепторных тканях растения осуществляется преимущественно за счет активности СС. Выявлено, что на ранних этапах формирования растения метаболизация сахарозы у карельской березы происходит

более интенсивно по сравнению с растениями обычной березы повислой. По достижении растениями 5-месячного возраста происходит переориентация путей утилизации сахарозы, и наиболее высокая активность сахарозорасщепляющих ферментов наблюдается в стебле. У обычной березы повислой большая часть синтезирующихся метаболитов расходуется на процессы структурообразования, о чем свидетельствует высокая активность СС. У растений карельской березы высокие значения активности кислых инвертаз способствуют накоплению большого количества гексоз в акцепторных органах и запасных метаболитов. Таким образом, биохимические и молекулярные различия между растениями обычной березы повислой и карельской березы закладываются еще на ранних этапах развития растения до начала формирования характерной аномальной по структуре древесины.

Выращивание растений в условиях недостаточного азотного питания приводило к снижению уровня метаболизации сахарозы в акцепторных органах, у обычной березы повислой – за счет снижения активности СС, у растений карельской березы – активности кислых инвертаз.

Авторы выражают благодарность И. Н. Софроновой и М. Н. Подгорной за помощь в проведении биохимических анализов.

Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП «Аналитическая лаборатория» ИЛ КарНЦ РАН при финансовой поддержке из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (тема № 0220-2014-0001) и гранта РФФИ № 16-04-100639_p_a.

Литература

Антонова Г. Ф. Формирование ксилемы и флоэмы хвойных // Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействием факторов среды: материалы межд. конф. (Петрозаводск, 20–24 июня 2011 г.). Петрозаводск, 2011. С. 6–11.

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. 1–10. doi: 10.7868/S0015330315030057

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., Мощенская Ю. Л., Никерова К. М. Аномальный морфогенез камбиальной зоны карельской березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica*) // Годичное собрание общества физиологов растений России. Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма (Санкт-Петербург, 21–24 июня 2016). СПб., 2016а. С. 37–38.

Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Никерова К. М. Избыток экзогенных нитратов подавляет формирование аномальной древесины у карельской березы // Онтогенез. 2016б. Т. 47, № 2. С. 83–91. doi: 10.7868/S047514501602004X

Никитин А. В., Измайлов С. Ф. Ферменты дисимилиации сахарозы как мишени действия нитрата в раннем онтогенезе гороха посевного // Физиология растений. 2016. Т. 63, № 1. С. 159–164. doi: 10.7868/S0015330315060135

Новицкая Л. Л. Карельская береза: механизмы роста и развития структурных аномалий. Петрозаводск: Verso, 2008. 144 с.

Новицкая Л. Л., Галибина Н. А., Никерова К. М. Транспорт и запасание сахаров во флоэме *Betula pendula* Roth var. *pendula* и var. *carelica* // Труды Карельского научного центра РАН. № 11. 2015. С. 35–47. doi: 10.17076/eb216

Amor Y., Haigler C. H., Johnson S. et al. A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. Vol. 92:93. P. 9353–9357.

Barratt D. H., Derbyshire P., Findlay K. et al. Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase // PNAS. 2009. Vol. 106. P. 13124–13129. doi: 10.1073/pnas.0900689106

Canam T., Mak S. W. Y., Mansfield S. D. Spatial and temporal expression profiling of cell wall invertase genes during early development in hybrid poplar // Tree Physiol. 2008. Vol. 28. P. 1059–1067. doi: 10.1093/treephys/28.7.1059

Chikov V. I., Bakirova G. G. Role of the apoplast in the control of assimilate transport, photosynthesis, and plant productivity // Russ. J. Plant Physiol. 2004. Vol. 53. P. 420–431. doi: 10.1023/B:RUPP.0000028691.49600.c2

Coleman H. D., Beamish L., Reid A. et al. Altered sucrose metabolism impacts plant biomass production and flower development // Transgenic Res. 2010. Vol. 19. P. 269–283. doi: 10.1007/s11248-009-9309-5

Coleman H. D., Samuels A. L., Guy R. D., Mansfield S. D. Perturbed lignification impacts tree growth in hybrid poplar – a function of sink strength, vascular integrity, and photosynthetic assimilation // Plant Physiology. 2008. Vol. 148. P. 1229–1237.

Coruzzi G., Bush D. R. Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signalling in plants // Plant Physiol. 2001. Vol. 125. P. 61–64. doi: 10.1104/pp.108.25500

Crawford N. M. Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants // J. Exp. Bot. 2006. Vol. 57. P. 471–478. doi: 10.1093/jxb/erj050

Gerber L., Zhang B., Roach M. et al. Deficient sucrose synthase activity in developing wood does not specifically affect cellulose biosynthesis, but causes an overall decrease in cell wall polymers // New Phytologist. 2014. Vol. 203. P. 1220–1230. doi: 10.1111/nph.12888

Godt D. E., Roitsch T. The developmental and organ specific expression of sucrose cleaving enzymes in sugar beet suggests a transition between apoplastic and symplasmic phloem unloading in the tap roots // *Plant Physiol. Biochem.* 2006. Vol. 44. P. 656–665. doi: 10.1016/j.plaphy.2006.09.019

Iraqi D., Le V. Q., Lamhamedi M. S., Tremblay F. M. Sucrose utilization during somatic embryo development in black spruce: involvement of apoplastic invertase in the tissue and of extracellular invertase in the medium // *J. Plant Physiol.* 2005. Vol. 162. P. 115–124. doi: 10.1016/j.jplph.2003.06.001

Koch K. E. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development // *Current Opinion in Plant Biology.* 2004. Vol. 7. P. 235–246. doi: 10.1016/j.pbi.2004.03.014

Nilsson R., Bernfur K., Gustavsson N. et al. Proteomics of plasma membranes from poplar trees reveals tissue distribution of transporters, receptors, and proteins in cell wall formation // *Mol. Cell. Proteomics.* 2010. Vol. 9. P. 368–387. doi: 10.1074/mcp.M900289-MCP200

Ruan Y. L., Llewellyn D. J., Furbank R. T. Suppression of sucrose synthase gene expression represses

cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development // *Plant Cell Online.* 2003. Vol. 15. P. 952–964. doi: 10.1105/tpc.010108

Sturm A., Tang G. Q. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning // *Trends Plant Sci.* 1999. Vol. 4. P. 401–407. doi: 10.1016/S1360-1385(99)01470-3

Tsay Y. F., Ho C. H., Chen H. Y., Lin S. H. Integration of nitrogen and potassium signaling // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2011. Vol. 62. P. 207–226. doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103837

Wang L., Ruan Y. L. Shoot – root carbon allocation, sugar signalling and their coupling with nitrogen uptake and assimilation // *Functional Plant Biology.* 2016. Vol. 43, no. 2. P. 105–113. doi: 10.1071/FP15249

Winter H., Huber S. C. Regulation of Sucrose Metabolism in Higher Plants: localization and regulation of activity of key enzymes // *Critical Reviews in Plant Sciences.* 2000. Vol. 19. P. 31–67. doi: 10.1080/07352680091139178

Поступила в редакцию 02.08.2016

References

Amor Y., Haigler C. H., Johnson S., Wainscott M., Delmer D. P. A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. Vol. 92:93. P. 9353–9357.

Antonova G. F. Formation of xylem and phloem in conifers. Structural and Functional Deviations from Normal Growth and Development of Plants under the Influence of Environmental Factors: Proceedings of the International Conference (Petrosavodsk, 20–24 June, 2011). Petrosavodsk, 2011. P. 6–11.

Barratt D. H., Derbyshire P., Findlay K., Pike M., Wellner N., Lunn J., Feil R., Simpson C., Maule A. J., Smith A. M. Normal growth of Arabidopsis requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. *PNAS.* 2009. Vol. 106. P. 13124–13129. doi: 10.1073/pnas.0900689106

Canam T., Mak S. W. Y., Mansfield S. D. Spatial and temporal expression profiling of cell wall invertase genes during early development in hybrid poplar. *Tree Physiol.* 2008. Vol. 28. P. 1059–1067. doi: 10.1093/treephys/28.7.1059

Chikov V. I., Bakirova G. G. Role of the apoplast in the control of assimilate transport, photosynthesis, and plant productivity. *Russ. J. Plant Physiol.* 2004. Vol. 53. P. 420–431. doi: 10.1023/B:RUPP.0000028691.49600.c2

Coleman H. D., Beamish L., Reid A., Park J. Y., Mansfield S. D. Altered sucrose metabolism impacts plant biomass production and flower development. *Transgenic Res.* 2010. Vol. 19. P. 269–283. doi: 10.1007/s11248-009-9309-5

Coleman H. D., Samuels A. L., Guy R. D., Mansfield S. D. Perturbed lignification impacts tree growth in hybrid poplar- a function of sink strength, vascular integrity, and photosynthetic assimilation. *Plant Physiology.* 2008. Vol. 148. P. 1229–1237.

Coruzzi G., Bush D. R. Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signalling in plants. *Plant Physiol.* 2001. Vol. 125. P. 61–64. doi: 10.1104/pp.108.25500

Crawford N. M. Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *J. Exp. Bot.* 2006. Vol. 57. P. 471–478. doi: 10.1093/jxb/erj050

Galibina N. A., Novitskaya L. L., Krasavina M. S., Moshchenskaya Yu. L. Activity of sucrose synthase in trunk tissues of the Karelian birch during cambial growth. *Russian Journal of Plant Physiology.* 2015a. Vol. 62, no. 3. P. 381–389. doi: 10.1134/S102144371503005X

Galibina N. A., Novitskaya L. L., Krasavina M. S., Moshchenskaya Yu. L. Activity of invertase in trunk tissues of the Karelian birch. *Russian Journal of Plant Physiology.* 2015b. Vol. 62, no. 6. P. 804–813. doi: 10.1134/S1021443715060060

Galibina N. A., Novitskaya L. L., Moshchenskaya Yu. L., Nikerova K. M. Abnormal morphogenesis of cambial zone in Karelian birch (*Betula pendula* Roth var. *carelica*). *Godichnoe sobranie obshchestva fiziologov rastenij Rossii. Signal'nye sistemy rastenij: ot receptora do otvetnoj reakcii organizma* (St. Petersburg 21–24 June 2016 g.) [Annual Meeting of Russian Society of Plant Physiologists. Signaling Systems of Plants: from the Receptor to the Response of the Organism]. St. Petersburg, 2016a. P. 37–38.

Galibina N. A., Novitskaya L. L., Nikerova K. M. Excess of exogenous nitrates inhibits the formation of Karelian birch abnormal wood. *Russian Journal of Developmental Biology.* 2016b. Vol. 47, no. 2. P. 69–76. doi: 10.1134/S106236041602003X

Gerber L., Zhang B., Roach M., Rende U., Gorsas A., Kumar M., Burgert I., Niittylla T., Sundberg B. Deficient sucrose synthase activity in developing wood does not specifically affect cellulose biosynthesis, but causes an overall decrease in cell wall polymers. *New Phytologist.* 2014. Vol. 203. P. 1220–1230. doi: 10.1111/nph.12888

Godt D. E., Roitsch T. The developmental and organ specific expression of sucrose cleaving enzymes in sugar beet suggests a transition between apoplastic and symplasmic phloem unloading in the tap roots. *Plant Physiol. Biochem.* 2006. Vol. 44. P. 656–665. doi: 10.1016/j.plaphy.2006.09.019

Iraqi D., Le V. Q., Lamhamedi M. S., Tremblay F. M. Sucrose utilization during somatic embryo development in black spruce: involvement of apoplastic invertase in the tissue and of extracellular invertase in the medium. *J. Plant Physiol.* 2005. Vol. 162. P. 115–124. doi: 10.1016/j.jplph.2003.06.001

Koch K. E. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology.* 2004. Vol. 7. P. 235–246. doi: 10.1016/j.pbi.2004.03.014

Nikitin A. V., Izmailov S. F. Enzymes of sucrose dissimilation as targets for nitrate in early ontogenesis of the garden pea. *Russian Journal of Plant Physiology.* 2016. Vol. 63, no. 1. P. 152–157. doi: 10.1134/S1021443715060138

Nilsson R., Bernfur K., Gustavsson N., Bygdell J., Wingsle G., Larsson C. Proteomics of plasma membranes from poplar trees reveals tissue distribution of transporters, receptors, and proteins in cell wall formation. *Mol. Cell. Proteomics.* 2010. Vol. 9. P. 368–387. doi: 10.1074/mcp.M900289-MCP200

Novitskaya L. L. The Karelian birch: mechanisms of growth and development of structural abnormalities. Petrozavodsk: Verso, 2008. 144 p.

Novitskaya L. L., Galibina N. A., Nikerova K. M. Sugar transport and storage in the phloem of *Betula pendula* Roth var. *pendula* and var. *carelica*. *Transactions of Karelian Research Centre of the RAS.* 2015. No. 12. P. 35–47. doi: 10.17076/eb216

Ruan Y. L., Llewellyn D. J., Furbank R. T. Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development. *Plant Cell Online.* 2003. Vol. 15. P. 952–964. doi: 10.1105/tpc.010108

Sturm A., Tang G. Q. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci.* 1999. Vol. 4. P. 401–407. doi: 10.1016/S1360-1385(99)01470-3

Tsay Y. F., Ho C. H., Chen H. Y., Lin S. H. Integration of nitrogen and potassium signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2011. Vol. 62. P. 207–226. doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103837

Wang L., Ruan Y. L. Shoot-root carbon allocation, sugar signalling and their coupling with nitrogen uptake and assimilation. *Functional Plant Biology.* 2016. Vol. 43, no. 2. P. 105–113. doi: 10.1071/FP15249

Winter H., Huber S. C. Regulation of Sucrose Metabolism in Higher Plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 2000. Vol. 19. P. 31–67. doi: 10.1080/07352680091139178

Received August 02, 2016

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Мощенская Юлия Леонидовна

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: tselishcheva.yulia@mail.ru
тел.: (8142) 568216

Галибина Наталия Алексеевна

заведующая 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

Никерова Ксения Михайловна

младший научный сотрудник аналитической лаборатории
Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: knikerova@yandex.ru
тел.: (8142) 768160

Новицкая Людмила Людвиговна

заведующая 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

CONTRIBUTORS:

Moshchenskaya, Yulia

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

Nikerova, Ksenia

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

Novitskaya, Ludmila

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

УДК 636.934.57:577.15:591.111.1

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ЛЕЙКОЦИТОВ АМЕРИКАНСКОЙ НОРКИ (*NEOVISON VISON*): ГЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ

А. Г. Кижина¹, Л. Б. Узенбаева¹, В. В. Илюха², Н. Н. Тютюнник¹

¹ Институт биологии Карельского научного центра РАН

² Петрозаводский государственный университет

У темно-коричневых (+/+), серебристо-голубых (p/p) и сапфировых (a/a p/p) норок исследовали активность и локализацию ферментов в лейкоцитах крови в различные периоды постнатального онтогенеза. Работа выполнена цитохимическими и морфометрическими методами с использованием светового микроскопа и компьютерной программы анализа изображений «Видеотест». В распределении пероксидазы, нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы (НХЭ) и щелочной фосфатазы (ЩФ) в лейкоцитах установлены существенные генотипические различия. Среди исследованных генотипов выделяются носители алеутского гена (a/a) – сапфировые норки, характеризующиеся низкими репродуктивными качествами и высокой постнатальной смертностью. У них в лейкоцитах выявлено значительное увеличение размера и изменение количества пероксидазо- и эстеразопозитивных структур, а также наличие фосфатазонегативных областей в цитоплазме, которые соответствуют аномальным гранулам и свидетельствуют о нарушении гранулогенеза. У норок всех трех генотипов обнаружено сходство в изменениях с возрастом активности пероксидазы и ЩФ. Наименьшая активность пероксидазы отмечена в период раннего постнатального онтогенеза, максимальная – в 120-дневном возрасте. Увеличение активности ЩФ приходилось на фазу активного роста – 60-й день постнатального онтогенеза. Характер возрастных изменений НХЭ зависел от генотипа норки. Высокий уровень активности НХЭ был выявлен у 4-дневных щенков сапфировых норок. Наибольшая активность НХЭ у темно-коричневых и серебристо-голубых норок отмечена в 180-дневном возрасте, тогда как у сапфировых, напротив, наблюдаются минимальные значения в этот период. Динамика активности ферментов в постнатальном онтогенезе у трех исследованных окрасов, по-видимому, отражает особенности метаболизма в лейкоцитах в различные периоды. Особенности цитохимии лейкоцитов периферической крови у сапфировых норок подтверждают наличие морфофункционального клеточного дефекта, являющегося причиной их низкой резистентности.

Ключевые слова: пероксидаза; нафтол-AS-D-хлорацетатэстераза; щелочная фосфатаза; лейкоциты крови; американская норка (*Neovison vison*).

**A. G. Kizhina, L. B. Uzenbaeva, V. V. Ilyukha, N. N. Tyutyunnik.
ACTIVITY OF LEUKOCYTE ENZYMES IN AMERICAN MINK (*NEOVISON
VISON*): GENOTYPIC AND AGE-RELATED DIFFERENCES**

The activity and localization of enzymes in blood leukocytes were examined in dark brown (+/+), silver-blue (p/p) and sapphire (a/a p/p) minks during several periods of postnatal

development. This study was performed by morphometric and cytochemical methods using light microscopy and image analysis software "VideoTest». Significant genotypic differences were determined in the distribution of peroxidase, naphthol AS-D chloroacetate esterase (NASDCE) and alkaline phosphatase (AP) in leukocytes. Sapphire mink (*a/a*) are characterized by the lowest reproductive potential and increased postnatal mortality among the studied genotypes. Leukocytes of sapphire mink showed a significant increase in the size of and a change in the number of peroxidase- and esterase-positive structures, as well as the presence of phosphatase-negative areas in the cytoplasm. Apparently, these structures are abnormal granules and indicate the disturbance of granulogenesis. Mink of all the three genotypes demonstrated similar age-related changes of peroxidase and alkaline phosphatase activities. The lowest peroxidase activity was observed in early postnatal development, whereas the highest – at the age of 120 days. The increase in alkaline phosphatase activity occurred during the phase of active growth – on the 60th day of postnatal ontogeny. The pattern of age-related changes in NASDCE activity depended on the mink's genotype. Sapphire mink had the highest level of NASDCE activity at the age of 4 days and the lowest – at 180 days, whereas both dark brown and silver-blue mink at the same age (180 days) had the highest values of NASDCE activity. The postnatal dynamics of the enzymes' activity in the three genotypes apparently reflects the specific features of metabolism in leukocytes in different periods. The cytochemical features of peripheral blood leukocytes in sapphire mink suggest the presence of a morphofunctional cellular defect, which is the cause of the animals' low viability.

Key words: peroxidase; naphthol AS-D chloroacetate esterase; alkaline phosphatase; blood leukocytes; American mink (*Neovison vison*).

Введение

Американская норка (*Neovison vison*), введенная в зоокультуру, вот уже несколько десятилетий вызывает особый интерес селекционеров, генетиков и физиологов. В условиях промышленного разведения у этого вида зарегистрирована высокая частота доминантных и полудоминантных мутаций окраски волосяного покрова, которые, за редким исключением, не наблюдались до периода разведения в неволе. Вариации пигментации меха, обусловленные морфофункциональными особенностями меланоцитов, а также типом и содержанием меланина, контролируются генами, большинство из которых имеют плейотропный эффект. Известно, что мутации окраски покрова у животных затрагивают главным образом сенсорные функции, репродуктивные качества, метаболизм и иммунореактивность [Reissmann, Ludwig, 2013]. Некоторые породы норок, в том числе сапфировая, характеризуются низкими показателями жизнеспособности и высокой чувствительностью к заболеваниям. Уникальность этой породы норок состоит в том, что в связи с морфофункциональным дефектом лейкоцитов они могут быть моделью редкого генетического заболевания человека – синдрома Чедиака – Хигаши (СЧХ).

Молекулярно-генетический анализ показал, что развитие иммунодефицитного состояния у человека (синдром Чедиака – Хигаши),

американской норки, бежевой мыши и некоторых пород крупного рогатого скота вызвано мутацией гена *LYST* (lysosomal traffic regulation) [Kunieda et al., 1999; Zarzour et al., 2005; Runkel et al., 2006; Anistroaei et al., 2013]. Это заболевание характеризуется ослаблением пигментации, наличием аномальных цитоплазматических гранул в различных типах клеток, снижением функциональной активности естественных киллеров и Т-лимфоцитов [Haliotis et al., 1980; Saxena et al., 1982; Merino et al., 1983], ослаблением хемотаксиса фагоцитов [Boxer et al., 1979], а в некоторых случаях наблюдается пониженное содержание лизосомальных ферментов – катепсина и эластазы [Asif Baig, Sirasgi, 2015].

Для оценки функционально-метаболических свойств лейкоцитов представляется важным изучить состояние ферментных систем клетки [Славинский, 2008]. Основными участниками микробицидной и фагоцитарной функций лейкоцитов являются миелопероксидазная бактерицидная система и лизосомальные ферменты, в том числе эстеразы. Пероксидаза (К. Ф. 1.11.1.7) – гемосодержащий фермент, обладающий выраженными цитотоксическими свойствами, который, по мнению ряда авторов, относится к компонентам первичных гранул [Нагоев, 1986; Пальцын, 1988]. Нафтол-AS-D-хлорацетатэстераза (НХЭ) является лизосомальным ферментом из группы неспецифических эстераз (К. Ф. 3.1.6)

и специфическим маркером клеток гранулоцитарного ряда [Хейхоу, Кваглино, 1983]. Щелочная фосфатаза (ЩФ) (К. Ф. 3.1.3.1) – важный фермент лейкоцитов, принимающий участие в клеточном метаболизме: в обмене нуклеиновых кислот, фосфопротеидов, фосфолипидов и других соединений [Donato et al., 1979; Шубич, Нагоев, 1980]. Долгое время считалось, что ЩФ содержится во вторичной (специфической) зернистости лейкоцитов, однако N. Borregaard и J. V. Cowland показали, что фермент локализован в мембранах секреторных гранул [Borregaard, 1988; Borregaard, Cowland, 1997].

Целью нашего исследования являлось изучение активности ферментов лейкоцитов крови – пероксидазы, НХЭ и ЩФ у норок различных генотипов в постнатальном онтогенезе.

Материалы и методы

Исследования проведены на норках, содержащихся на звероводческой ферме в Республике Карелия: стандартных темно-коричневых, серебристо-голубых и сапфировых. Стандартная темно-коричневая норка – внутрипородный тип темно-коричневых норок, получена в результате скрещивания различных подвидов американской норки (*Neovison vison*, сем. Mustelidae, отр. Carnivora). Стандартный фенотип определяется генами дикого типа (+/+) – аллелями, получившими наибольшее распространение в дикой природе [Ness et al., 1985; Колдаева и др., 2003]. У мутантных серебристо-голубых норок, рецессивных по гену серебристо-голубого окраса (*p/p*), цвет варьирует от светло- до темно-серого. Сапфировая, как и серебристо-голубая, относящаяся к группе голубых норок, является комбинативной формой, созданной на основе мутаций – алеутской (*a/a*) и платиновой (*p/p*).

Активность и локализацию ферментов – пероксидазы, НХЭ и ЩФ в сегментоядерных нейтрофилах и эозинофилах исследовали цитохимическими методами на мазках крови. Взятие крови проводилось у 4- и 10-дневных щенков при декапитации, а у 60-, 120- и 180-дневных норок ($n = 5-8$ в каждой группе), а также у взрослых животных ($n = 12$) – из хвостовой вены в утренние часы после ночного голодания.

Мазки фиксировали в течение 30 с 10%-м раствором формалина в этиловом спирте. Для определения пероксидазы фиксированные препараты помещали в инкубационную среду с орто-толидином на 7 минут [Хейхоу, Кваглино, 1983]. Определение активности ЩФ в лейкоцитах проводили с применением

субстрата нафтол-АС-фосфата, растворенного в трис-НСI буфере (рН 9,0–9,2) в присутствии ионов Mg^{2+} [Берстон, 1965]. НХЭ выявляли в реакции с нафтол-AS-D-хлорацетатом в фосфатном буфере (рН 7,2–7,4) [Буйкис, Руденс, 1972]. В последних двух случаях красителем служил прочный синий ВВ. При необходимости проводили окраску ядер гематоксилином. За активность фермента принимался показатель, представляющий собой произведение суммарной площади продукта цитохимической реакции в клетке и его оптической плотности.

В работе использовался световой микроскоп Axioscop 40 (Carl Zeiss) с компьютерной системой анализа изображений «Видеотест» и цветной цифровой видеокамерой (Pixera 150ES). Полученные данные обрабатывались при помощи пакетов программ MS Excel и Statgraphics общепринятыми методами вариационной статистики. Оценку достоверности статистических показателей выборок проводили по критерию Вилкоксона – Манна – Уитни.

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования ИБ КарНЦ РАН.

Результаты и обсуждение

В локализации и активности ферментов лейкоцитов у норок трех окрасов найдены существенные генотипические и возрастные различия. Так, установлено, что пероксидаза в нейтрофилах у темно-коричневых и серебристо-голубых норок представлена в виде мелких обильных гранул или имеет диффузно-гранулярную форму распределения (рис. 1, А, Б). В эозинофилах она сосредоточена в многочисленных и однородных по величине гранулах, занимающих почти всю цитоплазму (рис. 1, Г, Д). У сапфировых норок обнаружены нарушения локализации пероксидазы, этот фермент в нейтрофилах и эозинофилах сосредоточен в различных по величине гранулах, в том числе и очень крупных (рис. 1, В, Е).

Активность пероксидазы в раннем онтогенезе, как правило, снижена по сравнению с последующими периодами. Максимально высокие ее значения были зафиксированы у норок всех трех окрасов в 120-дневном возрасте. Темно-коричневые норки, как правило, отличались от других окрасов более высокими показателями активности. Сходные изменения динамики активности лейкоцитарной пероксидазы наблюдаются в онтогенезе многих видов млекопитающих. Увеличение активности пероксидазы с возрастом было показано в лейкоцитах крови

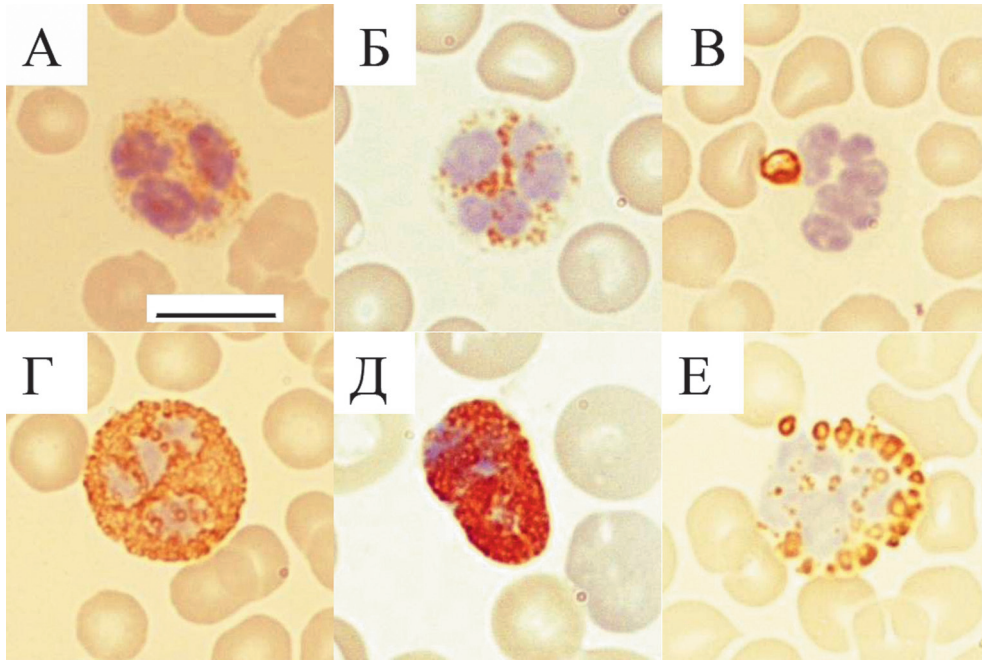


Рис. 1. Peroксидаза в сегментоядерных нейтрофилах (верхний ряд) и эозинофилах (нижний ряд) темно-коричневой (А, Г), серебристо-голубой (Б, Д) и сапфировой (В, Е) норок. Ядра докрашены гематоксилином. Здесь и на рис. 2, 3 – масляная иммерсия. Об. 100, ок. 10, масштаб 10 мкм

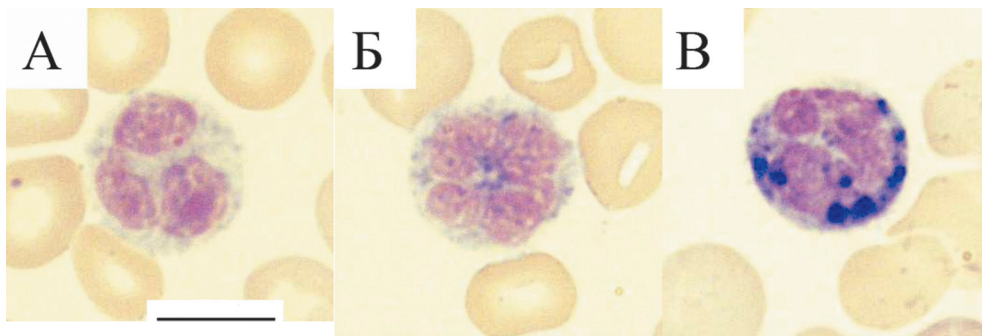


Рис. 2. Нафтол-АС-Д-хлорацетатэстераза в нейтрофилах темно-коричневой (А), серебристо-голубой (Б) и сапфировой (В) норок. Ядра докрашены гематоксилином

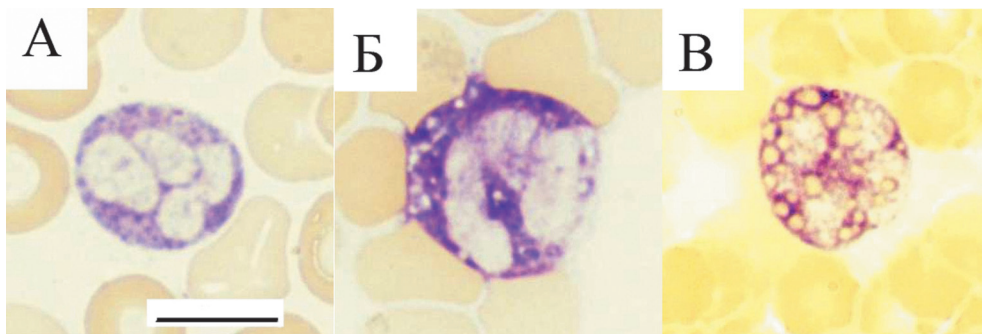


Рис. 3. Щелочная фосфатаза в сегментоядерных лейкоцитах темно-коричневой (А), серебристо-голубой (Б), сапфировой (В) норок

телят [Инюкина, Гугушвили, 2010]. M. Ferencik и соавторы [1982] в экспериментах на свиньях продемонстрировали у взрослых особей по

сравнению с молодыми увеличенную активность некоторых лизосомальных ферментов и пероксидазы при антигенной стимуляции.

Некоторые авторы указывают, что сниженная активность миелопероксидазы у новорожденных связана с неокончательно сформированной антиокислительной системой [Дубинина и др., 1984].

Имеются значительные генотипические различия в характере распределения НХЭ. Стандартным и серебристо-голубым норкам свойственно мелкогранулярное распределение фермента по всей площади клетки (рис. 2, А, Б). У сапфировых норок обнаружены особенности локализации НХЭ, свидетельствующие о морфофункциональном нарушении лизосом. В нейтрофилах на всех этапах онтогенеза эстеразоположительный материал выявляется в виде нескольких гранул разной величины, иногда собранных в довольно крупные скопления, на фоне диффузно-пылевидного окрашивания цитоплазмы (рис. 2, В).

При исследовании возрастной динамики активности лизосомального фермента НХЭ установлены ее более высокие значения у темно-коричневых и серебристо-голубых норок в возрасте 60 и 180 дней по сравнению со взрослыми. Изменения активности НХЭ у сапфировых норок носили противоположный характер. Максимальные значения отмечались в 4 дня, а минимальные в 180 дней. По данным литературы, активность НХЭ связана прежде всего с протеолитической функцией. При ее участии в нейтрофилах происходит переваривание объектов фагоцитоза и фрагментов клетки [Хейхоу, Кваглино, 1983]. Повышение активности лизосомальных ферментов обычно связывают с активацией процессов деградации при структурно-функциональной перестройке тканей [Покровский, Тутельян, 1976; Суринов, 1977]. Высокий уровень их активности обнаружен у крыс в клетках печени в раннем постнатальном периоде [Покровский, Тутельян, 1976]. Авторами отмечалась значительная активность кислых гидролаз в первые дни жизни, что связано с характерной для этого периода перестройкой метаболизма и обновлением клеточных структур в ответ на изменение среды жизнедеятельности и характера питания. Как показывают наши данные, высокой активностью НХЭ в 4-дневном возрасте обладали щенки только сапфировой норки. Вероятно, что повышенная активность НХЭ нейтрофилов у сапфировой норки в ранний период онтогенеза связана с деструкцией дефектных клеточных структур и с увеличенным содержанием незрелых клеточных элементов в крови [Кижина, 2011]. Факторами, приводящими к повышенной ферментативной активности, являются также антигенная стимуляция организма или

лабилизация мембран клеток. Установлено, что активность катепсина D в лизосомах печени у сапфировых норок выше, чем у темно-коричневых [Рендаков, Голубева, 2005]. Повышенное содержание глюкуронидазы в лизосомах почек было выявлено у бежевых мышей с СЧХ-подобным заболеванием [Brandt et al., 1975]. К причинам, приводящим к увеличению уровня лизосомальных ферментов в тканях организма у животных с патологией, авторы относят повышенную секрецию этих ферментов и дефектный экзоцитоз. Вместе с тем, как показывают результаты исследования К. Н. Takeushi, М. Р. McGarry и R. T. Swank [1987], содержание лизосомальных ферментов эластазы и катепсина G в нейтрофилах крови бежевых мышей значительно снижено по сравнению с нормальными особями.

ЩФ в периферической крови норок локализована в сегментоядерных лейкоцитах, относящихся, по всей видимости, к эозинофилам (рис. 3, А, Б). На это указывают морфологические признаки, а также положительная корреляция между содержанием эозинофилов и количеством лейкоцитов с положительной реакцией на ЩФ. В 4- и 10-дневном возрасте помимо клеток, морфологически сходных с эозинофилами, лейкоцитарная ЩФ обнаруживалась в крупных клетках с округлым ядром, вероятно, принадлежащих к миелоцитам. В отдельных случаях положительная реакция на ЩФ регистрируется в тромбоцитах. У норок исследуемых генотипов также были обнаружены различия в характере распределения ЩФ. У стандартных и серебристо-голубых норок фермент заполняет всю площадь клетки и не обнаруживается в цитоплазматических гранулах. У сапфировых норок четко выявляются фосфатазонегативные области различной величины, которые соответствуют аномальным гранулам (рис. 3, В).

Результаты исследования возрастной динамики уровня ЩФ в лейкоцитах продемонстрировали, что наиболее высокие показатели были характерны для норок 4- и 60-дневного возраста по сравнению с остальными периодами (рис. 4). Ранее было показано, что фосфатазная активность нейтрофилов у детей почти всех возрастных групп, в особенности у новорожденных, также была существенно выше по сравнению со взрослыми [Шубич, Нагоев, 1980]. Максимальную активность ЩФ в первую неделю жизни объясняют повышенным уровнем кортикостероидов у новорожденных в результате родового стресса. Высокую активность щелочной фосфатазы в постнатальном онтогенезе можно связать с интенсивно идущими процессами роста, поскольку этот

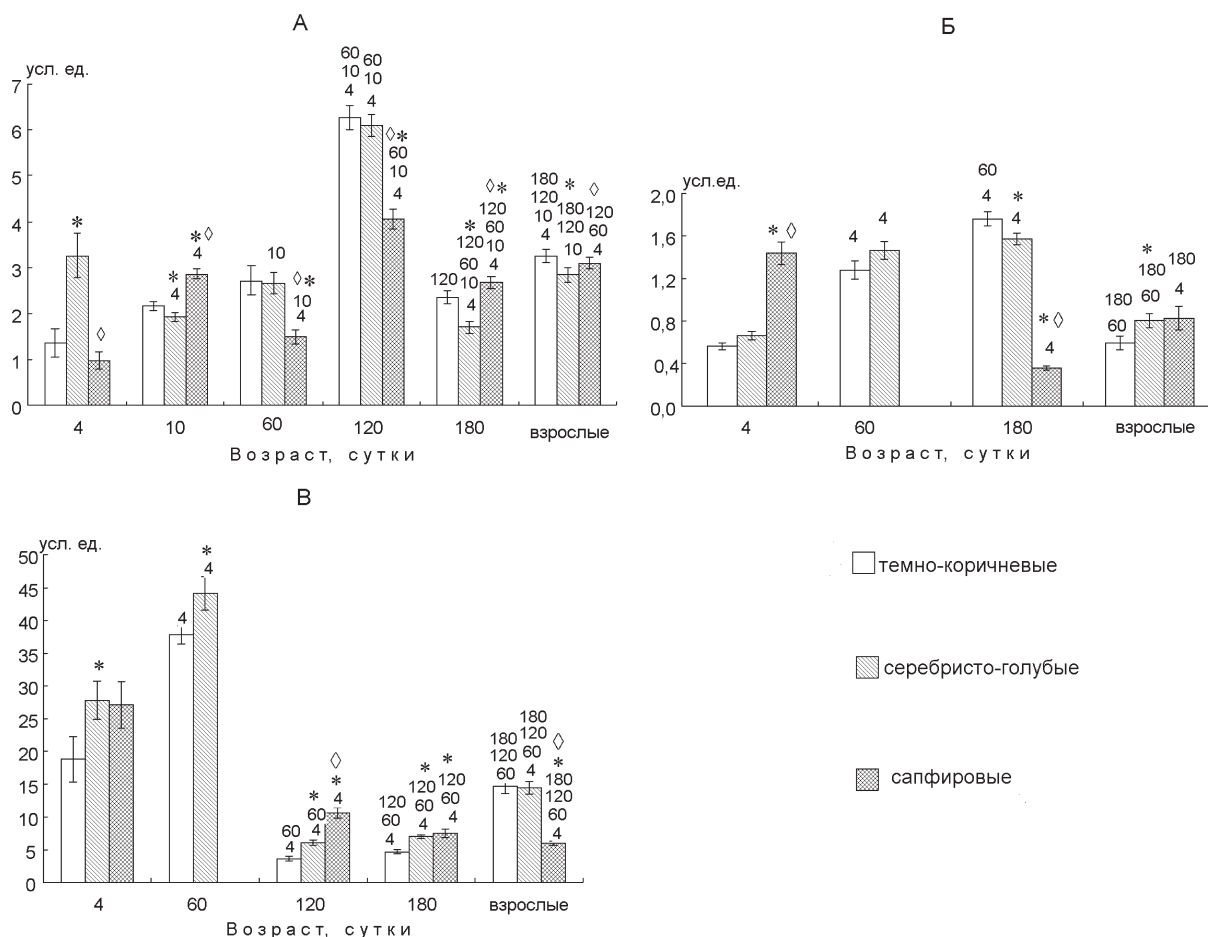


Рис. 4. Активность пероксидазы (А), нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы (Б) и щелочной фосфатазы (В) в лейкоцитах у норок в постнатальном онтогенезе. Условные обозначения: цифры сверху столбиков – по сравнению с 4-, 10-, 60-, 120-, 180-дневным возрастом различия достоверны, * – различия достоверны по сравнению с темно-коричневыми, ◇ – с серебристо-голубыми норками, критерий Вилкоксона – Манна – Уитни ($p < 0,05$)

фермент участвует в кальцификации костной ткани. В наших исследованиях наиболее высокие значения ЩФ обнаружены у двухмесячных норок темно-коричневого и серебристо-голубого окраса (сапфировые норки в этом возрасте не анализировались). По данным В. А. Берестова и Л. К. Кожевниковой [1981], наиболее высокая активность ЩФ в сыворотке крови норок также приходилась на 60-й день онтогенеза. К 120 дням происходит спад активности фермента и дальнейшее повышение в 180 дней у норок всех окрасов, кроме сапфирового. Характер генотипических различий в активности лейкоцитарной ЩФ зависел от периода онтогенеза. Стабильно высокими значениями активности ЩФ обладают серебристо-голубые норки, являющиеся более устойчивыми к действию факторов среды. Темно-коричневые норки, как правило, характеризуются более низкими значениями по сравнению с двумя другими окрасами.

При исследовании генотипических различий в активности ферментов лейкоцитов особого внимания заслуживает анализ изменений показателей у сапфировой норки как модели СЧХ в сравнении с двумя другими окрасами. Причинами пониженной резистентности человека с СЧХ и животных, имеющих подобное заболевание, является ослабленный хемотаксис и неэффективный киллинг [Voxer et al., 1979]. Также показано, что у пациентов с СЧХ и бежевых мышей при поглощении чужеродного материала содержимое лизосом не выделяется в фагоцитарную вакуоль [Root et al., 1972]. Ряд авторов отмечают существование различий в активности ферментов лейкоцитов у людей (а также животных моделей) с патологией и здоровых индивидов. Так, Т. Р. Stossel и соавторы [1972] выявили, что, несмотря на содержание большинства ферментов в фагоцитарных вакуолях больных СЧХ в пределах нормальных значений, активность пероксидазы

и бета-глюкуронидазы у них была значительно ниже. Изучение активности НХЭ в зрелых нейтрофилах костного мозга исследовательской группой К. Н. Takeuchi [1987] показало, что активность данного фермента у бежевых мышей в несколько раз снижена по сравнению с мышами дикого типа. Нашими исследованиями установлено, что у взрослых сапфировых норок наблюдается близкая с таковой у стандартных темно-коричневых и серебристо-голубых норок активность пероксидазы и НХЭ, но значительно пониженная активность ЩФ.

Таким образом, наше исследование показало, что функционально-метаболические особенности лейкоцитов зависят от возраста и генотипа норок. При анализе локализации пероксидазы, НХЭ и ЩФ в лейкоцитах сапфировых норок выявлено, что дефектные клеточные структуры, содержащие пероксидазу и НХЭ, соответствуют аномальным лизосомам. Активность исследуемых ферментов изменяется в постнатальном онтогенезе. У сапфировых норок наибольшая активность НХЭ выявлена в 4-дневном возрасте, у темно-коричневых и серебристо-голубых – в 180-дневном. В возрасте 60 дней у темно-коричневых и серебристо-голубых норок наблюдается высокий уровень ЩФ. Наибольшая активность пероксидазы у всех исследованных генотипов обнаружена в 120-дневном возрасте. Характер возрастных изменений активности ферментов у норок различных генотипов неодинаков и, по-видимому, является примером структурно-функциональной перестройки лейкоцитов в постнатальном онтогенезе. Несмотря на то что активность пероксидазы и НХЭ у сапфировых норок во взрослом состоянии сохраняется на уровне нормальных значений, выявленное у них нарушение локализации ферментов приводит к нарушению функции лизосом и, как следствие, к угнетению иммунной защиты организма.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента (1410.2014.4.) и средств федерального бюджета (тема № 0221-2014-0001).

Литература

Берестов В. А., Кожевникова Л. К. Ферменты крови пушных зверей. Л.: Наука, 1981. 184 с.
Берстон М. Гистохимия ферментов. М.: Мир, 1965. 464 с.
Буйкис И. М., Руденс Ю. Ф. Цитохимическое выявление эстераз в клетках периферической крови и костного мозга // Вопросы лейкологии. 1972. Вып. 2. С. 239–255.

Дубинина Е. Е., Сальникова Л. А., Раменская Н. П., Ефимова Л. Ф. Перекисное окисление и антиокислительная система крови в онтогенезе // Вопросы медицинской химии. 1984. Т. 30, № 5. С. 28–33.

Инюкина Т. А., Гугушвили Н. Н. Оценка неспецифической резистентности организма теллят // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины. 2010. № 200. С. 62–68.

Кижина А. Г. Морфофункциональные особенности лейкоцитов крови и костного мозга (*Mustela vison* Schr.): автореф. дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 2011. 22 с.

Колдаева Е. М., Милованов Л. В., Трапезов О. В. Породы пушных зверей и кроликов. М.: Колос, 2003. 240 с.

Нагоев Б. С. Очерки о нейтрофильном гранулоците. Нальчик: Эльбрус, 1986. 144 с.

Пальцын А. А. Некоторые вопросы современного учения о полиморфоядерных лейкоцитах // Архив патологии. 1988. Т. 50, № 2. С. 85–90.

Покровский А. А., Тутельян В. А. Лизосомы. М.: Наука, 1976. С. 155–166.

Рендаков Н. Л., Голубева А. Г. Активность лизосомальных протеиназ, структура и функция лейкоцитов у норок с синдромом Чедиака-Хигаши // Материалы Всероссийской конференции молодых исследователей. СПб., 2005. 98 с.

Славинский А. А. Локализация компонентов антибактериальных систем в цитоплазме нейтрофильных лейкоцитов: компьютерный анализ клеточного изображения // Фундаментальные исследования. 2008. № 9. С. 7–8.

Суринов Б. П. Множественные формы щелочной и кислой фосфатаз тканей крыс в постнатальном онтогенезе // Онтогенез. 1977. Т. 8, № 4. С. 377–382.

Хейхоу Ф. Г., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. М.: Медицина, 1983. 320 с.

Шубич Н. Г., Нагоев Б. С. Щелочная фосфатаза лейкоцитов в норме и при патологии. М.: Медицина, 1980. 224 с.

Anistoroaei R., Krogh A. K., Christensen K. A frameshift mutation in the LYST gene is responsible for the Aleutian color and the associated Chediak-Higashi syndrome in American mink // Anim. Genet. 2013. Vol. 44, no. 2. P. 178–83.

Asif Baig M., Sirasgi A. Chediak Higashi Syndrome masquerading as acute leukemia / Storage disorder – A rare case report // Int. J. Res. Med. Sci. 2015. Vol. 3, no. 7. P. 1785–1787.

Borregaard N. The human neutrophil. Function and dysfunction // Eur. J. Haematol. 1988. Vol. 41. P. 401–413. doi 10.1111/j.1600-0609.1988.tb00219.x

Borregaard N., Cowland J. B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte // Blood. 1997. Vol. 89, no. 10. P. 3503–3521.

Boxer L. A., Albertini D. F., Baehner R. L., Oliver J. M. Impaired microtubule assembly and polymorphonuclear leukocyte function in the Chediak-Higashi syndrome correctable by ascorbic acid // Br. J. Haematol. 1979. Vol. 43, no. 2. P. 207–213. doi: 10.1111/j.1365-2141.1979.tb03743.x

Brandt E. J., Elliott R. W., Swank R. T. Defective lysosomal enzyme secretion in kidneys of Chediak-Higashi

(Beige) mice // *J. Cell Biol.* 1975. Vol. 67. P. 774–788. doi: 10.1083/jcb.67.3.774

Donato H., Gebara E., de Cosen R. H., Giosefi O. Leukocyte alkaline activity in the diagnosis of neonatal bacterial infections // *Journal of pediatrics.* 1979. Vol. 94, no. 2. P. 242–244.

Ferencik M., Stefanovik J., Kotulova D. The activities of elastase and other lysosomal enzymes in professional phagocytes and mechanism of their release // *Acta Biol. Med. Ger.* 1982. Vol. 41, no. 1. P. 31–34.

Haliotis T., Roder J., Klein M. et al. Chediak-Higashi gene in humans I. Impairment of natural-killer function // *J. Exp. Med.* 1980. Vol. 151. P. 1049–1058. doi: 10.1084/jem.151.5.1039

Kunieda T., Nakagiri M., Takami M. et al. Cloning of bovine *LYST* gene and identification of a missense mutation associated with Chediak-Higashi syndrome of cattle // *Mammalian Genome.* 1999. Vol. 10. P. 1146–1149. doi: 10.1007/s003359901181

Merino F., Klein G. O., Henle W. et al. Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus and low natural-killer activity in patients with Chediak-Higashi syndrome // *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1983. Vol. 27. P. 326–339. doi: 10.1016/0090-1229(83)90085-5

Ness N., Lium B., Sjaastad Ø. et al. A norwegian pearl fox (omberg pearl) with Chediak Higashi syndrome and its relationship to other pearl-mutations // *Scientific.* 1985. Vol. 9, no. 3. P. 197–199.

Reissmam M., Ludwig A. Pleiotropic effects of coat colour-associated mutations in humans, mice and other mammals // *Seminars in Cells and Develop-*

mental Biology. 2013. Vol. 24. P. 576–86. doi: 10.1016/j.semcdb.2013.03.014

Root R. K., Rosenthal A. S., Balestra D. J. Abnormal bactericidal, metabolic, and lysosomal functions of CHS leukocytes // *J. Clin. Invest.* 1972. Vol. 51, no. 3. P. 649–665. doi: 10.1172/JCI106854

Runkel F., Bussow H., Seburn K. L. et al. Grey, a novel mutation in the murine *Lyst* gene, causes the beige phenotype by skipping of exon 25. 2006. *Mammalian Genome.* Vol. 17. P. 203–210. doi: 10.1007/s00335-005-0015-1

Saxena R. K., Saxena Q. B., Adler W. H. Defective T-cell response in beige mutant mice // *Nature.* 1982. Vol. 295. P. 240–241. doi: 10.1038/295240a0

Stossel T. P., Root R. K., Vaughan M. Phagocytosis in chronic granulomatous disease and the Chediak-Higashi syndrome // *N. Engl. J. Med.* 1972. Vol. 286, no. 3. P. 120–123. doi: 10.1056/NEJM197201202860302

Takeuchi K. H., McGarry M. P., Swank R. T. Elastase and cathepsin G activities are present in immature bone marrow neutrophils and absent in late marrow and circulating neutrophils of beige (Chediak-Higashi) mice // *J. Exp. Med.* 1987. Vol. 166. P. 1362–1376. doi: 10.1084/jem.166.5.1362

Zarzour W., Kleta R., Frangoul H. et al. Two novel CHS1 (*LYST*) mutations: Clinical correlations in an infant with Chediak – Higashi syndrome // *Mol. Genet. Metab.* 2005. Vol. 85. P. 125–132. doi: 10.1016/j.ymgme.2005.02.011

Поступила в редакцию 30.06.2016

References

Berestov V. A., Kozhevnikova L. K. Phermenti krovi pushnih zverey [Blood enzymes of fur animals]. *Lenin-*

grad: Nauka, 1981. 184 p.

Berston M. Gistokhimiya fermentov [Histochemistry of enzymes]. *Moscow: Mir, 1965. 464 p.*

Buykis I. M., Rudens Yu. F. Tsiotihimicheskoe vyavlenie esteraz v kletkah perifericheskoy krovi i kostnogo mozga [Cytochemical determination of esterase in peripheral blood and bone marrow cells]. *Voprosy leykozologii [Problems of Leucosology].* 1972. Iss. 2. P. 239–255.

Dubinina E. E., Salnikova L. A., Ramenskaya N. P., Efimova L. F. Perekisnoe okislenie i antiokislitel'naya sistema krovi v ontogeneze [Peroxidation and antioxidant system of blood in ontogenesis]. *Voprosy meditsinskoy himii [Problems of Medical Chemistry].* 1984. Vol. 30, no. 5. P. 28–33.

Heyhou F. G., Kvaglino D. Gematologicheskaya tsiotihimiya [Hematological cytochemistry]. *Moscow: Meditsina, 1983. 320 p.*

Inyukina T. A., Gugushvili N. N. Otsenka nespetsificheskoy rezistentnosti organizma telyat [Estimation of nonspecific resistance of a calf organism]. *Uchenye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny [Scientific Notes of Kazan Bauman State Acad. of Vet. Medicine Journal].* 2010. No. 200. P. 62–68.

Kizhina A. G. Morfofunktsionalnyie osobennosti leykotsitov krovi i kostnogo mozga (*Mustela vison Schr.*) [Morphofunctional features of blood and bone marrow leucocytes in minks (*Mustela vison Schr.*): Summary of PhD (Cand. of Biol.) thesis. *Petrozavodsk, 1985. 22 p.*

Koldaeva E. M., Milovanov L. V., Trapezov O. V. Pороды pushnyih zverey i krolikov [Breeds of fur animals and rabbits]. *Moscow: Kolos, 2003. 240 p.*

Nagoev B. S. Ocherki o neyetrofilnom granulotsite [Essays on neutrophilic granulocyte]. *Nalchik: Elbrus, 1986. 144 p.*

Paltsyin A. A. Nekotoryie voprosy sovremennogo ucheniya o polimorfoyadernyih leykotsitah [Some issues of a modern theory of polymorphonuclear leucocytes]. *Arh. Patol.* 1988. Vol. 50, no. 2. P. 85–90.

Pokrovsky A. A., Tutelyan V. A. Lysosomy [Lysosomes]. Ed. S. E. Severin. *Moscow: Nauka, 1976. P. 155–166.*

Rendakov N. L., Golubeva A. G. Aktivnost lizosomalnyih proteinaz, struktura i funktsiya leykotsitov u norok s sindromom Chediak-Higashi [Activity of lysosomal proteinases, structure and function of leucocytes in minks with Chediak-Higashi syndrome]. *Materialy Vserossiyskoy konferentsii molodyih issledovateley [Proceedings of All-Russian Conference of Young Researchers].* St. Petersburg, 2005. 98 p.

- Slavinskiy A. A. Lokalizatsiya komponentov antibakterialnykh sistem v tsitoplazme neyetrofilnykh leykotsitov: kompyuternyy analiz kletochnogo izobrazheniya [Localization of the antibacterial systems components in the cytoplasm of neutrophilic leucocytes: computer analysis of a cell image]. *Fundamentalnyie issledovaniya [Fundamental Research]*. 2008. No. 9. P. 7–8.
- Surinov B. P. Mnozhestvennyie formy schelochnoy i kisloy fosfatazy tkaney kryis v postnatalnom ontogeneze [Multiple forms of alkaline and acid phosphatases of rat tissues in postnatal ontogenesis]. *Ontogenez [Russian Journal of Developmental Biology]*. 1977. Vol. 8, no. 4. P. 377–382.
- Shubich N. G., Nagoev B. S. Schelochnaya fosfataza leykotsitov v norme i pri patologii [Alkaline phosphatase of leucocytes in normal and pathological conditions]. Moscow: Meditsina, 1980. 224 p.
- Anistoroaei R., Krogh A. K., Christensen K. A frame-shift mutation in the LYST gene is responsible for the Aleutian color and the associated Chediak-Higashi syndrome in American mink. *Anim. Genet.* 2013. Vol. 44, no. 2. P. 178–83.
- Asif Baig M., Sirasgi A. Chediak Higashi Syndrome masquerading as acute leukemia / Storage disorder – A rare case report. *Int. J. Res. Med. Sci.* 2015. Vol. 3, no. 7. P. 1785–1787.
- Borregaard N. The human neutrophil. Function and dysfunction. *Eur. J. Haematol.* 1988. Vol. 41. P. 401–413. doi 10.1111/j.1600-0609.1988.tb00219.x
- Borregaard N., Cowland J. B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. 1997. Vol. 89, no. 10. P. 3503–3521.
- Boxer L. A., Albertini D. F., Baehner R. L., Oliver J. M. Impaired microtubule assembly and polymorphonuclear leukocyte function in the Chediak-Higashi syndrome correctable by ascorbic acid. *Br. J. Haematol.* 1979. Vol. 43, no. 2. P. 207–213. doi: 10.1111/j.1365-2141.1979.tb03743.x
- Brandt E. J., Elliott R. W., Swank R. T. Defective lysosomal enzyme secretion in kidneys of Chediak-Higashi (Beige) mice. *J. Cell Biol.* 1975. Vol. 67. P. 774–788. doi: 10.1083/jcb.67.3.774
- Donato H., Gebara E., de Cosen R. H., Gioseffi O. Leukocyte alkaline activity in the diagnosis of neonatal bacterial infections. *Journal of pediatrics*. 1979. Vol. 94, no. 2. P. 242–244.
- Ferencik M., Stefanovik J., Kotulova D. The activities of elastase and other lysosomal enzymes in professional phagocytes and mechanism of their release. *Acta Biol. Med. Ger.* 1982. Vol. 41, no. 1. P. 31–34.
- Haliotis T., Roder J., Klein M., Ortaldo J., Fauci A. S., Herberman R. B. Chediak-Higashi gene in humans I. Impairment of natural-killer function. *J. Exp. Med.* 1980. Vol. 151. P. 1049–1058. doi: 10.1084/jem.151.5.1039
- Kunieda T., Nakagiri M., Takami M., Ide H., Oga-wa H. Cloning of bovine LYST gene and identification of a missense mutation associated with Chediak-Higashi syndrome of cattle. *Mammalian Genome*. 1999. Vol. 10. P. 1146–1149. doi: 10.1007/s003359901181
- Merino F., Klein G. O., Henle W., Ramirez-Duque P., Forsgren M., Amestry C. Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus and low natural-killer activity in patients with Chediak-Higashi syndrome. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1983. Vol. 27. P. 326–339. doi: 10.1016/0090-1229(83)90085-5
- Ness N., Lium B., Sjaastad Ø., Blom A., Lohi O. A norwegian pearl fox (omberg pearl) with Chediak-Higashi syndrome and its relationship to other pearl-mutations. *Scientifur*. 1985. Vol. 9, no. 3. P. 197–199.
- Reissmam M., Ludwig A. Pleiotropic effects of coat colour-associated mutations in humans, mice and other mammals. *Seminars in Cells and Developmental Biology*. 2013. Vol. 24. P. 576–86. doi: 10.1016/j.semcdb.2013.03.014
- Root R. K., Rosenthal A. S., Balestra D. J. Abnormal bactericidal, metabolic, and lysosomal functions of CHS leukocytes. *J. Clin. Invest.* 1972. Vol. 51, no. 3. P. 649–665. doi: 10.1172/JCI106854
- Runkel F., Bussow H., Seburn K. L., Cox G. A., Ward D. M., Kaplan J., Franz T. Grey, a novel mutation in the murine Lyst gene, causes the beige phenotype by skipping of exon 25. 2006. *Mammalian Genome*. Vol. 17. P. 203–210. doi: 10.1007/s00335-005-0015-1
- Saxena R. K., Saxena Q. B., Adler W. H. Defective T-cell response in beige mutant mice. *Nature*. 1982. Vol. 295. P. 240–241. doi: 10.1038/295240a0
- Stosfel T. P., Root R. K., Vaughan M. Phagocytosis in chronic granulomatous disease and the Chediak-Higashi syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1972. Vol. 286, no. 3. P. 120–123. doi: 10.1056/NEJM197201202860302
- Takeuchi K. H., McGarry M. P., Swank R. T. Elastase and cathepsin G activities are present in immature bone marrow neutrophils and absent in late marrow and circulating neutrophils of beige (Chediak-Higashi) mice. *J. Exp. Med.* 1987. Vol. 166. P. 1362–1376. doi: 10.1084/jem.166.5.1362
- Zarzour W., Kleta R., Frangoul H., Suwannarat P., Jeong A., Kime S. Y., Wayne A. S., Gunay-Aygun M., White J., Filipovich A., Gahl W. A. Two novel CHS1 (LYST) mutations: Clinical correlations in an infant with Chediak-Higashi syndrome. *Mol. Genet. Metab.* 2005. Vol. 85. P. 125–132. doi: 10.1016/j.ymgme.2005.02.011

Received June 30, 2016

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кижина Александра Геннадьевна

научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: golubewa81@yandex.ru
тел.: (8142) 573107

Узенбаева Людмила Борисовна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: uzenb@bio.krc.karelia.ru
тел.: (8142) 573107

Илюха Владимир Викторович

аспирант
Петрозаводский государственный университет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: karax911@mail.ru
тел.: (8142) 711001

Тютюнник Николай Николаевич

главный научный сотрудник, д. с.-х. н., профессор
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: tyutyunnik@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 573107

CONTRIBUTORS:

Kizhina, Alexandra

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: golubewa81@yandex.ru
tel.: (8142) 573107

Uzenbaeva, Lyudmila

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: uzenb@bio.krc.karelia.ru
tel.: (8142) 573107

Ilyukha, Vladimir

Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: karax911@mail.ru
tel.: (8142) 711001

Tyutyunnik, Nikolai

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: tyutyunnik@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 573107

УДК 599.742.1:591.3

ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ У ЛИСИЦ И ПЕСЦОВ В ПОЗДНЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

С. Н. Сергина¹, В. А. Илюха¹, Л. Б. Узенбаева¹,
Е. П. Антонова¹, И. В. Баишникова¹, А. В. Морозов¹,
А. Г. Кижина¹, Э. Ф. Печорина¹, И. И. Окулова²

¹ Институт биологии Карельского научного центра РАН

² Всероссийский научно-исследовательский институт охотничьего хозяйства и звероводства им. проф. Б. М. Житкова

Исследованы особенности лейкоцитарной формулы, активности пищеварительных ферментов и уровни тканевых антиоксидантов у двух близкородственных, но различающихся по экологическим особенностям видов семейства Canidae: лисицы (*Vulpes vulpes*) и песца (*V. lagopus*) в возрасте 0,5; 3,5 и 5,5 года. Выявлена видоспецифичность некоторых изученных показателей, которая выражалась в более высоких уровнях антиоксидантных ферментов и α -токоферола, более низком содержании глутатиона в тканях, более высокой активности протеиназы в желудке и липаз в тонкой кишке, наряду с низкой активностью амилазы в поджелудочной железе у песцов по сравнению с лисицами. При старении у лисиц наблюдалось снижение количества лимфоцитов и сопутствующее увеличение сегментоядерных нейтрофилов, что характерно и для других стареющих млекопитающих, а также единичные изменения в ферментном профиле желудочно-кишечного тракта и антиоксидантной защите тканей, вероятно, не снижающие общую функциональность каждой из этих систем. У песцов, в отличие от лисиц, не обнаружено достоверных возрастных изменений лейкоцитарной формулы, отмечен сдвиг в проксимальном направлении протеолитической ферментной цепи, а также более высокая подверженность антиоксидантным возрастным изменениям, что выразилось, в частности, в повышенном накоплении α -токоферола практически во всех изученных органах. Показана асинхронность возрастных изменений изученных показателей в органах у разводимых в неволе лисиц и песцов.

Ключевые слова: *Vulpes vulpes*; *Vulpes lagopus*; лейкоцитарная формула; пищеварительные ферменты; антиоксиданты; поздний постнатальный онтогенез; старение; гомеостаз.

S. N. Sergina, V. A. Ilyukha, L. B. Uzenbaeva, E. P. Antonova, I. V. Baishnikova, A. V. Morozov, A. G. Kizhina, E. F. Pechorina, I. I. Okulova.
MODIFICATION OF PHYSIOLOGICAL SYSTEMS IN SILVER FOXES AND ARCTIC FOXES DURING LATE POSTNATAL ONTOGENY

The study aimed to determine the white blood cell (WBC) count and differential, the activity of digestive enzymes and the tissue level of some antioxidants in two Canidae species, which are closely related but differ in ecological characteristics, silver fox (*Vulpes vulpes*) and Arctic fox (*V. lagopus*), aged 0.5, 3.5 and 5.5 years. We demonstrated the species-specificity of some of the studied indices. Compared to silver foxes, Arctic foxes

had higher activities of antioxidant enzymes, higher α -tocopherol content, lower glutathione level, higher stomach proteolytic and small intestine lipolytic activities, but lower pancreatic amylase activity. In silver foxes, the lymphocyte count decreased, while segmented neutrophil count increased with age, similarly to other aging mammals. Besides that, there was a minor age-related change in the activity of digestive enzymes and the tissue antioxidant defense in silver foxes. In contrast to red foxes, Arctic foxes demonstrated no significant age-related modifications of the WBC count and differential, but the proteolytic activity of the gastrointestinal tract changed in the proximal direction and the levels of antioxidants (especially α -tocopherol content) were significantly modified in the course of aging. Our results showed the asynchrony in the age-associated changes of the studied indices in farm-bred silver and Arctic foxes.

Key words: *Vulpes vulpes*; *Vulpes lagopus*; white blood cell count and differential; digestive enzymes; antioxidants; late postnatal ontogeny; aging; homeostasis.

Введение

Несмотря на огромное и все возрастающее количество работ, посвященных позднему постнатальному онтогенезу и процессам старения, последнее по-прежнему остается одним из наименее изученных феноменов. Для стареющего организма характерен прогрессирующий дисбаланс в центральных регуляторных системах, включая гормональные, аутокринные, нейроэндокринные и иммунные механизмы гомеостаза [Jin, 2010]. Вследствие этого с возрастом происходит нарушение функционирования физиологических систем и снижение устойчивости, или адаптируемости, к стрессирующим факторам [Дильман, 1986; Mangoni, Jackson, 2003].

Среди множества теорий, объясняющих механизмы и причины старения, к наиболее известным относятся свободнорадикальная, эволюционные и теория запрограммированного старения. Согласно первой, с возрастом в результате ухудшения функционального состояния митохондрий повышается образование активных форм кислорода (АФК), и наряду с этим снижается и надежность системы эндогенных антиоксидантов, что способствует свободнорадикальному повреждению клетки и развитию возрастных патологий [Harman, 1986; Judge et al., 2005]. Центральная идея эволюционных теорий старения (теории антагонистической плейотропии и расходуемой сомы) – компромисс между репродукцией в раннем возрасте и поддержанием физиологических функций в позднем онтогенезе [Kirkwood, Austad, 2000; Williams, Day, 2003]. Теория запрограммированного старения гласит, что старение является результатом последовательного включения и выключения определенных генов, ответственных, в частности, за «изнашивание» иммунной и эндокринной систем с возрастом [Jin, 2010].

Большинство исследований влияния возраста на различные функциональные системы

млекопитающих проводятся на лабораторных животных. Тем не менее развитие механизмов поддержания гомеостаза (фагоцитоз, репарация, антиоксидантная защита, пищеварительная функция, терморегуляция и др.) в процессе онтогенеза у разных видов происходит по-разному [Gaál et al., 1996]. Именно этим, на наш взгляд, объясняются противоречивые результаты, получаемые в разных исследованиях. В одних показаны изменения состава крови (в т. ч. уменьшение уровня лимфоцитов) у крыс [Kondratov et al., 2006; Абрашова и др., 2010], а также снижение эффективности антиоксидантной защиты с возрастом [Sohal et al., 1990; Rao et al., 1990], в других – относительная стабильность этих показателей у крыс и собак [Lloyd, McCay, 1955; Buffington et al., 1989; Matsuo et al., 1992; Пименов, 1993; Lorenzo et al., 1999; Buddington et al., 2003].

Следует отметить, что лабораторные условия существенно отличаются от условий обитания диких животных в природе, которые, по всей видимости, также оказывают влияние на характер онтогенетических изменений и на механизмы действия отбора [Nussey et al., 2013]. Использование в геронтологических исследованиях немодельных объектов (например, диких животных) способствует выявлению механизмов, регулирующих старение и восстанавливающих возрастные повреждения в генетически гетерогенных популяциях долгоживущих видов, которые испытывают влияние внешней среды [Nussey et al., 2013].

В доступной литературе практически отсутствуют сведения о возрастных изменениях физиологических систем у животных, разводимых в неволе, но не утративших биологические особенности, присущие их диким предкам. К таким видам животных относятся, в частности, объекты пушного звероводства – лисицы и песцы – два близкородственных, но различающихся по экологическим особенностям вида,

принадлежащих к семейству Canidae. В отличие от песца, приспособленного к жизни в суровом арктическом климате, лисица не имеет узкоспециализированных адаптаций, в связи с чем, вероятно, имеет самый обширный географический ареал среди представителей отряда Carnivora [Canids..., 2004]. Ранее было показано, что дефинитивный профиль активности пищеварительных ферментов, а также ферментов антиоксидантной защиты у песцов формируется уже в раннем постнатальном онтогенезе [Олейник, 1997; Илюха, 2004]. Тем не менее сведения о том, претерпевают ли изменения эти и другие физиологические показатели в позднем постнатальном онтогенезе у лисиц и песцов, фрагментарны или отсутствуют.

В неволе лисицы живут до 10–12, а песцы 8–10 лет, тогда как в природе средняя продолжительность жизни этих видов достигает 3 лет [Canids..., 2004]. Половозрелыми особи становятся в 9–11 месяцев, максимальная продуктивность лисицы приходится на 3–5-летний возраст [Чекалова, 2007], тогда как песцы приносят больше щенков в 2–3-летнем возрасте, к 5-летнему возрасту показатели воспроизводства достоверно снижаются, но репродуктивная способность сохраняется до 6 лет [Ilyukha et al., 1997].

Считается, что на процесс старения животного огромное воздействие оказывают уровень клеточного метаболизма, эффективность репарации генома и механизмов защиты (в т. ч. антиоксидантной) клетки, которые устраняют повреждения тканей [Economos, 1982]. В связи с этим, а также ввиду недостаточной изученности влияния возраста на гомеостаз-поддерживающие системы у хищных млекопитающих целью нашего исследования явилось изучение особенностей лейкоцитарной формулы, ферментного профиля желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и уровня некоторых антиоксидантов в тканях у лисиц и песцов трех возрастных групп: неполовозрелые (0,5 года), половозрелые (3,5 года) и стареющие (5,5 года).

Материалы и методы исследования

Лабораторные исследования выполнены на приборно-аналитической базе Центра коллективного пользования научным оборудованием Института биологии Карельского научного центра РАН с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным и правил проведения работ с использованием экспериментальных животных [Этическая экспертиза..., 2005]. Объектами исследования явились самки представителей семейства Canidae: лисицы (*V. vulpes*)

серебристо-черной породы (♀) и песцы (*V. lagopus*) серебристой породы (♀) в возрасте 0,5 (10 лисиц и 13 песцов), 3,5 (3 лисицы и 13 песцов) и 5,5 (7 лисиц и 8 песцов) года.

Животные содержались на общехозяйственном рационе согласно рекомендациям для этих видов, вода предоставлялась *ad libitum*. Обменная энергия вычислялась на основе табличных значений пищевых ингредиентов. Состав пищи был следующим (г/418 кДж обменной энергии): мясные субпродукты (5–10), костные субпродукты (6–10), рыбная мука (15–20), рыбный фарш (3–5), зерновые (14,5–15,5), овощи (8–10), сухие дрожжи (2), жир (1–2). К основному рациону добавляли 15 мг витамина Е на зверя.

Образцы крови и органов отбирали в период планового забоя животных на звероферме, органы замораживали и хранили до анализа при –25 °С. В крови определяли содержание гемоглобина (Hb), общего белка, количество эритроцитов и лейкоцитов по общепринятым методам [Берестов, 1971]. Определение содержания различных типов лейкоцитов проводили на мазках периферической крови, окрашенных по Паппенгейму, с использованием светового микроскопа Axioscop 40 (Carl Zeiss) с цветной цифровой видеокамерой (Pixera 150ES) и компьютерной системой анализа изображений «Видеотест».

Для оценки ферментного статуса ЖКТ спектрофотометрически определяли активность следующих ферментов: пепсина – в слизистой желудка, α-амилазы, липазы и общую протеолитическую активность (ОПА) – в поджелудочной железе и проксимальной части тонкой кишки, как описано ранее [Олейник, 1997]. Активность ферментов выражали в мкмоль продуктов гидролиза (для амилазы – в мг крахмала), образующихся за 1 мин в расчете на 1 г ткани.

В образцах печени, почек, легких, селезенки, сердечной и скелетной мышц были проанализированы концентрации α-токоферола и ретинола методом ВЭЖХ [Скурихин, Двинская, 1989], активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, а также содержание восстановленного глутатиона (GSH) – спектрофотометрически.

Для определения активности антиоксидантных ферментов и содержания белка гомогенаты тканей готовили в 0,05 М фосфатном буферном растворе (рН 7,0). После центрифугирования при 6000 g в течение 15 мин в полученных супернатантах спектрофотометрически измеряли активность ферментов: СОД – по модифицированной адренохромной методике [Misra,

Таблица 1. Гематологические показатели (M±s.e.m.) лисиц и песцов разного возраста

Гематологические показатели							
Вид животных	Возраст, лет	Hb, г/100 мл	Э, 10 ¹² /л	Общий белок, г/100 мл	Лейкоциты, 10 ⁹ /л		
Лисица	0,5	18,29 ± 0,30	8,97 ± 0,28	6,97 ± 0,12	6,07 ± 0,68		
	3,5	17,47 ± 0,67	8,60 ± 0,21	7,14 ± 0,37	5,10 ± 0,67		
	5,5	18,72 ± 0,56	9,08 ± 0,04	7,85 ± 0,20*	4,59 ± 0,38		
Песец	0,5	17,61 ± 0,39	8,04 ± 0,33	7,18 ± 0,12	6,60 ± 0,80		
	3,5	19,13 ± 0,70	8,80 ± 0,24	7,31 ± 0,12	4,37 ± 0,36		
Лейкоцитарная формула							
Вид животных	Возраст, лет	Относительное содержание различных типов лейкоцитов, %					
		L	M	PN	SN	E	B
Лисица	0,5	55,30 ± 3,47	3,90 ± 0,46	1,90 ± 0,53	36,60 ± 3,07	2,30 ± 0,42	0
	3,5	33,33 ± 3,93*	4,67 ± 1,45	6,33 ± 1,86*	42,33 ± 1,33	13,33 ± 2,67*	0
	5,5	31,86 ± 3,93*	4,43 ± 0,65	1,71 ± 0,75	55,43 ± 4,01*	6,57 ± 1,07*	0
Песец	0,5	56,20 ± 5,57	4,00 ± 0,55	3,80 ± 1,50	31,20 ± 4,97	4,60 ± 1,96	0,2 ± 0,2
	3,5	48,00 ± 5,04	5,40 ± 0,93	1,40 ± 0,60 [∇]	40,40 ± 3,19	4,80 ± 1,77	0

Примечание. Hb – гемоглобин, Э – эритроциты, L – лимфоциты, M – моноциты, PN – палочкоядерные, SN – сегментоядерные нейтрофилы, E – эозинофилы, B – базофилы. *Различия достоверны (p < 0,05, критерий Вилкоксона) по сравнению с 0,5-годовалыми животными того же вида.

Fridovich, 1972], а каталазы – по количеству разложенной H₂O₂ [Bears, Sizer, 1952]. За 1 усл. ед. активности СОД принимали количество фермента, способное затормозить реакцию автоокисления адреналина на 50 %, а за 1 ед. активности каталазы принимали количество мкмоль H₂O₂, разложенной за 1 минуту. Содержание белка определяли по методу Лоури [Lowry, Rosenbrough, 1951] с использованием в качестве стандарта бычьего сывороточного альбумина. Удельную активность антиоксидантных ферментов рассчитывали на 1 мг белка.

Содержание GSH определяли по методу Эллмана [Sedlak, Lindsay, 1968] и выражали в мкмоль/г ткани. Для этого готовили гомогенаты тканей органов в 0,02 М ЭДТА-Na₂, после центрифугирования (в течение 15 мин при 5000 g) к супернатантам добавляли 50% ТХУ для осаждения белков, затем вновь центрифугировали (15 мин при 3000 g). В полученных супернатантах после добавления 0,4 М трис-буферного раствора и реактива Эллмана (рН полной реакционной смеси составлял 8,0) спектрофотометрически (λ = 412 нм) определяли уровень GSH.

Полученные данные обрабатывали общепринятыми статистическими методами, используя пакеты программ MS Excel и Statgraphics. Для сравнения показателей между группами применяли непараметрический критерий (U) Вилкоксона – Манна – Уитни. Для оценки влияния факторов «возраст» и «вид» применяли одно- и многофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Статистически значимыми считали различия с p < 0,05.

Результаты и обсуждение

Видовая специфика изученных показателей

Принадлежность лисицы и песца к одному роду *Vulpes*, вероятно, определила отсутствие видовых различий гематологических показателей (табл. 1), кроме единственного различия в содержании палочкоядерных нейтрофилов у животных в возрасте 3,5 года (ANOVA, p < 0,05). Тем не менее другими авторами [Берестов, 1971] ранее отмечалось, что лисицы отличаются от песцов более низким уровнем сегментоядерных нейтрофилов (SN) и моноцитов и более высоким содержанием лимфоцитов (L).

В естественной среде обитания и в условиях клеточного содержания песцы и лисицы очень близки по типу обмена веществ и характеру питания [Берестов, 1971; Rouvinen, 1991; Canids..., 2004]. Однако состав пищи, потребляемой видами в природе, неодинаков. Основу рациона песца составляют мелкие грызуны, зайцы, птицы и их яйца, а также трупы морских млекопитающих, тогда как всеядная лисица потребляет широкий спектр видов животных – от беспозвоночных (в т. ч. червей и жуков) до млекопитающих и птиц, а также ягоды [Canids..., 2004]. Основываясь на различиях в привычном рационе диких лисиц и песцов, логично предположить, что ферментный профиль ЖКТ также должен различаться у этих двух видов, поскольку контролируется генетически и является результатом эволюционно сложившейся адаптации к доступным пищевым ресурсам [Rouvinen, 1991].

Таблица 2. Активность пищеварительных ферментов ($M \pm s.e.m.$) у лисиц и песцов разного возраста

Вид	Возраст, лет	Пепсин, мкмоль*мин/г ткани	ОПА, мкмоль*мин/г ткани		Амилаза, мг*мин/г ткани		Липаза, мкмоль*мин/г ткани	
		Желудок	Поджелудочная железа	Тонкая кишка	Поджелудочная железа	Тонкая кишка	Поджелудочная железа	Тонкая кишка
Лисица	0,5	29,95 ± 2,92	65,32 ± 7,08	1,42 ± 0,13	168,44 ± 2,15	3,92 ± 1,11	0,66 ± 0,16	0,18 ± 0,03
	3,5	28,08 ± 1,22	48,81 ± 7,32	2,09 ± 0,23	151,74 ± 5,43*	4,67 ± 1,35	0,24 ± 0,04	0,34 ± 0,03*
	5,5	23,35 ± 2,88	54,34 ± 0,74	1,49 ± 0,14	172,20 ± 2,64	4,52 ± 0,59	0,21 ± 0,09	0,33 ± 0,14
Песец	0,5	28,98 ± 2,14	73,57 ± 0,73	1,00 ± 0,17	96,31 ± 12,84♦	2,70 ± 0,31	0,38 ± 0,02	5,04 ± 1,24
	3,5	42,93 ± 3,24*♦	60,00 ± 2,91*	1,50 ± 0,29	113,14 ± 3,59♦	3,98 ± 1,08	0,36 ± 0,06	3,22 ± 0,83
	5,5	-	-	-	-	-	-	6,46 ± 0,65♦♦

Примечание. Здесь и далее в таблицах и на рисунках: *различия достоверны ($p < 0,05$, критерий Вилкоксона) по сравнению с 0,5-годовалыми животными того же вида в той же ткани; ♦ – по сравнению с 3,5-годовалыми животными того же вида в той же ткани; ♦♦ – по сравнению с лисицами того же возраста в той же ткани.

При сравнении особенностей пищеварения у диких песцов, потребляющих пищу с преимущественным содержанием белка и жира, и песцов, содержащихся на рационе звероводческих ферм более 80 генераций, не выявлено различий в переваривании белка и жира [Ahlström et al., 2003]. Тем не менее разводимые в неволе песцы по сравнению с дикими сородичами обладают способностью более эффективно переваривать углеводы, что, скорее всего, является результатом длительной селекции животных в условиях неволи.

В нашем исследовании показано, что по сравнению с лисицами тех же возрастных групп песцы в возрасте 3,5 года характеризовались более высокой активностью пепсина, в 0,5 и 3,5 года – более низкой активностью панкреатической амилазы, а в 5,5 года – более высокой активностью липазы тонкого кишечника (табл. 2). Отмечено достоверное влияние видовой принадлежности на активность амилазы, липазы и ОПА в тонком кишечнике, а также на активность амилазы в поджелудочной железе (ANOVA, $p < 0,05$).

Несмотря на то что лисицы и песцы содержались на одном и том же рационе, содержание витаминов А и Е в их тканях также различалось, что, скорее всего, связано с видовыми особенностями накопления этих нутриентов. Другие авторы [Rouvinen, 1991] также отмечают различия в содержании ретинола и токоферола в печени песцов и лисиц при кормлении животных пищей с разным содержанием полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Для организма млекопитающих витамин Е крайне важен, поскольку, являясь мощным антиоксидантом, он защищает мембраны клеток животных от перекисной деструкции [Niki, 2014]: при его дефиците поступающие с пищей окисленные ПНЖК вызывают анемию и распад эритроцитов, задержку роста, депигментацию волос, мышечную

дистрофию и смерть [Rouvinen, 1991]. Отмечают, что уровень витамина Е в печени песца, но не лисицы, коррелирует с содержанием жира в этом органе [Rouvinen, 1991]. Помимо этого, как в природе, так и в условиях неволи песцы накапливают значительно больше жировых запасов, по сравнению с лисицами, в осенний период [Rouvinen, 1991; Canids..., 2004].

В нашем исследовании все изученные органы песцов, кроме почек, содержали в 2–3 раза больше витамина Е, чем соответствующие ткани лисиц; в почках это различие было еще более выраженным, а именно 5–10-кратным (табл. 3). Отмечалось достоверное влияние видовой принадлежности на содержание в тканях токоферола (ANOVA, $p < 0,05$), но не ретинола (ANOVA, $p > 0,05$). Причины этого могут заключаться в разном притоке липидов плазмы к тканям для удовлетворения их энергетических потребностей [Надилов, 1991], которые у песцов наиболее значительны для почек и связаны с экологическими особенностями вида [Наточин, 1982]. Кроме того, именно почки у Canidae отличаются очень высоким содержанием ретинола, что отмечалось ранее другими авторами [Schweigert, Buchholz, 1995] и также было зафиксировано в нашем исследовании. Высокий уровень ретинола у представителей семейства Canidae, как предполагается, связан с экскрецией больших его количеств (до 60 % ежедневного потребления) с мочой, что, возможно, является защитой от интоксикации витамином А [Schweigert, Buchholz, 1995].

При изучении уровня других антиоксидантов выявлено, что песцы характеризуются более высокой активностью ферментов СОД и каталазы (рис. 1, 2), которые составляют первую линию защиты от потенциально опасных АФК. Супероксиддисмутаза катализирует реакцию дисмутации супероксидного анион-радикала в пероксид водорода, который, в свою очередь,

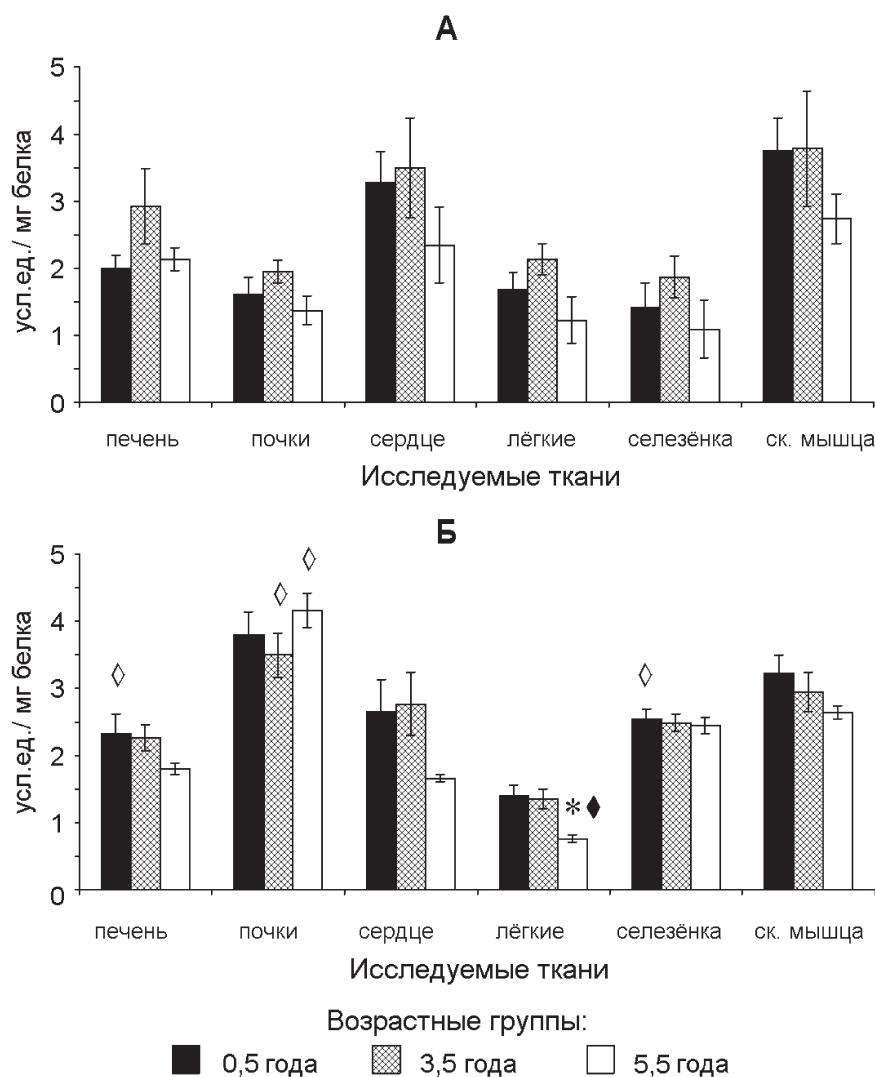


Рис. 1. Активность СОД (M±s.e.m.) в тканях органов лисиц (А) и песцов (Б) разного возраста

разлагается до кислорода и воды с помощью каталазы и/или глутатион-пероксидазы (ГПО), которая использует GSH как кофактор и имеет большее сродство к субстрату (пероксиду водорода), чем каталаза. Глутатион – низкомолекулярный тиол, выполняющий многообразные функции, в том числе и антиоксидантные, взаимодействуя с АФК (гидроксил-радикал, HOCl и др.), а также в качестве кофактора глутатионзависимых ферментов [Lei et al., 2016]. Тем не менее содержание GSH у песцов оказалось ниже, чем у лисиц (табл. 4). Другие исследователи [Rouvinen, 1991] отмечают, что уровень микроэлемента селена, кофактора ГПО, зависит от состава пищи и различается у лисиц и песцов. Отмечалось достоверное влияние видовой принадлежности на активность антиоксидантных ферментов и содержание GSH практически во всех изученных органах (ANOVA, $p < 0,05$).

Таким образом, нами были обнаружены видовые различия в содержании и активности изученных антиоксидантов, а также в активности пищеварительных ферментов, но не гематологических показателей у лисиц и песцов. Эти различия, по всей видимости, являются отражением эволюционно сложившихся взаимоотношений между организмом и средой обитания у разных видов.

Возрастная специфика изученных показателей у лисиц

Содержание Hb, количество эритроцитов и лейкоцитов периферической крови у лисиц с возрастом не изменялись, только у 5,5-летних животных выявлено повышение общего белка по сравнению с 0,5-годовалыми особями (табл. 1).

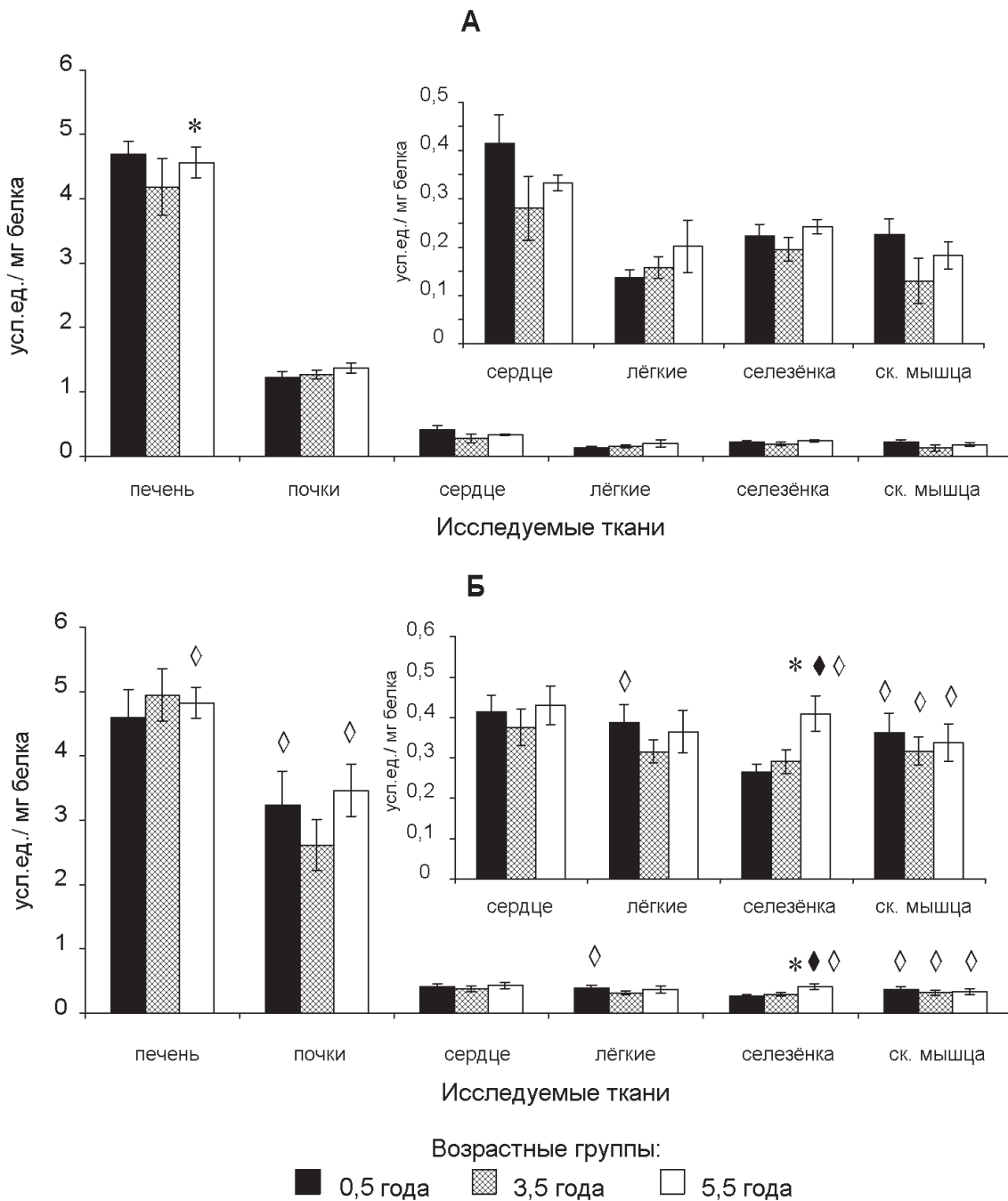


Рис. 2. Активность каталазы ($M \pm s.e.m.$) в тканях органов лисиц (А) и песцов (Б) разного возраста

В оценке неспецифической иммунореактивности организма одним из наиболее информативных показателей является определение лейкоцитарной формулы. У лисиц с возрастом отмечалось снижение уровня лимфоцитов, а также увеличение сегментоядерных нейтрофилов и эозинофилов (табл. 2). В литературе также описаны сведения, когда содержание некоторых типов лейкоцитов у млекопитающих изменяется в течение всей жизни. Так, у лабораторных крыс и морских свинок количество L с возрастом снижается, причем наиболее

низкие значения отмечены у старых животных [Kitagaki et al., 2005; Узенбаева и др., 2012]. Изменения SN находились в противофазе с L и заключались в увеличении их уровня по мере старения. Показано достоверное влияние возраста на содержание общего белка (ANOVA: $F = 6,93$; $df = 2$; $p = 0,006$), количество L (ANOVA: $F = 12,36$; $df = 2$; $p = 0,001$), PN (ANOVA: $F = 6,41$; $df = 2$; $p = 0,008$), SN (ANOVA: $F = 8,13$; $df = 2$; $p = 0,003$) и эозинофилов (ANOVA: $F = 23,51$; $df = 2$; $p = 0,000$). Имеется лишь небольшое количество публикаций, посвященных изучению

Таблица 3. Содержание α-токоферола и ретинола (M±s.e.m.) в тканях органов лисиц и песцов разного возраста

Витамин Е, мкг / г ткани							
Вид	Возраст, лет	Ткани органов					
		Печень	Почки	Сердце	Легкие	Селезенка	Скелетн. мышца
Лисица	0,5	12,36 ± 0,79	20,79 ± 4,78	6,93 ± 0,84	6,92 ± 0,46	6,51 ± 0,65	7,35 ± 1,02
	3,5	13,24 ± 0,20	6,89 ± 1,79	5,31 ± 1,32	6,02 ± 1,20	3,96 ± 1,00	12,20 ± 2,75
	5,5	12,05 ± 1,10	26,64 ± 8,58	5,99 ± 0,77	5,96 ± 0,73	6,85 ± 0,39♦	2,72 ± 0,98*♦
Песец	0,5	22,11 ± 4,06	106,77 ± 29,71	22,40 ± 4,97	19,37 ± 2,84 ♦	18,17 ± 3,73	20,37 ± 3,06 ♦
	3,5	24,12 ± 4,48	156,73 ± 39,30	26,33 ± 5,29	17,12 ± 2,84	23,08 ± 4,59	24,56 ± 3,93
	5,5	27,76 ± 1,37 ♦	270,22 ± 21,00*♦	38,98 ± 1,28 *♦	27,07 ± 1,06 ♦♦	34,76 ± 1,75*♦	33,57 ± 3,82 ♦

Витамин А, мкг / г ткани						
Вид	Возраст, лет	Ткани органов				
		Печень	Почки	Сердце	Легкие	Селезенка
Лисица	0,5	0,59 ± 0,08	105,24 ± 7,76	0,27 ± 0,05	0,18 ± 0,03	0,32 ± 0,06
	3,5	0,60 ± 0,04	193,81 ± 29,82*	0,18 ± 0,04	0,21 ± 0,11	0,21 ± 0,02
	5,5	0,86 ± 0,20	153,61 ± 21,23	0,33 ± 0,07	0,27 ± 0,04	0,26 ± 0,13
Песец	0,5	0,54 ± 0,09	91,10 ± 31,78	0,09 ± 0,06	-	0,29 ± 0,04
	3,5	0,38 ± 0,05 ♦	153,75 ± 13,66	0,23 ± 0,06	-	0,40 ± 0,08 ♦

Таблица 4. Содержание восстановленного глутатиона (мкмоль / г ткани; M±s.e.m.) в тканях органов лисиц и песцов разного возраста

Ткани органов							
Вид	Возраст, лет	Ткани органов					
		Печень	Почки	Сердце	Легкие	Селезенка	Скелетн. мышца
Лисица	0,5	17,92 ± 0,57	27,00 ± 1,23	24,76 ± 1,48	20,42 ± 0,52	22,60 ± 1,22	5,25 ± 0,63
	3,5	16,54 ± 0,97	28,55 ± 1,73	23,83 ± 0,78	20,50 ± 0,95	19,39 ± 1,10	4,27 ± 0,91
	5,5	18,70 ± 0,74	25,72 ± 1,88	23,11 ± 0,20	20,64 ± 0,40	19,44 ± 0,07	3,50 ± 0,11
Песец	0,5	14,35 ± 2,08	13,50 ± 1,93 ♦	16,83 ± 1,88 ♦	22,74 ± 1,33	19,78 ± 0,77	6,45 ± 0,27
	3,5	13,19 ± 1,85	11,35 ± 1,86 ♦	16,27 ± 1,96	21,49 ± 0,53	19,92 ± 0,66	5,99 ± 0,16
	5,5	11,77 ± 0,27	4,30 ± 0,19*♦	12,70 ± 0,30	-	-	-

влияния возраста на способность ЖКТ собак переваривать и всасывать питательные вещества (белки, жиры и углеводы) [Lloyd, McCay, 1955; Buffington et al., 1989; Buddington et al., 2003]. Результаты позволяют заключить, что у большинства собак эффективность пищеварения поддерживается на определенном уровне по мере того, как животные стареют.

Исследования онтогенетических изменений функционирования ЖКТ у собак показали снижение массы поджелудочной железы [Маховых, 2004] и увеличение риска возникновения экзокринной узловой гиперплазии этого органа с возрастом [Newman et al., 2005]. Ферментный профиль ЖКТ у взрослых собак по сравнению с щенками характеризовался более высокой активностью желудочного пепсина и панкреатических амилазы, липазы и хитотрипсина, а также относительной стабильностью активности последних трех указанных ферментов в тонком кишечнике [Buddington et al., 2003].

В позднем постнатальном онтогенезе лисиц активность пепсина в желудке, ОПА в поджелудочной железе и тонком отделе кишечника, активность панкреатической липазы и амилазы в тонком кишечнике не претерпела возрастных изменений (табл. 2). В 3,5 года активность панкреатической амилазы снизилась, тогда как активность липазы в тонком отделе кишечника повысилась по сравнению с неполовозрелыми особями. Тем не менее различий в активности пищеварительных гидролаз между 5,5-летними и 0,5-годовалыми лисицами не наблюдалось. Достоверное влияние возраста отмечено только на активность панкреатической амилазы (ANOVA: F = 8,45; df = 2; p = 0,014).

При изучении возрастных изменений антиоксидантной защиты у других млекопитающих (людей, крыс и мышей) показано либо снижение уровня отдельных антиоксидантов с возрастом [Rao et al., 1990; Sohal et al., 1990], либо их стабильность [Matsuo et al., 1992; Lorenzo et al., 1999]. У лисиц активность СОД (рис. 1)

и уровень GSH (табл. 4) с возрастом также не изменялись, тогда как у 5,5-летних животных по сравнению с более молодыми особями активность каталазы в печени снизилась (рис. 2), а содержание витамина Е в селезенке увеличилось, но в скелетной мышце снизилось (табл. 3). В 3,5 года уровень витамина А в почках увеличился по сравнению с неполовозрелыми животными (табл. 3). Среди всех изученных антиоксидантов достоверное влияние возраста отмечалось только на содержание витамина Е в скелетной мышце (ANOVA: $F = 10,18$; $df = 2$; $p = 0,001$) и ретинола в почках (ANOVA: $F = 7,02$; $df = 2$; $p = 0,007$).

Таким образом, у лисиц наиболее чувствительными к влиянию возраста оказались лейкоцитарная формула, активность панкреатической амилазы, уровень токоферола в скелетной мышце и ретинола в почках.

Возрастная специфика изученных показателей у песцов

Гематологические показатели, уровень ретинола и активности пищеварительных ферментов (кроме липазы в тонком кишечнике) были исследованы нами только у песцов в возрасте 0,5 и 3,5 года.

Как и у лисиц, у песцов с возрастом не менялось содержание Hb, общего белка и количество эритроцитов периферической крови (табл. 1). Отмечено достоверное влияние возраста на содержание лейкоцитов (ANOVA: $F = 6,48$; $df = 1$; $p = 0,035$). Тем не менее, в отличие от лисиц, достоверных возрастных различий в содержании типов лейкоцитов у песцов двух возрастных групп обнаружено не было (табл. 1). Ранее при исследовании лейкоформулы у песцов в возрасте 0,5; 2,5 и 4,5 года нами также не было обнаружено достоверных возрастных различий [Сергина и др., 2016]. Животные исследованных возрастных групп характеризовались примерно равным соотношением L и SN: на долю L в среднем приходилось 41,2–43,0 %, а содержание SN колебалось от 37,4 до 39,6 %. Уровень моноцитов и эозинофилов у песцов также не претерпевал значительных возрастных изменений. Юные нейтрофилы и базофилы в крови выявлены не были. По другим сведениям, полученным на песцах в возрасте от 1 до 5 лет [Piotrowska et al., 2008], животные первого года жизни имеют значительные различия в лейкоцитарном профиле по сравнению с 2-, 3-, 4- и 5-летними особями и характеризуются высоким уровнем L и пониженным содержанием гранулоцитов. В последующие периоды онтогенеза у этих

животных изменения в лейкоцитарной формуле не выявляются.

В отличие от лисиц, возрастные изменения активности ферментов ЖКТ у песцов выражались в увеличении уровня пепсина в желудке (ANOVA: $F = 2,92$; $df = 1$; $p = 0,007$) и снижении ОПА в поджелудочной железе (ANOVA: $F = 20,49$; $df = 1$; $p = 0,002$) (табл. 2), что свидетельствует о сдвиге в проксимальном направлении протеолитической ферментной активности с возрастом. Подобные изменения отмечены для хищников (норок) при увеличении количества протеина в пище [Олейник, 1997]. Выявлены также колебания уровня липазы в тонком отделе кишечника: к 3,5 года активность фермента снизилась, а к 5,5 – увеличилась до уровня неполовозрелых особей. Наши результаты частично согласуются с данными, полученными другими авторами на стареющих собаках [Buddington et al., 2003].

С возрастом у песцов во всех изученных органах, кроме печени и скелетной мышцы, возрастает содержание витамина Е (табл. 3) (ANOVA: почки: $F = 4,89$; $df = 2$; $p = 0,015$; селезенка: $F = 4,06$; $df = 2$; $p = 0,028$). Токоферол защищает мембраны клеток от перекисной деструкции и непосредственно взаимодействует с АФК. Совместно с аскорбатом витамин Е способствует включению селена в состав активного центра ГПО, тем самым активизируя ферментативную антиоксидантную защиту [Niki, 2014]. Вероятно, увеличение в тканях песцов уровня токоферола, который обладает мембраностабилизирующим эффектом и способностью экономить потребление кислорода клетками в митохондриях [Агаджанян и др., 2013], носит адаптивный характер, поскольку с возрастом тканеспецифически увеличивается чувствительность мембранных липидов к перекисному окислению [Naudí i Farré et al., 2013].

Ранее было показано увеличение уровня витамина Е с возрастом у хищника Арктики – полярного медведя, что, вероятно, является отражением изменения рациона у взрослых особей и/или связано с нагрузкой поллютантами [Bechshoft et al., 2016]. Результаты других исследований свидетельствуют о накоплении [Matsuo et al., 1992] или снижении [Kamzalov, Sohal, 2004] уровня токоферола в органах стареющих крыс.

В отличие от лисиц у песцов не было выявлено достоверного влияния возраста на содержание ретинола в тканях ($p > 0,05$, критерий Вилкоксона, ANOVA), но у антиоксидантной защиты тканей отмечена более высокая подверженность возрастным изменениям: активность СОД в легких снижалась (ANOVA: $F = 4,93$;

df = 2; p = 0,014) (рис. 1), уровень каталазы в селезенке повышался (ANOVA: F = 4,89; df = 2; p = 0,015) (рис. 2), а содержание GSH в почках снижалось (ANOVA: F = 6,18; df = 2; p = 0,006) (табл. 3), что может свидетельствовать об активном участии GSH в антиоксидантной защите ткани, в том числе и в реакциях регенерации антиоксидантных витаминов С и Е.

Результаты нашего исследования онтогенетических особенностей тканевой антиоксидантной защиты как у лисиц, так и у песцов в некоторой степени согласуются с данными других исследователей [Rao et al., 1990; Sohal et al., 1990; Matsuo et al., 1992; Lorenzo et al., 1999] и свидетельствуют о взаимокompенсаторном характере изменений изученных показателей. Тем не менее общая антиоксидантная мощность тканей животных отличается относительной стабильностью в течение жизни, хотя отмечаются некоторые изменения тех или иных антиоксидантов в отдельных органах.

Возрастные изменения изученных показателей у песцов могут быть связаны с изменениями основного обмена животных в течение жизни. У всех незрелорождающихся млекопитающих установлено первоначальное повышение уровня основного обмена от момента рождения до определенного возраста с последующим его падением по мере старения [Махинько, Никитин, 1975]. Результаты исследований А. Е. Михайловой [1974] показали, что возрастная динамика потребления кислорода у песцов имеет плавный характер и постепенно снижается с увеличением возраста зверей.

Таким образом, у песцов в отличие от лисиц были выявлены возрастные изменения в уровне лейкоцитов крови, активности пепсина в желудке, ОПА в поджелудочной железе, содержании витамина Е в почках и селезенке, GSH в почках, активности СОД в легких и каталазы в селезенке.

Заключение

Результаты нашего исследования свидетельствуют о видовой специфике изученных показателей у лисиц и песцов. Межвидовые различия, по всей видимости, являются отражением эволюционно сложившихся взаимоотношений между организмом и средой обитания у разных видов. Лисица, имеющая очень обширный географический ареал и конкурирующая на его северной границе с песцом, несмотря на некоторые преимущества, все же уступает ему в адаптациях к холоду, которые у песца развиты лучше (70 % меха песца составляет подпушь, тогда как у лисицы на его долю приходится

лишь 20 %, нижняя критическая температура у песца -40°C , а у лисицы -13°C) [Klir, Heath, 1992]. Разводимые в неволе песцы отличаются от серебристо-черных лисиц более поздними (на 2–4 недели) сроками размножения и более интенсивным энергетическим обменом (значительно бóльшая плодовитость самок, повышенная энергия роста молодняка). Эти особенности, характерные для диких сородичей песцов, объясняются поздним наступлением благоприятного для выращивания молодняка летнего периода в Арктике [Овсяников, 1993].

Вероятно, экологические особенности двух близкородственных видов оказали воздействие на изученные показатели животных в позднем постнатальном онтогенезе. С возрастом у лисиц наряду со снижением количества лимфоцитов и увеличением сегментоядерных нейтрофилов, что характерно и для других видов стареющих млекопитающих, наблюдались единичные изменения в антиоксидантной защите тканей и ферментном профиле ЖКТ, вероятно, не снижающие общую функциональность этих систем. У песцов, в отличие от лисиц, не обнаружено достоверных возрастных изменений лейкоцитарной формулы, но отмечен сдвиг в проксимальном направлении протеолитической ферментной цепи, а также выявлена более высокая подверженность тканевой антиоксидантной защиты возрастным изменениям, что выразилось, в частности, в накоплении витамина Е практически во всех изученных органах.

Поскольку песец в дикой природе демонстрирует удивительную экологическую пластичность по отношению к температурному фактору (способен переносить колебания температуры воздуха в диапазоне около 80°C : от $+30$ до -55°C) и накапливает большие запасы жира в осенний период, указанные нами возрастные изменения антиоксидантов, вероятно, необходимы для усиления защиты тканей от перекисного окисления липидов с возрастом.

Наши результаты дают основание считать, что у разводимых в неволе представителей семейства Canidae существует видоспецифическая асинхронность возрастных изменений изученных показателей в органах. На диких животных, как и на человеке и лабораторных млекопитающих, также продемонстрирована асинхронность изменений фенотипических особенностей и функционирования разных органов и систем с возрастом [Walker, Herndon, 2010; Nussey et al., 2013]. Помимо этого, эколого-физиологические черты, присущие разным видам животных, вероятно, определяют адаптивный потенциал вида и влияют на механизмы, регулирующие темпы старения.

Финансовое обеспечение исследования осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (тема № 0221-2014-0001), а также гранта РФФИ мол_а 16-34-00389.

Авторы выражают глубокую признательность к. б. н. Н. Л. Рендакову и д. с.-х. н. Н. Н. Тютюнику за тщательное рассмотрение рукописи и ценные замечания и предложения, которые были учтены при редактировании и способствовали улучшению изложения.

Литература

Абрашова Т. В., Соколова А. П., Селезнева А. И. и др. Вариабельность биохимических и гематологических показателей у лабораторных крыс в зависимости от линии и возраста (сообщение I) // Международный вестник ветеринарии. 2010. № 2. С. 55–60.

Агаджанян З. С., Дорожук А. Д., Ширяева Ю. К., Дмитриев Л. Ф. Роль цитохрома В5 и α-токоферола в микросомальном и митохондриальном окислении // Бюл. эксп. биол. мед. 2013. Т. 156, № 8. С. 156–160.

Берестов В. А. Биохимия и морфология крови пушных зверей. Петрозаводск: Карелия, 1971. 292 с.

Дильман В. М. Большие биологические часы. Введение в интегральную медицину. Изд. 2-е, перераб. и доп. М.: Знание, 1986. 256 с.

Илюха В. А. Антиоксидантные ферменты в физиологических адаптациях млекопитающих (Сравнительно-видовой, онтогенетический и прикладной аспекты): автореф. дис. ... докт. биол. наук. Сыктывкар, 2004. 35 с.

Махинько В. И., Никитин В. Н. Обмен веществ и энергии в онтогенезе // Возрастная физиология. Л.: Наука, 1975. С. 221–259.

Маховых М. Ю. Особенности строения и кровоснабжения поджелудочной железы собак в онтогенезе: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Оренбург, 2004. 178 с.

Михайлова А. Е. Возрастные изменения энергетического метаболизма у молодняка песцов разных сроков рождения // Биология и патология пушных зверей. Петрозаводск, 1974. С. 81–83.

Надиринов Н. К. Токоферолы и их использование в медицине и сельском хозяйстве. М.: Наука, 1991. 336 с.

Наточин Ю. В. Водно-солевой гомеостаз: эволюция и экология // Серия препринтов «Научные доклады». Сыктывкар, 1982. 48 с.

Овсяников Н. Г. Поведение и социальная организация песца. М.: ЦНИЛОХЗ, 1993. 243 с.

Олейник В. М. Характеристика ферментного спектра пищеварительного тракта у хищных млекопитающих: автореф. дис. ... докт. биол. наук. СПб., 1997. 34 с.

Пименов Ю. С. Кровь здоровых людей при старении // Гематол и трансфузиол. 1993. № 3. С. 43–45.

Сергина С. Н., Илюха В. А., Антонова Е. П. и др. Становление физиологических систем у песцов

в онтогенезе // Знания молодых: наука, практика и инновации. Агрономические, биологические, ветеринарные науки: сборник научных трудов XVI Международной научно-практической конференции аспирантов и молодых ученых (Киров, 23 марта 2016 г.). Киров, 2016. Ч. 1. С. 163–167.

Скурихин В. Н., Двинская Л. М. Определение α-токоферола и ретинола в плазме крови сельскохозяйственных животных методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии // С.-хоз. биол. 1989. № 4. С. 127–129.

Этическая экспертиза биомедицинских исследований. Практические рекомендации / Ред. Ю. Б. Белоусова. М.: Российское общество клинических исследователей, 2005. 156 с.

Узенбаева Л. Б., Виноградова И. А., Кижина А. Г. и др. Влияние мелатонина на соотношение нейтрофилов и лимфоцитов в крови млекопитающих зависит от возраста животных // Усп. геронт. 2012. Т. 25, № 4. С. 409–414.

Чекалова Т. М. Эффективность селекции по воспроизводительной способности у песцов (*Alopex lagopus*) и лисиц (*Vulpes vulpes*) в условиях их клеточного разведения на специализированных зверофермах // Вестник ВОГиС. 2007. Т. 11, № 1. С. 195–204.

Ahlstrøm Ø., Fuglei E., Mydland L. T. Comparative nutrient digestibility of arctic foxes (*Alopex lagopus*) on Svalbard and farm-raised blue foxes (*Alopex lagopus*) // Comp. Biochem. Physiol. A. 2003. Vol. 134, no. 1. P. 63–68. doi: 10.1016/S1095-6433(02)00184-8

Bears R. F., Sizer I. N. A spectral method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase // J. Biol. Chem. 1952. Vol. 195, no. 1. P. 133–140.

Bechshoft T., Sonne C., Jakobsen J. et al. Vitamins A and E in liver, kidney, and whole blood of East Greenland polar bears sampled 1994–2008: reference values and temporal trends // Polar Biol. 2016. Vol. 39. P. 743–754. doi: 10.1007/s00300-015-1830-9

Buddington R. K., Elnif J., Malo C., Donahoo J. B. Activities of gastric, pancreatic, and intestinal brush-border membrane enzymes during postnatal development of dogs // Am. J. Vet. Res. 2003. Vol. 64, no. 5. P. 627–634. doi: 10.2460/ajvr.2003.64.627

Buffington C. A. Lack of effect of age on digestibility of protein, fat and dry matter in Beagle dogs. In: Nutrition of the Dog and Cat / Eds. C. A. Buffington, J. E. Branam, G. C. Dunn. Cambridge, UK Cambridge University Press, 1989. 397 p.

Canids: foxes, wolves, jackals and dogs / Eds. C. Sillero-Zubiri, M. Hoffmann, D. W. Macdonald. IUCN – The World Conservation Union, 2004. 430 p.

Economos A. C. Mammalian design and rate of living // Exp. Gerontol. 1982. Vol. 17, no. 2. P. 145–152.

Gaál T., Speake B. K., Mezes M. et al. Antioxidant parameters and ageing in some animal species // Comp. Haematol. Int. 1996. Vol. 6. P. 208–213.

Jin K. Modern biological theories of aging // Aging and Disease. 2010. Vol. 1, no. 2. P. 72–74.

Judge S., Jang Y. M., Smith A. et al. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac intermyofibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging // FASEB J. 2005. Vol. 19, no. 3. P. 419–421. doi: 10.1096/fj.04-2622fje

Ilyukha V. A., Harri M., Rekila T. Reproductive success of farmed blue foxes // *J. Anim. Breed. Genet.* 1997. Vol. 114. P. 465–474.

Harman D. Free radical theory of aging: role of free radicals in the origination and evolution of life, aging and disease process. In: *Biology of aging* / Eds. J. Johnson, R. Walford, D. Harman, J. Miquel. New York: Liss, 1986. P. 3–50.

Kamzalov S., Sohal R. S. Effect of age and caloric restriction on coenzyme Q and α -tocopherol levels in the rat // *Exp. Gerontol.* 2004. Vol. 39, no. 8. P. 1199–1205. doi: 10.1016/j.exger.2004.04.007

Klir J. J., Heath J. E. Metabolic rate and evaporative water loss at different ambient temperatures in two species of fox: the red fox (*Vulpes vulpes*) and the arctic fox (*Alopex lagopus*) // *Comp. Biochem. Physiol.* 1992. Vol. 101A, no. 4. P. 705–707.

Kirkwood T. B. L., Austad S. N. Why do we age? // *Nature.* 2000. Vol. 408. P. 233–238. doi: 10.1038/35041682

Kitagaki M., Yamaguchi M., Nakamura M. et al. Age-related changes in haematology and serum chemistry of Weiser – Maples guinea pigs (*Cavia porcellus*) // *Lab. Animals.* 2005. Vol. 39, no. 3. P. 321–330. doi: 10.1258/0023677054307042

Kondratov R. V., Kondratova A. A., Gorbacheva V. Y. et al. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock // *Genes & Dev.* 2006. Vol. 20, no. 14. P. 1868–1873. doi: 10.1101/gad.1432206

Lorenzo G. D., Balistreri G. R., Candore G. Granulocyte and natural killer activity in the elderly // *Mech. Ageing Dev.* 1999. Vol. 108. P. 25–38.

Lloyd L. E., McCay C. M. The utilisation of nutrients by dogs of different ages // *J. Gerontol.* 1955. Vol. 10. P. 182–187.

Lei X. G., Zhu J.-H., Cheng W.-H. et al. Paradoxical roles of antioxidant enzymes: basic mechanisms and health implications // *Physiol. Rev.* 2016. Vol. 96. P. 307–364. doi: 10.1152/physrev.00010.2014

Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193, no. 1. P. 265–275.

Mangoni A. A., Jackson S. H. D. Age-related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics: basic principles and practical applications // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2003. Vol. 57, no. 1. P. 6–14. doi: 10.1046/j.1365-2125.2003.02007.x

Matsuo M., Gomi F., Dooley M. M. Age-related alterations in antioxidant capacity and lipid peroxidation in brain, liver, and lung homogenates of normal and vitamin E-deficient rats // *Mech. Ageing Dev.* 1992. Vol. 64. P. 273–292.

Misra H. P., Fridovich F. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for

superoxide dismutase // *J. Biol. Chem.* 1972. Vol. 247, no. 10. P. 3170–3175.

Naudí i Farré A., Jové Font M., Ayala Jové M. V. et al. Membrane lipid unsaturation as physiological adaptation to animal longevity // *Front. In Physiol.* 2013. Vol. 4, no. 372. P. 1–13. doi: 10.3389/fphys.2013.00372

Newman S. J., Steiner J. M., Woosley K. et al. Correlation of age and incidence of pancreatic exocrine nodular hyperplasia in the dog // *Vet. Pathol. Online.* 2005. Vol. 42, no. 4. P. 510–513. doi: 10.1354/vp.42-4-510

Niki E. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxyl radical scavenger: in vitro and in vivo evidence // *Free Rad. Biol. Med.* 2014. Vol. 66. P. 3–12. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.022

Nussey D. H., Froy H., Lemaitre J.-F. et al. Senescence in natural populations of animals: Widespread evidence and its implications for bio-gerontology // *Ageing Res. Rev.* 2013. Vol. 112. P. 214–225. doi: 10.1016/j.arr.2012.07.004

Piotrowska A., Szymeczko R., Ozgo M. et al. Morphological and mineral characteristics of peripheral blood in female polar fox in relation to age // *Folia Biol.* 2008. Vol. 56, no. 3–4. P. 263–267. doi: 10.3409/fb.56_3-4.263-267

Rouvinen K. Dietary effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on body fat composition and health status of farm-raised blue and silver foxes // *Acta Agric. Scand.* 1991. Vol. 41, no. 4. P. 401–414.

Schweigert F. J., Buchholz I. Vitamin A metabolism in carnivores with special reference to fur bearing animals // *Scientifur.* 1995. Vol. 19, no. 4. P. 305–307.

Sedlak J., Lindsay R. H. Estimation of total, protein-bound and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent // *Anal. Biochem.* 1968. Vol. 25. P. 192–205.

Sohal R. S., Arnold L. A., Sohal B. H. Age-related changes in antioxidant enzymes and prooxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species // *Free Rad. Biol. Med.* 1990. Vol. 9, no. 6. P. 495–500.

Rao G., Xia E., Richardson A. Effect of age on the expression of antioxidant enzymes in male Fischer F344 rats // *Mech. Ageing Dev.* 1990. Vol. 53, no. 1. P. 49–60.

Walker L. C., Herndon J. G. Mosaic aging // *Med. Hypotheses.* 2010. Vol. 74. P. 1048–1051. doi: 10.1016/j.mehy.2009.12.031

Williams P. D., Day T. Antagonistic pleiotropy, mortality source interactions, and the evolutionary theory of senescence // *Evolution.* 2003. Vol. 57. P. 1478–1488. doi: 10.1111/j.0014-3820.2003.tb00356.x

Поступила в редакцию 19.08.2016

References

Abrashova T. V., Sokolova A. P., Selezneva A. I., Khuttunen O. E., Makarova M. N., Makarov V. G. Variability of biochemical and haematological indices of laboratory rats depending on a line and age.

Mezhdunarodnyi vestnik veterinarii [Int. Bulletin of Vet. Medicine]. 2010. Vol. 2. P. 55–60.

Agadzhanyan Z. S., Doroshchuk A. D., Shiryayeva Yu. K., Dmitriyev L. F. Rol' tsitokhroma B5 i α -tokoferola v mikrosomal'nom i mitokhondrial'nom okislenii [Role of cytochrome b5 and α -tocopherol in microsomal

and mitochondrial oxidation]. *Byull. eksp. biol. med [Bulletin of Exp. Biology and Medicine]*. 2013. Vol. 156, no. 8. P. 156–160.

Berestov V. A. Biokhimiya i morfologiya krovi pushnykh zveri [Biochemistry and morphology of fur animals blood]. Petrozavodsk: Kareliya, 1971. 292 p.

Dil'man V. M. Bol'shiye biologicheskiye chasy [Big biological clock]. Moscow: Znaniye, 1986. 256 p.

Ilyukha V. A. Antioxidantnye fermenty v fiziologicheskikh adaptatsiyakh mlekopitayuschikh (Sravnitel'no-vidovoy, ontogeneticheskiy i prikladnoy aspekty) [Antioxidant enzymes in mammals' physiological adaptations (Species comparative, ontogenetic and applied aspects)]: Summary of PhD (Dr. of Biol.) thesis. Syktyvkar, 2004. 35 p.

Makhin'ko V. I., Nikitin V. N. Obmen veschestv i energii v ontogeneze. V knige: Vostrastnaya fiziologiya [Metabolism and energy metabolism in ontogenesis. In: Developmental physiology]. Leningrad: Nauka, 1975. P. 221–259.

Makhovyykh M. Yu. Osobennosti stroeniya i krovosnabzheniya podzheludochnoy zhelezy sobak v ontogeneze [Characteristics of structure and blood supply of dog pancreas in ontogenesis]: Summary of PhD (Cand. of Biol.) thesis. Orenburg, 2004. 178 p.

Mikhailova A. E. Vostrastnye izmeneniya energeticheskogo metabolizma u molodnyaka pestsov raznykh srokov rozhdeniya [Age-related changes in energetic metabolism of young blue foxes of various birth dates]. *Biologiya i patologiya pushnykh zveri [Fur Animals Biology and Pathology]*. Petrozavodsk, 1974. P. 81–83.

Nadirov N. K. Tokoferoly i ikh ispol'zovanie v meditsine i sel'skom khozyajstve [Tocopherols and their use in medicine and agriculture]. Moscow: Nauka, 1991. 336 p.

Natochin Yu. V. Vodno-solevoy gomeostaz: evolyutsiya i ekologiya [Water-salt homeostasis: evolution and ecology]. Seriya preprintov "Nauchnye doklady" [Preprint Series Research Reports]. Syktyvkar, 1982. 48 p.

Ovsyanikov N. G. Povedeniye i sotsial'naya organizatsiya pesty [Behavior and social organization of the arctic fox]. Moscow: TsNILOKhZ, 1993. 243 p.

Oleynik V. M. Kharakteristika fermentnogo spectra pischevaritel'nogo trakta u khishchnykh mlekopitayuschikh [Description of digestive tract enzymes in carnivorous mammals]: Summary of PhD (Dr. of Biol.) thesis. St. Petersburg, 1997. 34 p.

Pimenov Yu. S. Krov' zdorovykh lyudey pri starenii [Blood of healthy people during senescence]. *Gematol. i transfuziol [Hematology and Transfusiology]*. 1993. Vol. 3. P. 43–45.

Sergina S. N., Ilyukha V. A., Antonova E. P., Baishnikova I. V., Kizhina A. G., Morozov A. V., Okulova I. I., Uzenbaeva L. B., Unzhakov A. R. Stanovlenie fiziologicheskikh sistem u pestsov v ontogeneze [Formation of the physiological systems of blue foxes in ontogenesis]. "Znaniya molodykh: nauka, praktika i innovatsii". Agronomicheskie, biologicheskie, veterinarnye nauki: sbornik nauchnykh trudov XVI Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii aspirantov i molodykh uchenykh (Kirov, 23 marta 2016 g.) [*Knowledge of the Young: Science, Practice and Innovations*. Agronomic, Biological, Veterinary Sciences: Proceed. of the XVI Int. Sci. Conf. of Post-graduate Students and Young

Researchers (Kirov, March 23, 2016)]. Kirov, 2016. Pt. 1. P. 163–167.

Skurihin V. N., Dvinskaya L. M. Opredeleniye α -tokoferola i retinola v plazme krovi sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh metodom mikrokolonnochnoy vysokoeffektivnoy zhidkostnoy khromatografii [Determination of α -tocopherol and retinol in blood plasma of farm animals by microcolumn HPLC method]. *Selskhoz. biol. [Agricultural Biology]*. 1989. Vol. 4. P. 127–129.

Eticheskaya ekspertiza biomeditsinskikh issledovaniy. Prakticheskie rekomendatsii [Ethical expertise of biomedical research. Practical recommendations]. Eds. Yu. B. Belousov. Moscow: Rossiyskoe obshchestvo klinicheskikh issledovateley, 2005. 156 p.

Uzenbaeva L. B., Vinogradova I. A., Kizhina A. G., Prokopenko O. A., Malkiel' A. I., Goranskiy A. I., Lapinski S., Ilyukha V. A. Vliyaniye melatonina na sootnoshenie neytrofilov i limfotsitov v krovi mlekopitayuschikh zavisit ot vozrasta zhivotnykh [Melatonin influence on neutrophil-lymphocyte ratio in mammals' blood depends on the age]. *Uspekhi gerontologii [Advances in Gerontology]*. 2012. Vol. 25, no. 4. P. 409–414.

Chekalova T. M. Effektivnost' selektsii po vosproizvoditel'noy sposobnosti u pestsov (*Alopex lagopus*) i lisits (*Vulpes vulpes*) v usloviyakh ikh kletchnogo razvedeniya na spetsializirovannykh zverofermakh [Selection effect for reproductivity of farm bred blue (*Alopex lagopus*) and silver foxes (*Vulpes vulpes*)]. *Vestnik VO-GiS [Vavilov Journal of Genetics and Breeding]*. 2007. Vol. 11, no. 1. P. 195–204.

Ahlstrøm Ø., Fuglei E., Mydland L. T. Comparative nutrient digestibility of arctic foxes (*Alopex lagopus*) on Svalbard and farm-raised blue foxes (*Alopex lagopus*). *Comp. Biochem. Physiol. A: Molecular & Integrative Physiology*. 2003. Vol. 134, no. 1. P. 63–68. doi: 10.1016/S1095-6433(02)00184-8

Bears R. F., Sizer I. N. A spectral method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 1952. Vol. 195, no. 1. P. 133–140.

Bechshoff T., Sonne C., Jakobsen J., Rigét F. F., Born E. W., Letcher R. J., Jenssen B. M., Dietz R. Vitamins A and E in liver, kidney, and whole blood of East Greenland polar bears sampled 1994–2008: reference values and temporal trends. *Polar Biol.* 2016. Vol. 39. P. 743–754. doi: 10.1007/s00300-015-1830-9

Buddington R. K., Elnif J., Malo C., Donahoo J. B. Activities of gastric, pancreatic, and intestinal brush-border membrane enzymes during postnatal development of dogs. *Am. J. Vet. Res.* 2003. Vol. 64, no. 5. P. 627–634. doi: 10.2460/ajvr.2003.64.627

Buffington C. A. Lack of effect of age on digestibility of protein, fat and dry matter in Beagle dogs. In: *Nutrition of the Dog and Cat*. Eds. C. A. Buffington, J. E. Branam, G. C. Dunn. Cambridge, UK Cambridge University Press, 1989. 397 p.

Canids: foxes, wolves, jackals and dogs. Eds. C. Silveiro-Zubiri, M. Hoffmann, D. W. Macdonald. IUCN – The World Conservation Union, 2004. 430 p.

Economos A. C. Mammalian design and rate of living. *Exp. Gerontol.* 1982. Vol. 17, no. 2. P. 145–152.

Gaál T., Speake B. K., Mezes M., Noble R. C., Surai P. F., Vajdovich P. Antioxidant parameters and age-

- ing in some animal species. *Comp. Haematol. Int.* 1996. Vol. 6. P. 208–213.
- Jin K. Modern biological theories of aging. *Aging and Disease*. 2010. Vol. 1, no. 2. P. 72–74.
- Judge S., Jang Y. M., Smith A., Hagen T., Leeuwenburgh C. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *FASEB J.* 2005. Vol. 19, no. 3. P. 419–421. doi: 10.1096/fj.04-2622fje
- Ilyukha V. A., Harri M., Rekila T. Reproductive success of farmed blue foxes. *J. Anim. Breed. Genet.* 1997. Vol. 114. P. 465–474.
- Harman D. Free radical theory of aging: role of free radicals in the origination and evolution of life, aging and disease process. In: *Biology of aging*. Eds. J. Johnson, R. Walford, D. Harman, J. Miquel. New York: Liss, 1986. P. 3–50.
- Kamzalov S., Sohal R. S. Effect of age and caloric restriction on coenzyme Q and a-tocopherol levels in the rat. *Exp. Gerontol.* 2004. Vol. 39, no. 8. P. 1199–1205. doi: 10.1016/j.exger.2004.04.007
- Klir J. J., Heath J. E. Metabolic rate and evaporative water loss at different ambient temperatures in two species of fox: the red fox (*Vulpes vulpes*) and the arctic fox (*Alopex lagopus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 1992. Vol. 101A, no. 4. P. 705–707.
- Kirkwood T. B. L., Austad S. N. Why do we age? *Nature*. 2000. Vol. 408. P. 233–238. doi: 10.1038/35041682
- Kitagaki M., Yamaguchi M., Nakamura M., Sakurada K., Suwa T., Sasa H. Age-related changes in haematology and serum chemistry of Weiser – Maples guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Lab. Animals*. 2005. Vol. 39, no. 3. P. 321–330. doi: 10.1258/0023677054307042
- Kondratov R. V., Kondratova A. A., Gorbacheva V. Y., Vykhovanets O. V., Antoch M. P. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes & Dev.* 2006. Vol. 20, no. 14. P. 1868–1873. doi: 10.1101/gad.1432206
- Lorenzo G. D., Balistreri G. R., Candore G. Granulocyte and natural killer activity in the elderly. *Mech. Ageing Dev.* 1999. Vol. 108. P. 25–38.
- Lloyd L. E., McCay C. M. The utilisation of nutrients by dogs of different ages. *J. Gerontol.* 1955. Vol. 10. P. 182–187.
- Lei X. G., Zhu J.-H., Cheng W.-H., Bao Y., Ho Y.-S., Reddi A. R., Holmgren A., Arnér E. S. J. Paradoxical roles of antioxidant enzymes: basic mechanisms and health implications. *Physiol. Rev.* 2016. Vol. 96. P. 307–364. doi: 10.1152/physrev.00010.2014
- Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193, no. 1. P. 265–275.
- Mangoni A. A., Jackson S. H. D. Age-related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics: basic principles and practical applications. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2003. Vol. 57, no. 1. P. 6–14. doi: 10.1046/j.1365-2125.2003.02007.x
- Matsuo M., Gomi F., Dooley M. M. Age-related alterations in antioxidant capacity and lipid peroxidation in brain, liver, and lung homogenates of normal and vitamin E-deficient rats. *Mech. Ageing Dev.* 1992. Vol. 64. P. 273–292.
- Misra H. P., Fridovich F. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 1972. Vol. 247, no. 10. P. 3170–3175.
- Naudí i Farré A., Jové Font M., Ayala Jové M. V., Portero Otín M., Barja G., Pamplona Gras R. Membrane lipid unsaturation as physiological adaptation to animal longevity. *Front. In Physiol.* 2013. Vol. 4, no. 372. P. 1–13. doi: 10.3389/fphys.2013.00372
- Newman S. J., Steiner J. M., Woosley K., Barton L., Williams D. A. Correlation of age and incidence of pancreatic exocrine nodular hyperplasia in the dog. *Vet. Pathol. Online*. 2005. Vol. 42, no. 4. P. 510–513. doi: 10.1354/vp.42-4-510
- Niki E. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxyl radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. *Free Rad. Biol. Med.* 2014. Vol. 66. P. 3–12. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.022
- Nussey D. H., Froy H., Lemaitre J.-F., Gailard J.-M., Austad S. N. Senescence in natural populations of animals: Widespread evidence and its implications for biogerontology. *Ageing Res. Rev.* 2013. Vol. 112. P. 214–225. doi: 10.1016/j.arr.2012.07.004
- Piotrowska A., Szymeczko R., Ozgo M., Bogustawska-Tryk M., Burlikowska K. Morphological and mineral characteristics of peripheral blood in female polar fox in relation to age. *Folia Biol.* 2008. Vol. 56, no. 3–4. P. 263–267. doi: 10.3409/fb.56_3-4.263–267
- Rouvinen K. Dietary effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on body fat composition and health status of farm-raised blue and silver foxes. *Acta Agric. Scand.* 1991. Vol. 41, no. 4. P. 401–414.
- Schweigert F. J., Buchholz I. Vitamin A metabolism in carnivores with special reference to fur bearing animals. *Scientifur*. 1995. Vol. 19, no. 4. P. 305–307.
- Sedlak J., Lindsay R. H. Estimation of total, protein-bound and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 1968. Vol. 25. P. 192–205.
- Sohal R. S., Arnold L. A., Sohal B. H. Age-related changes in antioxidant enzymes and prooxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species. *Free Rad. Biol. Med.* 1990. Vol. 9, no. 6. P. 495–500.
- Rao G., Xia E., Richardson A. Effect of age on the expression of antioxidant enzymes in male Fischer F344 rats. *Mech. Ageing Dev.* 1990. Vol. 53, no. 1. P. 49–60.
- Walker L. C., Herndon J. G. Mosaic aging. *Med. Hypotheses*. 2010. Vol. 74. P. 1048–1051. doi: 10.1016/j.mehy.2009.12.031
- Williams P. D., Day T. Antagonistic pleiotropy, mortality source interactions, and the evolutionary theory of senescence. *Evolution*. 2003. Vol. 57. P. 1478–1488. doi: 10.1111/j.0014-3820.2003.tb00356.x

Received August 19, 2016

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Сергина Светлана Николаевна

научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: cvetnick@yandex.ru
тел.: (8142) 573107

Илюха Виктор Александрович

заведующий лаб. экологической физиологии животных,
д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: ilyukha@krc.karelia.ru

Узенбаева Людмила Борисовна

старший научный сотрудник, доцент, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: uzenb@bio.krc.karelia.ru

Антонова Екатерина Петровна

младший научный сотрудник
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: antoonkina@rambler.ru

Баишникова Ирина Валерьевна

научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: iravbai@mail.ru

Морозов Артем Владимирович

ведущий биолог
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: artem.morozov@yandex.ru

Кижина Александра Геннадьевна

научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: golubewa81@yandex.ru

Печорина Эльвира Филипповна

главный биолог
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: elvi1955@yandex.ru

Окулова Ираида Ивановна

старший научный сотрудник, к. вет. н.
Всероссийский научно-исследовательский институт
охотничьего хозяйства и звероводства
им. проф. Б. М. Житкова
ул. Преображенская, 79, Киров, Россия, 610000
эл. почта: okulova_i@mail.ru

CONTRIBUTORS:

Sergina, Svetlana

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: cvetnick@yandex.ru
tel.: (8142) 573107

Ilyukha, Victor

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

Uzenbaeva, Lyudmila

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

Antonova, Ekaterina

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

Baishnikova, Irina

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

Morozov, Artem

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

Kizhina, Alexandra

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: golubewa81@yandex.ru

Pechorina, Elvira

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: elvi1955@yandex.ru

Okulova, Iraida

Professor Zhitkov Federal State Budgetary Russian Research
Institute of Game Management and Fur Farming
79 Preobrazhenskaya St., 610000 Kirov, Russia
e-mail: okulova_i@mail.ru

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.152.344:594.1:57.04

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАДМИЯ НА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ КАЛЬЦИЙЗАВИСИМЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ МИДИИ *MYTILUS EDULIS* L.

Н. П. Канцерова, Л. А. Лысенко, И. Н. Бахмет, Н. Н. Немова

Институт биологии Карельского научного центра РАН

В экспериментах *in vivo* и *in vitro* протестировано действие катионов кадмия на активность кальцийзависимых протеиназ семейства кальпаинов из жабр и гепатопанкреаса мидий *Mytilus edulis* L. Результаты аквариального эксперимента по изучению влияния ионов кадмия на активность кальпаинов в органах мидий свидетельствуют об изменении активности данных протеиназ в зависимости от времени воздействия исследуемого металла. Наблюдаемое при суточном воздействии повышение кальцийзависимой протеолитической активности в жабрах мидий указывает на развитие неспецифического компенсаторного ответа на действие изучаемого токсиканта. Избирательно накапливаясь в определенных органах и компартментах клетки, кадмий эффективно подавляет в них кальцийзависимый протеолиз при экспозиции в 72 часа. Для объяснения механизма действия кадмия в эксперименте *in vitro* было протестировано действие данного катиона на активность частично очищенных препаратов кальпаинов из тканей мидий. Обнаружено инактивирующее действие катионов кадмия на препараты кальпаинов. Полученные данные позволяют говорить о механизме специфического взаимодействия кадмия с изучаемыми цистеиновыми протеиназами за счет блокирования SH-групп активного центра ферментов.

Ключевые слова: кальцийзависимый протеолиз; кальпаины; регуляция; кадмий; мидии.

N. P. Kantserova, L. A. Lysenko, I. N. Bakhmet, N. N. Nemova. THE EFFECT OF CADMIUM IONS ON INTRACELLULAR CALCIUM-DEPENDENT PROTEINASES IN MUSSEL *MYTILUS EDULIS* L.

The effect of cadmium ions on calcium-dependent proteinases (calpains) in some organs of the blue mussel, *Mytilus edulis* L., was investigated in *in vivo* and *in vitro* experiments. It was shown that the exposure with cadmium ions affected calpain activity in time-dependent manner in an aquarium experiment. Increased calcium-dependent proteolytic activity in mussel gills was shown after 24 h exposure with cadmium. The observed calpain upregulation in mussel gills presumably is a constituent of non-specific compensa-

tory response to acute heavy metal exposure, which allows the organism to adapt to the pollutants. Cadmium-induced inhibition of calcium-dependent proteolytic activity was observed after 72 h treatment. The effect of heavy metal ions on calpains in the blue mussel, *Mytilus edulis* L., was tested *in vitro* using partially purified mussel enzymes. Calpain activity was fully inhibited by cadmium ions. The mechanism of interaction of cadmium ions with the studied cysteine proteinases can be realized by specific binding with SH-groups of the enzyme.

Key words: calcium-dependent proteolysis; calpain; regulation; cadmium; mussels.

Введение

Тяжелые металлы и их соединения относятся к числу наиболее опасных загрязнителей биосферы, что в значительной мере связано как с их высокой биологической активностью, так и со способностью к биоаккумуляции. В отличие от органических загрязняющих веществ, подверженных деструкции и биотрансформации, тяжелые металлы не извлекаются из биологического круговорота, при этом их токсичность способна сохраняться практически бесконечно. Кадмий является типичным неэссенциальным тяжелым металлом, представляющим высокую опасность для живых организмов. Известно, что хроническое воздействие кадмия приводит к развитию заболеваний дыхательных путей, опорно-двигательного аппарата, иммунной системы, способствует развитию почечной недостаточности, диабета, гипертонии у человека [Bertin, Averbeck, 2006]. Международным агентством по изучению рака IARC (International Agency for Research on Cancer) кадмий внесен в список канцерогенов [IARC, 1993]. В окружающую среду кадмий чаще всего поступает со стоками горнодобывающих, обогатительных и электролизных производств, а также при использовании фосфатных удобрений. Объемы поступления кадмия в водные объекты за счет неорганизованных стоков более чем в два раза превышают объемы выбросов в атмосферу [Моисеенко и др., 2006].

Следует отметить наличие зачастую противоречивых сведений о токсичности кадмия для водных организмов, что объясняется влиянием солености, температуры, содержания кислорода на биодоступность данного металла. Так, у морских организмов, в том числе моллюсков, накопление кадмия в тканях увеличивается при понижении солености среды [Челомин, 1998]. Чувствительность к кадмию морских организмов, выражаемая как LC50 (средняя летальная концентрация, приводящая к гибели за 96 часов 50 % используемых в эксперименте животных), значительно различается у разных видов [Челомин, 1998]. Для мидий, часто используемых

для тестирования и мониторинга негативных эффектов антропогенных токсических веществ, LC50 составляет 1,5–4,0 мг Cd/л [Sunila, 1981; Amiard-Triquet et al., 1986]. В незагрязненных зонах открытого океана концентрация кадмия низка и составляет около 40 нг/л [Челомин, 1998], тогда как во внутренних морях, особенно в прибрежных областях, подвергающихся воздействию промышленных и бытовых стоков, концентрация данного металла намного выше, однако, как правило, не превышает его предельно допустимую концентрацию (ПДК) для морской воды (10 мкг/л).

Известно, что кадмий способен взаимодействовать с множественными структурами клетки и вызывать различные биохимические изменения – от ингибирования отдельных ферментов и ферментных ансамблей до повреждения мембранных структур [Viarengo, 1989; Wright, 1995; Canesi et al., 1998; Челомин и др., 1998]. Кальпаины – внутриклеточные кальцийзависимые цистеиновые протеиназы, выполняющие функцию ограниченного протеолиза в клетках всех эукариотических и ряда прокариотических организмов. Кальпаины принимают участие в основных Ca^{2+} -зависимых клеточных процессах – передаче сигнала, клеточном цикле, пролиферации, дифференцировке, слиянии мембран транспортных везикул, формировании мышечных волокон, реализации клеточной гибели и др. Один из основных факторов регуляции активности кальпаинов – концентрация Ca^{2+} в цитозоле; кроме того, активность кальпаинов (цистеиновых протеиназ) может регулироваться различными агентами, связывающими SH-группы их активного центра, в том числе двухвалентными тяжелыми металлами [Goll et al., 2003].

Цель настоящей работы – изучить активность внутриклеточных кальцийзависимых протеиназ (кальпаинов) мидий *Mytilus edulis* L. при воздействии ионов кадмия в аквариальных условиях в концентрациях, равной и превышающих ПДК для морской воды в 10 и 50 раз, а также в условиях *in vitro* с целью описания механизма действия исследуемого токсиканта.

Материалы и методы

Аквариальный эксперимент был поставлен на Беломорской биологической станции «Картеш» им. О. А. Скарлато Зоологического института РАН. Одноразмерные мидии были собраны в бухте Круглая губы Чупа Кандалакшского залива Белого моря с установок для культивирования моллюсков (глубина 2 м). Моллюсков содержали в 16-литровых аквариумах с аэрируемой морской водой (соленость 25‰, постоянное освещение, температура 10 °С, регулярная смена воды). После акклимации к лабораторным условиям (3 сут) мидии произвольным образом были разделены на группы по 14 особей; в аквариумы вносили 10 мкг/л Cd^{2+} , 100 мкг/л Cd^{2+} , 500 мкг/л Cd^{2+} (в виде хлоридов, в пересчете на катион). В аквариумах поддерживалась постоянная концентрация металла с ежедневной частичной сменой воды. Контролем служили моллюски, содержащиеся в аквариуме без внесения металлов. По истечении срока воздействия (24 и 72 ч) мидий ($n=7$) препарировали, органы (жабры, гепатопанкреас) хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ для дальнейшего анализа. Гибели моллюсков в контрольном и опытных аквариумах зафиксировано не было.

Образцы тканей (0,1 г) гомогенизировали в 10-кратном объеме 20 мМ трис-НСI буфера (рН 7,5) с добавлением 80 мМ КСI, 5 мМ ЭДТА-Na и 20 мМ ДТТ. После центрифугирования (Rotina 35R; Hettich Zentrifugen, Германия) – 20 000 g, 20 мин – отбирали цитозольную фракцию, осадок ресуспендировали в 10 объемах того же буфера с добавлением 0,33% Triton X-100 и отбирали фракцию мембраносвязанных белков. В полученных фракциях тестировали Ca^{2+} -зависимую казеинолитическую активность, чувствительную к ингибиторам цистеиновых протеиназ, включая ингибитор кальпаинов II (активность кальпаинов) [Enns, Belcastro, 2006]. Учитывая особенности механизма регуляции активности внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеиназ, можно соотнести их активность в цитозольной фракции с общим уровнем ферментативного белка, в мембраносвязанной – с долей активированного фермента.

Реакционная смесь включала 1 мг/мл щелочно-денатурированного казеина, 20 мМ ДТТ, 200 мкл ферментной фракции и 5 мМ $CaCl_2$ (опыт) или хелатора двухвалентных катионов ЭДТА (контроль) в 50 мМ трис-НСI буфере (рН 7,5). После 30-минутной инкубации (28 °С) в аликвотах 100 мкл определяли содержание остаточного белка по методу Брэдфорда [Bradford, 1976]. Единица активности

кальпаинов (ед. акт.) определялась как количество фермента, вызывающее увеличение на 0,1 оптического поглощения при 595 нм за 1 час инкубации при 28 °С. Удельную активность кальпаинов определяли в ед. акт. на 1 г белка в соответствующей фракции.

Для проведения эксперимента по оценке влияния Cd^{2+} на активацию кальпаинов частично очищенные препараты кальцийзависимых протеиназ получали после гомогенизации навески (0,1 г) ткани жабр от интактных мидий в 20 мМ трис-НСI-буфере (рН 7,5) с добавлением 150 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА-Na, 20 мМ ДТТ, 0,1%-го Triton X-100 с последующим центрифугированием при 20 000 g в течение 20 мин. В реакционную смесь описанного выше состава добавляли 5 мМ $CdCl_2$ или 2,5 мМ $CdCl_2$ с 2,5 мМ $CaCl_2$. Инкубацию проводили в стандартных условиях (28 °С, 30 мин). Значение казеинолитической активности соотносили с ее уровнем в присутствии 5 мМ $CaCl_2$.

Результаты проведенных экспериментов обработаны с применением общепринятых методов вариационной статистики с использованием пакетов программ MS Excel и StatGraphics. Достоверность различий оценивали с помощью непараметрического критерия U (критерий Манна – Уитни).

Результаты и обсуждение

Было установлено, что по истечении первых суток воздействия кадмия в концентрации 500 мкг/л наблюдался более высокий уровень активности кальпаинов как цитозольной, так и мембраносвязанной фракции в жабрах по сравнению с контролем (рис. 1, 2).

Известно, что у мидий, как и у многих гидробионтов, жабры – основной орган, через который в организм из внешней среды поступают различные металлы и затем распределяются по органам [Everaart, 1990; Челомин и др., 1998]. Можно предположить, что наблюдаемая активация кальпаинов в жабрах форели свидетельствует о развитии неспецифического компенсаторного ответа на действие тяжелого металла.

Кроме того, один из ведущих механизмов реализации токсичности тяжелых металлов, в том числе кадмия, заключается в инициации окислительного стресса, который возникает вследствие нарушения баланса активности про- и антиоксидантных систем, генерирования свободных радикалов кислорода, усиления процессов перекисного окисления липидов [Шафран и др., 2004]. Развитие сильного окислительного стресса влияет на функциональную

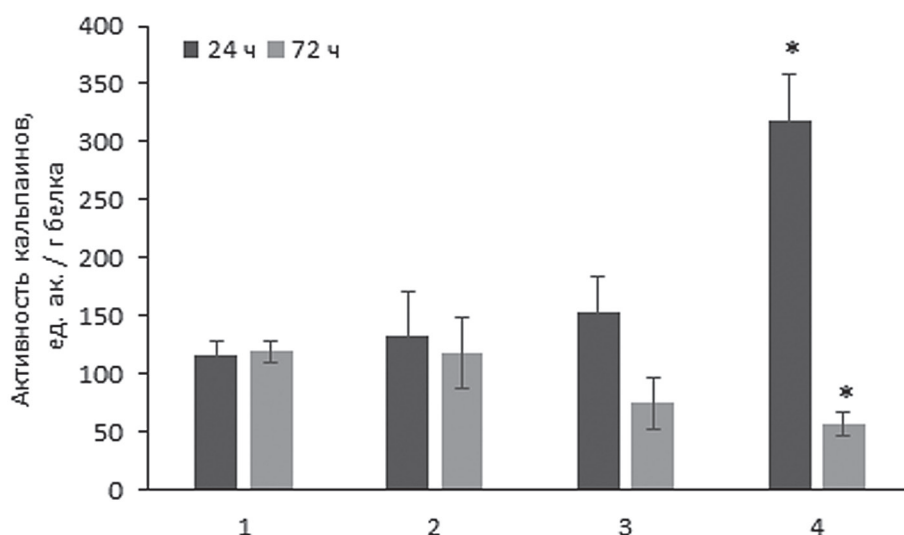


Рис. 1. Удельная активность кальпаинов цитозольной фракции (ед. акт./г белка) в жабрах *M. edulis* L. при действии различных концентраций кадмия. Здесь и далее: 1 – контроль, 2 – 10 мкг/л Cd²⁺, 3 – 100 мкг/л Cd²⁺, 4 – 500 мкг/л Cd²⁺, * отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$

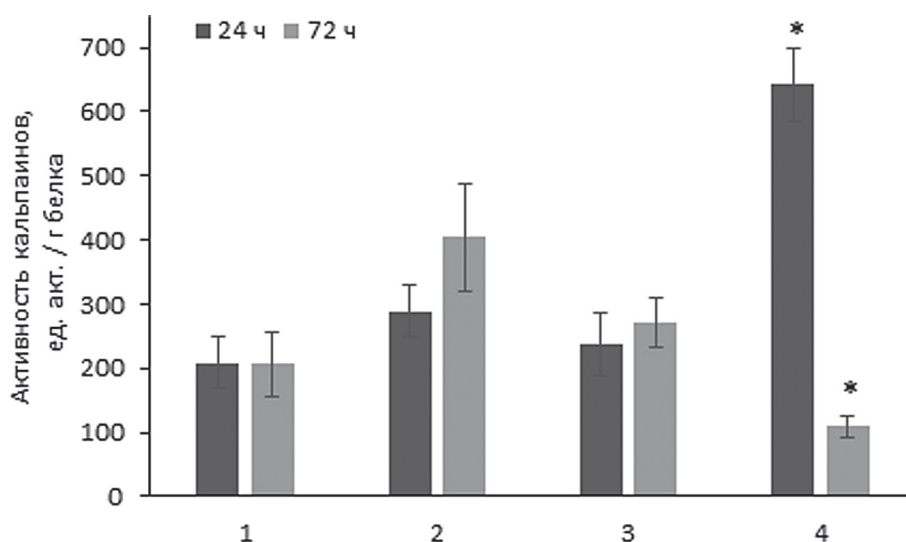


Рис. 2. Удельная активность кальпаинов мембраносвязанной фракции (ед. акт./г белка) в жабрах *M. edulis* L. при действии различных концентраций кадмия

активность транспортных систем клеточных мембран, в том числе митохондриальной, что приводит к нарушению гомеостаза Ca²⁺ [Dare et al., 2000]. Нарушение гомеостаза Ca²⁺, в основном за счет снижения активности Ca²⁺-АТФазы и повышения его поступления через потенциал-зависимые каналы, приводит к активации кальпаинов [Kaur, Gill, 2005]. Кроме того, токсическое действие веществ на тканевом уровне часто сопровождается явлением цитотоксичности, связанным с гибелью клеток путем некроза или апоптоза, а в этих процессах, как известно, кальпаины играют одну из ключевых ролей [Goll et al., 2003].

После трех суток воздействия кадмия (500 мкг/л) наблюдалось снижение активности Ca²⁺-зависимых протеиназ изученных фракций в жабрах мидий по сравнению с контролем. Согласно данным литературы [Челомина, 1998], клетки жабр у мидий подвержены максимальной аккумуляции металлов в условиях острого эксперимента. Подавление активности кальпаинов (ферментов, относящихся к цистеиновому типу) при действии кадмия, вероятно, является следствием способности данного металла к ингибированию биомолекул за счет специфического связывания с их реакционными SH-группами.

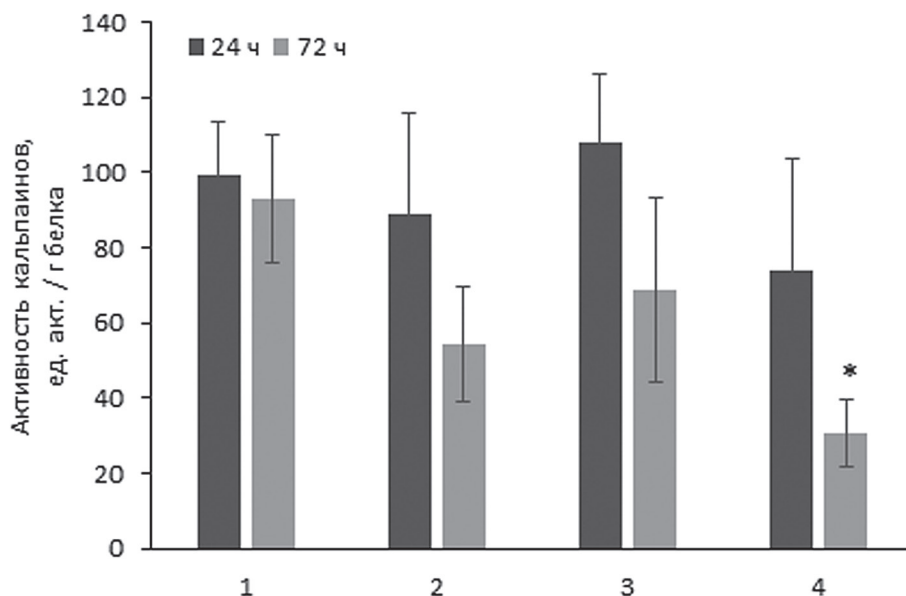


Рис. 3. Удельная активность кальпаинов цитозольной фракции (ед. акт./г белка) в гепатопанкреасе *M. edulis* L. при действии различных концентраций кадмия

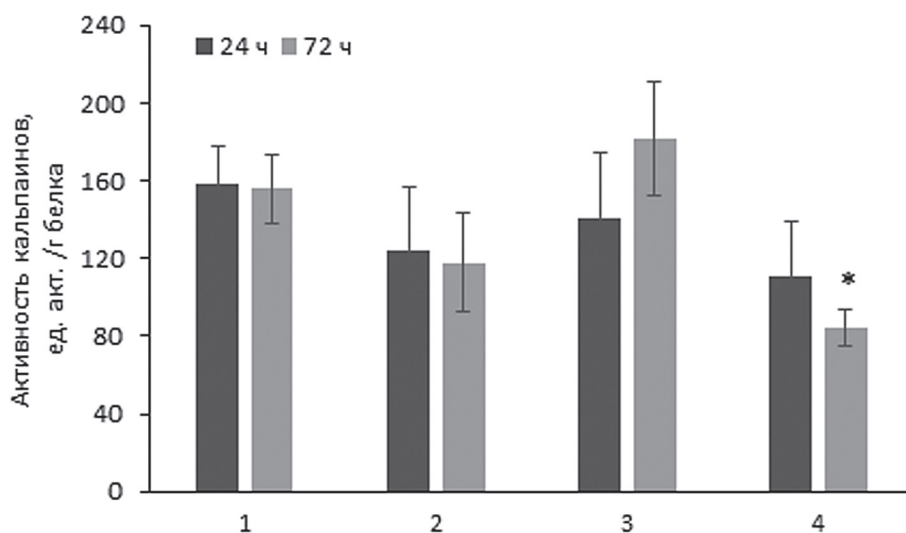


Рис. 4. Удельная активность кальпаинов мембраносвязанной фракции (ед. акт./г белка) в гепатопанкреасе *M. edulis* L. при действии различных концентраций кадмия

Было установлено, что в гепатопанкреасе мидий уровень активности кальпаинов не изменился при суточном воздействии кадмия всех изученных концентраций; лишь через трое суток наблюдались достоверные изменения протеолитической Ca^{2+} -зависимой активности в данном органе (рис. 3, 4). Подавление активности кальпаинов в гепатопанкреасе при действии кадмия при 3-суточной экспозиции, вероятно, можно объяснить его способностью образовывать прочные ковалентные комплексы с биомолекулами, содержащими реакционно активные SH-группы. Следовательно, можно

предположить, что при такой длительности воздействия аккумулированный из среды металл не только проник во внутреннюю среду организма, но и достиг субклеточных структур.

Таким образом, как в жабрах, так и в гепатопанкреасе ответная реакция кальцийзависимых протеиназ наблюдалась при воздействии только самой высокой из изученных концентраций кадмия (500 мкг/л). Интересно отметить, что снижение протеолитической и амилолитической активности гепатопанкреаса устрицы *Crassostrea virginica* было зафиксировано при 96-часовом воздействии

кадмия в концентрации 500 мкг/л, тогда как при влиянии данного металла в концентрации 100 мкг/л достоверных изменений зафиксировано не было [Adeyemi, Deaton, 2012]. Воздействие кадмия в концентрации 500 мкг/л в течение 48 ч привело к увеличению экспрессии гена *c-fos* в жабрах мидии *Mytilus edulis* L. в 5 раз, тогда как меньшие концентрации данного металла не вызвали достоверных изменений исследуемого показателя [Veldhuizen-Tsoerkan et al., 1992]. Полученные результаты и данные литературы в определенной степени позволяют сделать заключение об относительной устойчивости морских двустворчатых моллюсков к краткосрочному воздействию концентраций кадмия, близких к ПДК для морской воды. Для понимания последствий загрязнения водных экосистем кадмием необходимо изучение более длительного воздействия низких концентраций данного металла на живые организмы.

Для более полной оценки возможных механизмов действия соли кадмия, растворенной в среде, на кальпаины мидий, исследовали активность частично очищенного препарата кальпаинов в присутствии катионов данного металла. В эксперименте *in vitro* была протестирована способность Cd^{2+} в конечной концентрации 5 мМ воздействовать на активность кальпаинов. Относительная активность кальпаинов также была определена при совместном добавлении 2,5 мМ изучаемого катиона и 2,5 мМ Ca^{2+} . Установлено, что в присутствии 5 мМ Cd^{2+} активность фермента не выявлялась. При сочетании действия Ca^{2+} и Cd^{2+} также наблюдалась полная инактивация кальпаинов. Таким образом, в эксперименте *in vitro* было показано, что катион Cd^{2+} не только не способен индуцировать активность кальпаинов, но и подавляет Ca^{2+} -индуцированную активность кальпаинов, по всей видимости, блокируя SH-группу активного центра фермента. Таким образом, полученные результаты по влиянию катиона кадмия на частично очищенный препарат кальпаинов из жабр мидий позволяют в определенной степени объяснить механизм опосредованного действия данного поллютанта на живые организмы в эксперименте *in vivo*.

Заключение

Результаты аквариального эксперимента свидетельствуют об изменении активности внутриклеточных кальцийзависимых протеиназ в тканях мидий при воздействии ионов кадмия. Установлено, что при опосредованном влиянии ионов кадмия на кальпаины в органах мидий их активность зависит от времени его

воздействия. Повышение активности кальпаинов в жабрах моллюска при краткосрочном воздействии ионов кадмия свидетельствует, по-видимому, о развитии неспецифического компенсаторного ответа на действие поллютанта. Снижение активности кальпаинов, наблюдаемое при более длительном воздействии тяжелого металла, может привести к изменению интенсивности многих кальпаинзависимых процессов в клетке.

Для объяснения механизмов биологического действия кадмия было смоделировано *in vitro* взаимодействие катионов исследуемого металла и кальпаинов из тканей моллюсков. Полученные данные подтверждают механизм их специфического взаимодействия за счет блокирования SH-групп активного центра ферментов.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Беломорской биологической станции им. О. А. Скарлато ЗИН РАН «Картеш» за предоставленную возможность проведения эксперимента.

Исследование выполнено с использованием научного оборудования ЦКП НО ИБ КарНЦ РАН. Финансовое обеспечение исследования осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (тема № 0221-2014-0003) и при поддержке гранта Президента РФ МК-4737.2016.4.

Литература

- Моисеенко Т. И., Кудрявцева Л. П., Гашкина Л. А. Рассеянные элементы в поверхностных водах суши. М.: Наука, 2006. 261 с.
- Челомин В. П. Экоотоксикологические аспекты биоаккумуляции кадмия (на примере морских двустворчатых моллюсков): дис. ... докт. биол. наук. Владивосток, 1998. С. 394.
- Челомин В. П., Бельчева Н. Н., Захарцев М. В. Биохимические механизмы адаптации мидии *Mytilus trossulus* к ионам кадмия и меди // Биол. моря. 1998. Т. 24, № 5. С. 319–325.
- Шафран Л. М., Большой Д. В., Пыхтеева Е. Г., Третьякова Е. В. Роль лизосом в механизме защиты и повреждения клеток при действии тяжелых металлов // Современные проблемы токсикологии. 2004. № 3. С. 17–24.
- Adeyemi J. A., Deaton L. E. The effect of cadmium exposure on digestive enzymes in the eastern oyster *Crassostrea virginica* // Journal of Shellfish Research. 2012. Vol. 31 (3). P. 631–634. doi: 10.2983/035.031.0306
- Amiard-Triquet C., Berthet B., Metayer C., Amiard J. C. Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, copper and zinc in the mussel *Mytilus edulis* L. Experimental study // Mar. Biol. 1986. Vol. 92. P. 7–13.

Bertin G., Averbek D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review) // *Biochimie*. 2006. Vol. 88. P. 1549–1559.

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.

Canesi L., Ciacci C., Piccoli G. In vitro and in vivo effects of heavy metals on mussel digestive gland hexokinase activity: the role of glutathione // *Comp. Biochem. Physiol. Ser. C*. 1998. Vol. 120. P. 261–268.

Dare E., Gotz M. E., Zhivotovsky B. et al. Antioxidants J811 and 17beta-estradiol protect cerebellar granule cells from methylmercury-induced apoptotic cell death // *J. Neurosci. Res.* 2000. Vol. 62 (4). P. 557–565. doi: 10.1002/1097-4547(20001115)62:4<557::AID-JNR10>3.0.CO;2-9

Enns D. L., Belcastro A. N. Early activation and redistribution of calpain activity in skeletal muscle during hindlimb unweighting and reweighting // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2006. Vol. 84. P. 601–609. doi: 10.1139/y06-013

Everaart J. M. Uptake and release of cadmium in various organs of the common mussel *Mytilus edulis* // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1990. Vol. 45. P. 560–567.

Goll D. E., Thompson V. F., Li H. et al. The calpain system // *Physiol Rev.* 2003. Vol. 83, no. 3. P. 731–801. doi: 10.1152/physrev.00029.2002

References

Chelomin V. P. Jekotoksikologicheskie aspekty bioakkumuljacji kadmija (na primere morskih dvustvorchatyh molljuskov) [Ecotoxicological aspects of cadmium bioaccumulation (the case of marine bivalves)]: DSc (Dr. of Biol.) thesis. Vladivostok, 1998. P. 394.

Chelomin V. P., Bel'cheva N. N., Zaharcev M. V. Biohimicheskie mehanizmy adaptacii midii *Mytilus trossulus* k ionam kadmija i medi [Biochemical mechanisms of the mussel *Mytilus trossulus* adaptation to cadmium and copper ions]. *Biol. Morja [Marine Biology]*. 1998. Vol. 24, no. 5. C. 319–325.

Moiseenko T. I., Kudryavtseva L. P., Gashkina L. Rassejannye jelementy v poverhnostnyh vodah sushi [Dispersed elements in surface waters of land]. Moscow: Nauka, 2006. 261 p.

Shafran L. M., Bol'shoj D. V., Pyhteeva E. G., Tret'jakova E. V. Rol' lizosom v mehanizme zashhity i povrezhdenija kletok pri dejstvii tjazhjoljyh metallov [Lysosomes role in the mechanism of protection and damage of cells under heavy metals]. *Sovremennye problemy toksikologii [Modern Problems of Toxicology]*. 2004. No. 3. P. 17–24.

Adeyemi J. A., Deaton L. E. The effect of cadmium exposure on digestive enzymes in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research*. 2012. Vol. 31 (3). P. 631–634. doi: 10.2983/035.031.0306

Amiard-Triquet C., Berthet B., Metayer C., Amiard J. C. Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, copper and zinc in the mussel *Mytilus edulis* L. Experimental study. *Mar. Biol.* 1986. Vol. 92. P. 7–13.

Bertin G., Averbek D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair

IARC – International Agency for Research on Cancer, Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry, in: International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 58. IARC Scientific Publications, Lyon. 1993. P. 119–237.

Kaur A., Gill K. D. Disruption of neuronal calcium homeostasis after chronic aluminium toxicity in rats // *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2005. Vol. 96 (2). P. 118–122. doi: 10.1111/j.1742-7843.2005.pto960205.x

Sunila I. Toxicity of copper and cadmium to *Mytilus edulis* L. (Bivalvia) in brackish water // *Ann. Zool. Fennici*. 1981. Vol. 18. P. 213–223.

Veldhuizen-Tsoerkan M. B., Van der Mast C. A., Holwerda D. A. Cadmium-induced changes in macromolecular synthesis at transcriptional and translational level in gill tissue of sea mussels, *Mytilus edulis* L. // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*. 1992. Vol. 103 (2). P. 411–417.

Viarengo A. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level // *CRC Crit. Rev. Aquat. Sci.* 1989. Vol. 1. P. 295–317.

Wright D. A. Trace metal and major ion interactions in aquatic animals // *Mar. Pollut. Bull.* 1995. Vol. 31 (1–3). P. 8–18. doi: 10.1016/0025-326X(95)00036-M

Поступила в редакцию 31.08.2016

and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*. 2006. Vol. 88. P. 1549–1559.

Biagioli M., Pifferi S., Raghianti M., Bucci S., Rizzuto R., Pinton P. Endoplasmic reticulum stress and alteration in calcium homeostasis are involved in cadmium-induced apoptosis. *Cell Calcium*. 2008. Vol. 43 (2). P. 184–195. doi: 10.1016/j.ceca.2007.05.003

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.

Canesi L., Ciacci C., Piccoli G. In vitro and in vivo effects of heavy metals on mussel digestive gland hexokinase activity: the role of glutathione. *Comp. Biochem. Physiol. Ser. C*. 1998. Vol. 120. P. 261–268.

Dare E., Gotz M. E., Zhivotovsky B., Manzo L., Cecatelli S. Antioxidants J811 and 17beta-estradiol protect cerebellar granule cells from methylmercury-induced apoptotic cell death. *J. Neurosci. Res.* 2000. Vol. 62 (4). P. 557–565. doi: 10.1002/1097-4547(20001115)62:4<557::AID-JNR10>3.0.CO;2-9

Enns D. L., Belcastro A. N. Early activation and redistribution of calpain activity in skeletal muscle during hindlimb unweighting and reweighting. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2006. Vol. 84. P. 601–609. doi: 10.1139/y06-013

Everaart J. M. Uptake and release of cadmium in various organs of the common mussel *Mytilus edulis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1990. Vol. 45. P. 560–567.

Goll D. E., Thompson V. F., Li H., Wei W., Cong J. The calpain system. *Physiol Rev.* 2003. Vol. 83, no. 3. P. 731–801. doi: 10.1152/physrev.00029.2002

IARC – International Agency for Research on Cancer, Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry, in: International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 58. IARC Scientific Publications, Lyon. 1993. P. 119–237.

Kaur A., Gill K. D. Disruption of neuronal calcium homeostasis after chronic aluminium toxicity in rats. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2005. Vol. 96 (2). P. 118–122. doi: 10.1111/j.1742-7843.2005.pto960205.x

Sunila I. Toxicity of copper and cadmium to *Mytilus edulis* L. (Bivalvia) in brackish water. *Ann. Zool. Fennici.* 1981. Vol. 18. P. 213–223.

Veldhuizen-Tsoerkan M. B., Van der Mast C. A., Holwerda D. A. Cadmium-induced changes in mac-

romolecular synthesis at transcriptional and translational level in gill tissue of sea mussels, *Mytilus edulis* L. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Comparative Pharmacology.* 1992. Vol. 103 (2). P. 411–417.

Viarengo A. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *CRC Crit. Rev. Aquat. Sci.* 1989. Vol. 1. P. 295–317.

Wright D. A. Trace metal and major ion interactions in aquatic animals. *Mar. Pollut. Bull.* 1995. Vol. 31 (1–3). P. 8–18. doi: 10.1016/0025-326X(95)00036-M

Received August 31, 2016

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Канцерова Надежда Павловна

научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: nkantserova@yandex.ru
тел.: (8142) 571879

Лысенко Людмила Александровна

ведущий научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: l-lysenko@yandex.ru
тел.: (8142) 571879

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

Немова Нина Николаевна

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

CONTRIBUTORS:

Kantserova, Nadezhda

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

Lysenko, Lyudmila

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

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

Nemova, Nina

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

УДК 581.1

ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ *CUCUMIS SATIVUS* L. НА ДРОП В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СКОРОСТИ СНИЖЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ

Т. Г. Шибаета, Е. Г. Шерудило, А. Ф. Титов

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Изучали влияние скорости снижения температуры на реакцию растений *Cucumis sativus* L. на ежесуточные кратковременные (2 ч) снижения температуры (ДРОП) в конце ночного (темновой ДРОП) или в начале дневного (световой ДРОП) периода. Температуру снижали с 20 до 9 °С постепенно (со скоростью 0,4 °С/мин) или резко (11 °С/мин) путем перестановки растений из одной климатической камеры в другую. Полученные результаты показали, что при непродолжительном действии на растения низких положительных температур быстрое снижение температуры вызывает в растениях ряд реакций, отличных от тех, которые наблюдаются при постепенном снижении температуры. Резкое снижение температуры при ДРОП-воздействиях оказало более сильное негативное воздействие на состояние фотосинтетического аппарата растений и накопление биомассы по сравнению с постепенным изменением температуры. Различия были более выраженными при действии ДРОП на свету, и это указывает, что время суток, а скорее всего, наличие или отсутствие света в тот период, когда растения подвергаются действию низкой температуры, играет важную роль в их ответных реакциях. В то же время линейный рост и развитие растений, а также холодоустойчивость листьев изменялись под влиянием ДРОП независимо от скорости снижения температуры. Все эти аспекты реакции растений на действие пониженных температур следует учитывать в лабораторных экспериментах, когда при изучении того или иного действия температуры на растения практикуется резкая смена температуры, которая достигается путем быстрой перестановки растений из одних температурных условий в другие.

Ключевые слова: *Cucumis sativus* L.; низкая температура; ДРОП-воздействия; скорость снижения температуры; свет.

T. G. Shibaeva, E. G. Sherudilo, A. F. Titov. THE EFFECT OF COOLING RATE ON CUCUMBER PLANT RESPONSE TO A DAILY SHORT-TERM TEMPERATURE DROP

We studied the effect of cooling rate on responses of cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) to a daily short-term (2 hour) temperature reduction (DROP) at the end of the night (dark DROP) or at the beginning of the day (light DROP). The temperature was lowered from 20° to 9 °C gradually (at a rate of 0.4 °C/min) or sharply (11 °C/min) by transferring plants from one climate chamber to another. This work has shown that under short-term exposure to low non-injurious temperatures a fast versus slow cooling have somewhat different effects on plants. DROP with rapid cooling had a more pronounced negative impact on the state of the photosynthetic apparatus of the plants and biomass accumulation compared to DROP with slow temperature decrease. The differences were more

pronounced when plants were treated by light DROP, which indicates that the time of day, or rather the presence or absence of light at a time when the plants are exposed to low temperature plays a significant role. At the same time, a plant height, leaf emergence rate and leaf chilling tolerance changed under the influence of DROP regardless of the cooling rate. All these factors should be considered in laboratory experiments, when low temperature effects on plants are studied at rapid cooling, when temperature changes are achieved by transferring plants from one growth chamber to another.

Keywords: *Cucumis sativus* L.; low temperature; DROP-treatment; rate of cooling; light.

Введение

Ежесуточные непродолжительные снижения температуры (ДРОП, от англ. *drop* – падение) на 2–3 ч, обычно в конце ночи или рано утром, широко используются в практике тепличного растениеводства для получения компактной и более устойчивой рассады овощных культур, клумбовых и цветочных растений без применения химических ретардантов. В исследованиях особенностей реакции растений на ДРОП обычно рассматриваются такие параметры, как интенсивность, длительность воздействия низких температур, время их воздействия в суточном цикле [Mortensen, Мое, 1992; Ueber, Hendriks, 1992; Марковская и др., 2000; Сысоева и др., 2013; Шибаева, Шерудило, 2014; Шибаева и др., 2015], в то время как работ по изучению влияния скорости снижения температуры нет. Между тем давно известно, что реакция растений на охлаждение зависит не только от интенсивности и продолжительности низкотемпературного воздействия, но и от скорости снижения температуры [Patterson, Reid, 1990]. Например, еще в 1837 г. было отмечено, что быстрое понижение температуры в отличие от постепенного охлаждения приводит к остановке движения цитоплазмы у водоросли *Chara*. Имеются данные, также по большей части полученные уже давно, свидетельствующие о том, что резкое охлаждение часто влияет на те или иные физиологические процессы и показатели растений не так, как постепенное снижение температуры до тех же значений. В частности, к чувствительным к резкому снижению температуры процессам относятся движение цитоплазмы, флоэмный транспорт, рост, поглощение воды и мембранный потенциал [Minorsky, 1989]. Тем не менее до сих пор этому аспекту температурного воздействия на растения в исследованиях адаптации растений к низким положительным температурам должное внимание не уделялось. Анализ имеющихся литературных данных провести довольно сложно, так как в большинстве работ не указывается или не измеряется, с какой скоростью

происходило снижение температуры. Кроме того, нужно отметить, что в работах речь может идти о быстром понижении температуры (rapid-cooling treatment), независимо от того, до какого конкретного значения оно происходит (при этом часто изменения происходят в пределах зоны оптимума), или о холодовом шоке (cold shock), когда температура быстро снижается до низких положительных значений. Особенно часто холодовой шок имеет место в лабораторных экспериментах, когда растения перемещают из обычных (нормальных) условий в условия действия низкой температуры практически одновременно (переставляют из одной климатической камеры в другую).

Чувствительность растений к быстрому снижению температуры варьирует среди видов и сортов и может зависеть от их генетических особенностей, стадии развития и физиологического состояния растения. В среднем скорость снижения температуры более чем 1–10 °С/мин вызывает в растениях реакции, отличные от реакций на постепенное снижение температуры. Однако даже при скорости снижения температуры в таком диапазоне реакции растений на быстрое охлаждение могут не проявляться, если величина перепада температуры меньше, чем некоторое пограничное значение (чаще всего перепад температуры должен быть в пределах от 2 до 10 °С) [Minorsky, 1989].

Время суток, когда растения подвергаются действию низких температур, также играет определенную роль, так как чувствительность к холоду у растений может колебаться в течение суток [Patterson, Reid, 1990; Stavang et al., 2007]. В связи с этим задача данной работы заключалась в изучении влияния скорости снижения температуры на реакцию растений *Cucumis sativus* L. на ДРОП в конце ночного или в начале светового периода.

Материалы и методы

Растения огурца (*Cucumis sativus* L., Кураж F1) выращивали в камере искусственного

климата (Vötsch, Германия) в сосудах с песком при поливе полным питательным раствором (рН 6,2–6,4), температуре воздуха 25/20 °С (день/ночь), ФАР 250 мкмоль/ (м²·с), фотопериоде 16 ч, влажности воздуха 70 %. Ежесуточные кратковременные (2 ч) понижения температуры (ДРОП) до 9 °С в конце ночного (темновой ДРОП) или в начале дневного (световой ДРОП) периода проводили в течение 14 суток в период роста первого настоящего листа (с 7-го по 20-й день от посадки). Температуру снижали и повышали или постепенно (со скоростью 0,4 °С/мин), или резко (11 °С/мин), путем перестановки растений из одной климатической камеры в другую (Snijders Microclima 1750, Нидерланды). Контрольные растения выращивали при температуре 25/20 °С, производя изменения температуры со скоростью 0,4 °С/мин.

В конце опыта определяли высоту растений, площадь, число листьев длиной более 1 см, сухую биомассу растений.

Общее содержание хлорофиллов *a* и *b* определяли с помощью измерителя уровня хлорофилла SPAD 502 Plus (Konica Minolta, Osaka, Япония). Для измерения 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. Измерения проводили на первом настоящем листе, достигшем зрелости.

О холодоустойчивости клеток первого настоящего листа судили по температуре (LT_{50}), вызывающей гибель 50 % палисадных клеток листовых высевок после их 5-минутного промораживания в термоэлектрическом термостате ТЖР («Интерм», Россия) при последовательном снижении температуры 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.

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. 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

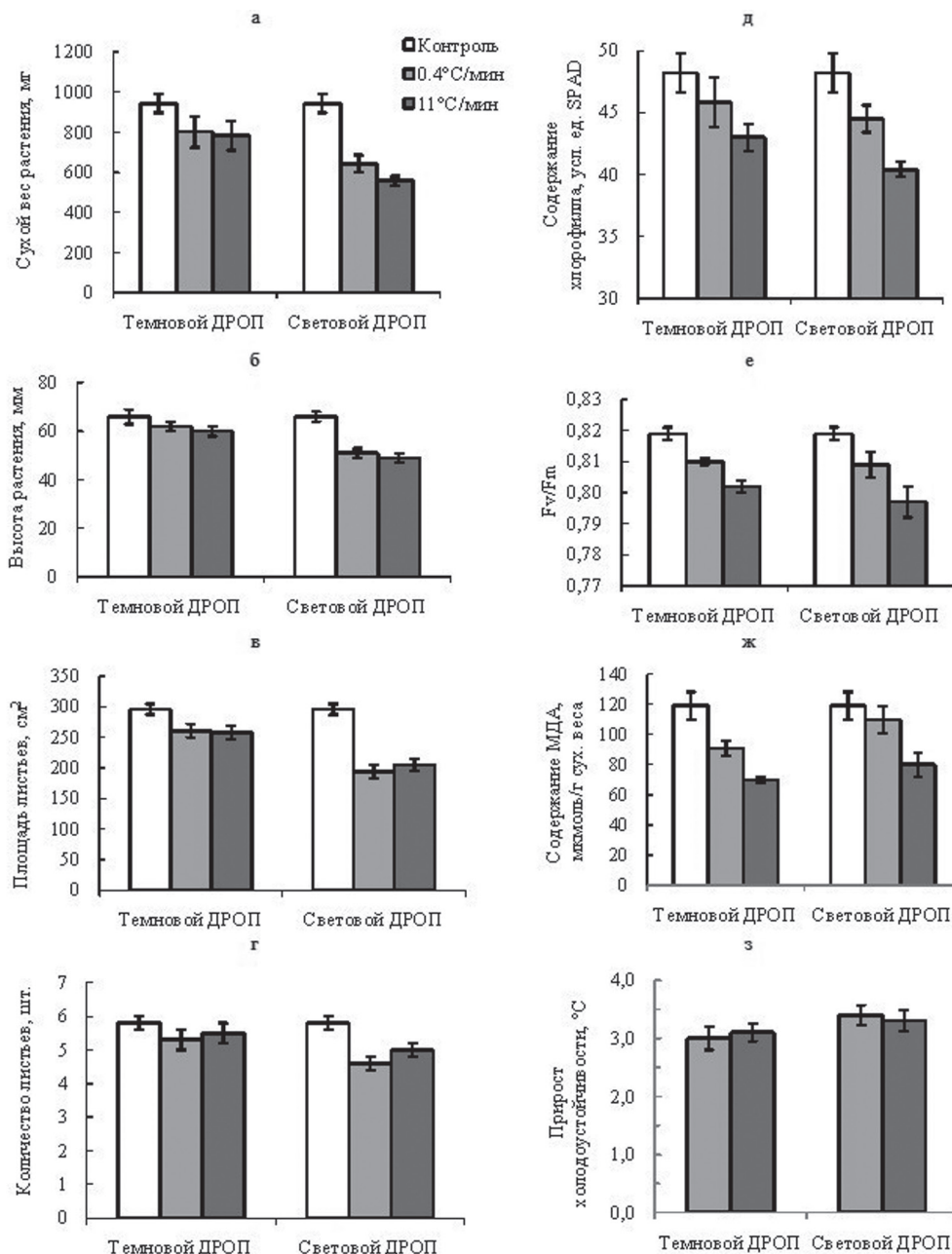
МДА использовали коэффициент экстинкции, равный 155/(мм см). Концентрацию МДА выражали в мкмоль/г сухой массы листьев.

Результаты представлены в виде средних значений по двум-трем независимым опытам (в каждом отдельном опыте использовали шесть и более биологических повторностей) и их стандартных ошибок. Достоверность различий между средними определена с помощью дисперсионного анализа с использованием программного обеспечения Statistica (v. 8.0.550.0, StatSoft, Inc.). Разницу между средними значениями считали значимой при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты показали, что быстрое или медленное снижение температуры во время ДРОП-воздействий оказывает неодинаковое влияние на состояние фотосинтетического аппарата (содержание хлорофиллов, величину F_v/F_m , накопление биомассы растений и интенсивность перекисного окисления липидов) (рис.). При этом резкие изменения температуры во время ДРОП-обработок оказали на растения более сильное влияние. Важно отметить, что различия в реакции растений на ДРОП, связанные со скоростью изменения температуры, были более выраженными в случае, когда ДРОП-обработкам растения подвергались на свету. Так, если у растений, подвергавшихся темновому ДРОП с постепенным или резким изменением температуры, биомасса была ниже, чем у контрольных растений, соответственно на 15 и 17 %, то при действии ДРОП на свету – на 32 и 41 %. Содержание хлорофиллов снижалось в варианте темнового ДРОП на 5 и 13 %, а при световом ДРОП – на 10 и 30 % при постепенном и резком изменении температуры соответственно. Величина F_v/F_m снижалась с 0,820 (в контроле) до 0,810 и 0,802 при темновом ДРОП и до 0,809 и 0,797 при световом ДРОП в вариантах с постепенным и резким изменением температуры соответственно. В то же время скорость изменения температуры не сказывалась на таких показателях, как высота растений, скорость появления и площадь листьев, их холодоустойчивость (рис.).

Из литературы известно, что для некоторых физиологических параметров растений скорость охлаждения часто играет более важную роль, чем длительность воздействия низкой температуры. Наиболее показательным примером служит флоэмный транспорт. Резкое снижение температуры всего на 2,5 °С (с 30 до 27,5 °С) останавливает флоэмный транспорт на 3 минуты [Minchin, Thorpe, 1983]. При этом



Влияние скорости снижения температуры на биомассу (а) и высоту (б) растения, площадь (в) и количество (г) листьев, содержание хлорофиллов (д), максимальный квантовый выход фотохимической активности ФС II (е), интенсивность перекисного окисления липидов (ж) и прирост холодоустойчивости (з) растений *Cucumis sativus* при действии ДРОП в темноте и на свету

медленное охлаждение (менее 5 °C/мин) не приводит к подобному эффекту. Интересно отметить, что корреляция между чувствительностью флоэмного транспорта к холодному шоку и другими сторонами холодочувствительности растений отсутствует, что показано в исследовании на 86 видах растений, принадлежащих к 50 семействам [Lang, Minchin, 1986]. Помимо того, что изменения разных физиологических процессов в ответ на резкое или постепенное

снижение температуры могут не коррелировать между собой, в реакциях растений на снижение температуры с неодинаковой скоростью наблюдается еще и видоспецифичность, что дополнительно усложняет понимание того, как растения реагируют на понижение температуры. Например, резкое падение температуры с 25 до 3 °C приводит к ингибированию флоэмного транспорта практически у всех двудольных (из 86 исследованных видов), но только у 30 %

однодольных [Lang, Minchin, 1986]. При этом уровень холодоустойчивости видов в данном случае не имеет значения. Холодовой шок тормозит флоэмный транспорт у холодостойкого лютика (*Ranunculus repens*), но не влияет на него у теплолюбивой кукурузы (*Zea mays*). Еще одним процессом, очень чувствительным к резкому снижению температуры, является движение цитоплазмы, которое в отличие от флоэмного транспорта тесно коррелирует с другими откликами растения на охлаждение. Показано, что циклоз в трихомах теплолюбивых растений огурца, томата (*Solanum lycopersicum*), арбуза (*Citrullus lanatus*), табака (*Nicotiana tabacum*) и сладкого перца (*Capsicum annuum*) останавливается, когда ткани подвергаются холодовому шоку при переносе их в помещение с температурой 10 °С или ниже. В противоположность этому у более холодостойких видов – редиса (*Raphanus sativus*), моркови (*Daucus carota*) и аистника (*Erodium cicutarium*) даже резкое понижение температуры до 2,5 °С не приводит к остановке тока цитоплазмы. При постепенном снижении температуры (1 °С/мин или меньше) у ряда теплолюбивых видов, таких как табак, томат, арбуз, ток цитоплазмы не останавливается даже при снижении температуры до значений ниже 10 °С [Patterson, Graham, 1977; Woods et al., 1984]. Добавим, что степень снижения скорости тока цитоплазмы при действии низкой температуры, а также скорость восстановления при возврате в теплые условия у разных видов растений различаются.

В нашей работе резкое снижение температуры (от 20 до 9 °С) при кратковременных (2 ч) низкотемпературных воздействиях (ДРОП) оказало более выраженное негативное воздействие на состояние фотосинтетического аппарата растений и накопление биомассы по сравнению с постепенным изменением температуры, и различия были более выраженными при действии ДРОП на свету. В то же время линейный рост и развитие растений, а также холодоустойчивость листьев изменялись под влиянием ДРОП независимо от скорости снижения температуры.

В литературе имеются данные о том, что в восприятии растением скорости охлаждения ведущую роль играют холодоустойчивые кальциевые каналы, и высказано мнение, что именно они являются первичными сенсорами низкотемпературного воздействия [Minorsky, Spanswick, 1989]. Результаты нашей работы хотя и не позволяют говорить о механизмах восприятия растением скорости снижения температуры, но подтверждают, что растения действительно способны «измерять» скорость

падения температуры и реагировать на это вполне определенным образом. Кроме того, данная работа показала, что при непродолжительном действии на растения низких положительных температур (cold shock) быстрое снижение температуры (более 10 °С/мин) вызывает в растениях ряд реакций, отличных от тех, которые наблюдаются при постепенном снижении температуры. Время суток, а скорее всего, наличие или отсутствие света в тот период, когда растения подвергаются действию низких температур, также играет важную роль в ответных реакциях растений. Все эти аспекты реакции растений на действие пониженных температур необходимо учитывать в лабораторных экспериментах, когда при изучении того или иного влияния температуры на растения практикуется резкая ее смена, которая достигается путем быстрой перестановки растений из одних температурных условий в другие.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП НО Института биологии КарНЦ РАН при финансовой поддержке из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (тема № 0221-2014-0002) и РФФИ (проект № 14-04-00840_а).

Литература

Дроздов С. Н., Будыкина Н. П., Курец В. К., Багагурова Н. И. Определение устойчивости растений к заморозкам // Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды. Л.: Колос, 1976. С. 222–228.

Марковская Е. Ф., Сысоева М. И., Харьковина Т. Г., Шерудило Е. Г. Влияние кратковременного снижения ночной температуры на рост и холодостойкость растений огурца // Физиология растений. 2000. Т. 47, № 4. С. 511–515.

Сысоева М. И., Шibaева Т. Г., Шерудило Е. Г. Способ выращивания рассады томата в защищенном грунте // Бюллетень Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. 2013. № 28. 6 с.

Шibaева Т. Г., Марковская Е. Ф., Икконен Е. Н., Шерудило Е. Г. Оценка эффективности ДРОП-обработки растений томата для предотвращения фотоповреждения листьев в условиях круглосуточного освещения // Российская сельскохозяйственная наука. 2015. Т. 5. С. 10–13.

Шibaева Т. Г., Шерудило Е. Г. Влияние ДРОП-воздействий разной интенсивности на растения томата в условиях круглосуточного освещения // Материалы Международной научной конференции и школы молодых ученых «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Калининград, 19–25 мая 2014 г.). Калининград: Аксиос, 2014. С. 489–491.

Heath R. L., Parker L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // *Arch. Biochem. Biophys.* 1968. Vol. 125. P. 189–198.

Lang A., Minchin P. E. H. Phylogenetic distribution and mechanism of translocation inhibition by chilling // *J. Exp. Bot.* 1986. Vol. 37. P. 389–398. doi: 10.1093/jxb/37.3.389

Minchin P. E. H., Thorpe M. R. A rate of cooling response in phloem translocation // *J. Exp. Bot.* 1983. Vol. 34. P. 529–536. doi: 10.1093/jxb/34.5.529

Minorsky P. V. Temperature sensing by plants: a review and hypothesis // *Plant Cell Environ.* 1989. Vol. 12. P. 119–135. doi: 10.1111/j.1365-3040.1989.tb01924.x

Minorsky P. V., Spanswick R. M. Electrophysiological evidence for a role for calcium in temperature sensing by roots of cucumber seedlings // *Plant Cell Environ.* 1989. Vol. 12. P. 137–143. doi: 10.1111/j.1365-3040.1989.tb01925.x

Mortensen L. M., Moe R. Effects of various day and night temperature treatments on the morphogenesis and growth of some greenhouse and bedding plant species // *Acta Hortic.* 1992. Vol. 327. P. 77–86.

Patterson B. D., Graham D. Effect of chilling temperatures on the protoplasmic streaming of plants from different climates // *J. Exp. Bot.* 1977. Vol. 28. P. 736–743. doi: 10.1093/jxb/28.3.736

Patterson B. D., Reid M. S. Genetic and environmental influences on the expression of chilling injury. In: C. Y. Wang (ed.), *Chilling Injury of Horticultural Crops*. CRC Press, Boca Raton, FL. 1990. P. 87–112.

Stavang J. A., Junttila O., Moe R., Olsen J. E. Differential temperature regulation of GA metabolism in light and darkness in pea // *J. Exp. Bot.* 2007. Vol. 58. P. 3061–3069. doi: 10.1093/jxb/erm163

Ueber E., Hendriks L. Effects of intensity, duration and the time of a temperature drop on growth and flowering of *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex. Klotzsch // *Acta Hortic.* 1992. Vol. 327. P. 33–37.

Woods C. M., Reid M. S., Patterson B. D. Response to chilling stress in plant cells. I. Changes in cyclosis and cycloplasmic structure // *Protoplasma*. 1984. Vol. 121, no. 1. P. 8–16. doi: 10.1007/BF01279747

Поступила в редакцию 05.09.2016

References

Drozдов S. N., Budykina N. P., Kurec V. K., Balagurova N. I. Opredelenie ustojchivosti rastenij k zamorozkam [Evaluation of frost tolerance in plants]. *Metody ocenki ustojchivosti rastenij k neblagopriyatnym usloviyam srede* [Methods for assessment of plant resistance to unfavorable conditions]. Leningrad: Kolos, 1976. P. 222–228.

Markovskaya E. F., Sysoeva M. I., Kharkina T. G., Sherudilo E. G. Vliyanie kratkovremennogo snizheniya nochnoi temperatury na rost i kholodostoikost' rastenii ogurtsa [Influence of a night temperature drop on the growth and cold tolerance of cucumber plants]. *Fiziologiya rastenii* [Russian Journal of Plant Physiology]. 2000. Vol. 47, no. 34. P. 445–448.

Sysoeva M. I., Shibaeva T. G., Sherudilo E. G. Spособ vyrashchivaniya rassady tomata v zashchishchenom grunte [Method of tomato seedlings growing under cover]. *Byulleten' Federal'noj sluzhby po intellektual'noj sobstvennosti, patentam i tovarnym znakam* [Bulletin of the Fed. Service for Intellectual Property (Rospatent)]. 2013. No. 28. 6 p.

Shibaeva T. G., Markovskaya E. F., Ikkonen E. N., Sherudilo E. G. Otsenka effektivnosti DROP-obrabotki rastenii tomata dlya predotvrashcheniya fotopovrezhdeniya list'ev v usloviyakh kruglosutochnogo osveshcheniya [Tomato plants under continuous lighting: evaluation of DROP treatment to avoid photodamage]. *Rossiiskaya sel'skokhozyaistvennaya nauka* [Russian Agricultural Sciences]. 2015. Vol. 5. P. 10–13. doi: 10.3103/S1068367415060221

Shibaeva T. G., Sherudilo E. G. Vliyanie DROP-vozdeystvij raznoj intensivnosti na rasteniya tomata v usloviyakh kruglosutochnogo osveshcheniya [Effect of DROP treatment of different intensity on tomato plants under continuous lighting]. *Materialy Mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii i shkoly molodyh uchenykh*

“Fiziologiya rastenij – teoreticheskaya osnova innovacionnyh agro- i fitobiotekhnologij” (Kaliningrad, 19–25 maya 2014 g.) [Proceed. of the Int. Sci. Conf. and School for Young Scientists “Plant Physiology as Theoretical Basis for Innovative Agriculture and Phytobiotekhnologies” (Kaliningrad, May 19–25, 2014)]. Kaliningrad: Aksios, 2014. P. 489–491.

Heath R. L., Parker L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1968. Vol. 125. P. 189–198.

Lang A., Minchin P. E. H. Phylogenetic distribution and mechanism of translocation inhibition by chilling. *J. Exp. Bot.* 1986. Vol. 37. P. 389–398. doi: 10.1093/jxb/37.3.389

Minchin P. E. H., Thorpe M. R. A rate of cooling response in phloem translocation. *J. Exp. Bot.* 1983. Vol. 34. P. 529–536. doi: 10.1093/jxb/34.5.529

Minorsky P. V. Temperature sensing by plants: a review and hypothesis. *Plant Cell Environ.* 1989. Vol. 12. P. 119–135. doi: 10.1111/j.1365-3040.1989.tb01924.x

Minorsky P. V., Spanswick R. M. Electrophysiological evidence for a role for calcium in temperature sensing by roots of cucumber seedlings. *Plant Cell Environ.* 1989. Vol. 12. P. 137–143. doi: 10.1111/j.1365-3040.1989.tb01925.x

Mortensen L. M., Moe R. Effects of various day and night temperature treatments on the morphogenesis and growth of some greenhouse and bedding plant species. *Acta Hortic.* 1992. Vol. 327. P. 77–86.

Patterson B. D., Graham D. Effect of chilling temperatures on the protoplasmic streaming of plants from different climates. *J. Exp. Bot.* 1977. Vol. 28. P. 736–743. doi: 10.1093/jxb/28.3.736

Patterson B. D., Reid M. S. Genetic and environmental influences on the expression of chilling injury. In:

C. Y. Wang (ed.), Chilling Injury of Horticultural Crops. CRC Press, Boca Raton, FL. 1990. P. 87–112.

Stavang J. A., Junntila O., Moe R., Olsen J. E. Differential temperature regulation of GA metabolism in light and darkness in pea. *J. Exp. Bot.* 2007. Vol. 58. P. 3061–3069. doi: 10.1093/jxb/erm163

Ueber E., Hendriks L. Effects of intensity, duration and the time of a temperature drop on growth and

flowering of *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex. Klotzsch. *Acta Hort.* 1992. Vol. 327. P. 33–37.

Woods C. M., Reid M. S., Patterson B. D. Response to chilling stress in plant cells. I. Changes in cyclosis and cycloplasmic structure. *Protoplasma.* 1984. Vol. 121, no. 1. P. 8–16. doi: 10.1007/BF01279747

Received September 05, 2016

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Шибалева 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

Шерудило 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

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

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

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

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: 185000, 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 брюхоногого 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. Описания 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 его библиографическое описание вместо транслитерированного. Библиографические описания прочих работ приводятся на языке оригинала. Для составления списка рекомендуется использование бесплатной программы транслитерации на сайте <http://translit.ru/>, вариант BCI.

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.

В транслитерированном списке литературы:

Vol'f G. N. Dispersiya opticheskogo vrasheniya 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

В транслитерированном списке литературы:

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

Марьянских 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.

В транслитерированном списке литературы:

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: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1985. 23 с.

Лозовик П. А. Гидрогеохимические критерии состояния поверхностных вод гумидной зоны и их устойчивости к антропогенному воздействию: дис. ... докт. хим. наук. Петрозаводск, 2006. 481 с.

В транслитерированном списке литературы:

Sheftel' B. I. Ekologicheskie aspekty prostranstvenno-vremennykh mezvidovykh vzaimootnoshenii zemlerоек Srednei Sibiri [Ecological aspects of spatio-temporal interspecies relations of shrews of Middle Siberia]: Summary of PhD (Cand. of Biol.) thesis. Moscow, 1985. 23 p.

Lozovik P. A. Gidrogeokhimicheskie kriterii sostoyaniya poverkhnostnykh vod gumidnoi zony i ikh ustoichivosti k antropogennomu vozdeistviyu [Hydrogeochemical criteria of the state of surface water in humid zone and their tolerance to anthropogenic impact]: DSc (Dr. of Chem.) thesis. Petrozavodsk, 2006. 481 p.

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.

В транслитерированном списке литературы:

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.

В транслитерированном списке литературы:

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: 25.12.2015).

Демография. Официальная статистика / Федеральная служба государственной статистики [Электронный ресурс]. URL: <http://www.gks.ru/> (дата обращения: 25.12.2015).

В транслитерированном списке литературы:

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).

Demografiya. 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.

В транслитерированном списке литературы:

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

ORIGINAL PAPERS

O. N. Lebedeva, T. S. Nikolaevskaya, A. F. Titov. GENOMIC IMPRINTING IN F_1 HYBRID PROGENIES OF <i>FESTUCA PRATENSIS</i> HUDS. WITH SUPPRESSED TEMPERATURE-DEPENDENT CHLOROPHYLL DEFECTS	3
M. V. Zaretskaya, O. M. Fedorenko. GENETIC DIVERSITY AND POPULATION STRUCTURE OF THE SPECIES <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> (L.) HEYNH. ON VALAAM ISLAND	9
N. M. Kaznina, Yu. V. Batova, A. F. Titov, G. F. Laidinen. ROLE OF ANTIOXIDANT SYSTEM COMPONENTS IN ADAPTATION OF <i>ELYTRIGIA REPENS</i> (L.) 'NEVSKI' TO CADMIUM	17
G. A. Abilova. EFFECT OF CADMIUM AND LEAD IONS ON THE GROWTH AND CONTENT OF PROLINE IN PLANTS OF TRITICALE (<i>Triticosecale</i> Wittm. ex A Camus)	27
A. S. Goryunov, S. P. Rozhkov, G. A. Sukhanova, A. G. Borisova. THERMODYNAMIC EFFECTS OF SERUM ALBUMIN INTERACTION WITH SHUNGITE NANOCARBON	33
M. Yu. Krupnova, E. A. Vdovichenko, R. U. Vysotskaya, D. A. Efremov, A. E. Veselov, N. N. Nemova. THE ACTIVITY OF LYSOSOMAL HYDROLASES (PROTEASES AND NUCLEASES) IN SALMON (<i>SALMO SALAR</i> L.) JUVENILES OF DIFFERENT AGE CATEGORIES FROM THE INDERA RIVER	39
A. A. Kochneva, E. V. Borvinskaya, I. V. Sukhovskaya, E. P. Ieshko, L. P. Smirnov. ENZYMATIC ACTIVITY OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE AND THE LEVEL OF REDUCED GLUTATHIONE IN PIKE <i>ESOX LUCIUS</i> L. AND ITS OBLIGATE PARASITE CESTODE <i>TRIAENOPHORUS NODULOSUS</i>	48
A. A. Ignatenko, N. S. Repkina, A. F. Titov, V. V. Talanova. THE RESPONSE OF CUCUMBER PLANTS TO LOW TEMPERATURE IMPACTS OF VARYING INTENSITY	57
K. M. Nikerova, N. A. Galibina, Yu. L. Moshchenskaya, L. L. Novitskaya, M. N. Podgornaya, I. N. Sofronova. CATALASE ACTIVITY IN LEAVES OF SILVER BIRCH SEEDLINGS OF DIFFERENT FORMS (<i>BETULA PENDULA</i> ROTH): VAR. <i>PENDULA</i> AND VAR. <i>CARELICA</i> (MERCKLIN)	68
Yu. L. Moshchenskaya, N. A. Galibina, K. M. Nikerova, L. L. Novitskaya. ACTIVITY OF SUCROSE DISSIMILATING ENZYMES IN EARLY ONTOGENY IN DIFFERENT FORMS OF SILVER BIRCH	78
A. G. Kizhina, L. B. Uzenbaeva, V. V. Ilyukha, N. N. Tyutyunnik. ACTIVITY OF LEUKOCYTE ENZYMES IN AMERICAN MINK (<i>NEOVISON VISON</i>): GENOTYPIC AND AGE-RELATED DIFFERENCES	88
S. N. Sergina, V. A. Ilyukha, L. B. Uzenbaeva, E. P. Antonova, I. V. Baishnikova, A. V. Morozov, A. G. Kizhina, E. F. Pechorina, I. I. Okulova. MODIFICATION OF PHYSIOLOGICAL SYSTEMS IN SILVER FOXES AND ARCTIC FOXES DURING LATE POSTNATAL ONTOGENY	98

SHORT COMMUNICATIONS

N. P. Kantserova, L. A. Lysenko, I. N. Bakhmet, N. N. Nemova. THE EFFECT OF CADMIUM IONS ON INTRACELLULAR CALCIUM-DEPENDENT PROTEINASES IN MUSSEL <i>MYTILUS EDULIS</i> L.	113
--	-----

T. G. Shibaeva, E. G. Sherudilo, A. F. Titov. THE EFFECT OF COOLING RATE ON CUCUMBER PLANT RESPONSE TO A DAILY SHORT-TERM TEMPERATURE DROP	121
INSTRUCTIONS FOR AUTHORS	128

Научное издание

**Труды Карельского научного центра
Российской академии наук**
№ 11, 2016

Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

*Печатается по решению
Президиума Карельского научного центра РАН*

Выходит 12 раз в год

Свидетельство о регистрации СМИ ПИ № ФС77-65995 от 06.06.2016 г.
выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи,
информационных технологий и массовых коммуникаций

Редактор А. И. Мокеева
Компьютерная верстка Г. О. Предтеченский

Подписано в печать 17.11.2016. Дата выхода 30.11.2016. Формат 60x84^{1/8}.
Печать офсетная. Уч.-изд. л. 14,8. Усл. печ. л. 15,8.
Тираж 150 экз. Заказ 390. Цена свободная

Учредитель и издатель: Карельский научный центр РАН, 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

Оригинал-макет: Редакция научного издания «Труды КарНЦ РАН»

Типография: Редакционно-издательский отдел КарНЦ РАН
185003, г. Петрозаводск, пр. А. Невского, 50