Подписной индекс в каталоге «Роспечать» **57397**

ТРУДЫ КАРЕЛЬСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РАН. № 3, 2011. Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

ISSN 1997-3217

Труды
КАРЕЛЬСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

№ 3, 2011

transactions.krc.karelia.ru

Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

СОДЕРЖАНИЕ

Карельский научный центр
Российской академии наук

ТРУДЫ
КАРЕЛЬСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

Петрозаводск
2011

Труды Карельского научного центра
Российской академии наук
№ 3, 2011. Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

ISSN 1997-3217

Зав. редакцией Н. В. Михайлова
Адрес редакции: 185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11
тел.: (8-8142)780109; (8-8142)769600
E-mail: trudy@krc.karelia.ru
Электронная полнотекстовая версия: transactions.krc.karelia.ru

Труды Карельского научного центра РАН
№ 3, 2011. С. 3–11.

УДК 591.133.16: 591.05: 639.113

ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНА Е НА АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ ПЕСЦОВ И ЛИСИЦ

И. В. Баишникова[1], С. Н. Сергина[1], Т. Н. Ильина[1], Н. Н. Тютюнник[1], В. А. Илюха[1,2]

[1] *Институт биологии Карельского научного центра РАН*
[2] *Петрозаводский государственный университет*

Исследовано влияние дополнительного введения витамина Е (100 мг/животное/сутки в течение 14 дней) на антиоксидантную систему (АОС) 6 органов и тканей введенных в зоокультуру вуалевых песцов и серебристо-черных лисиц. Установлена видо- и органоспецифичность реакции АОС на дополнительный витамин. Самым чувствительным к данному воздействию оказался уровень восстановленного глутатиона. Наибольшее количество изменений исследованных показателей отмечено у песцов.

Ключевые слова: антиоксидантная система, витамин Е, лисица, песец.

I. V. Baishnikova, S. N. Sergina, T. N. Ilyina, N. N. Tyutyunnik, V. A. Ilyukha
EFFECT OF VITAMIN E ON THE ANTIOXIDANT SYSTEM IN BLUE AND SILVER FOXES

The effect of dietary vitamin E (100 mg/animal/day within 14 days) on the antioxidant system (AOS) in 6 tissues of fur-breeding blue and silver foxes was evaluated. The species- and tissues-related reactions of AOS on vitamin E administration were revealed. The level of reduced glutathione has proven to be the most sensitive parameter to this influence. Blue foxes were found to have the most number of the indices changed.

Key words: antioxidant system, vitamin E, silver fox, blue fox.

Введение

Витамин Е выполняет в организме множество функций и играет важную роль в метаболических процессах. Биологическое действие данного витамина преимущественно связывается с антиоксидантными свойствами, однако при определенных условиях он может выступать в качестве прооксиданта, что позволяет рассматривать его как регуляторное соединение, способствующее поддержанию свободнорадикальных реакций в организме на определенном стационарном уровне [Меньщикова и др., 2006; Kontush et al., 1996; Ricciarelli et al., 2001]. Несмотря на обилие информации об эффектах и метаболизме витамина Е, не выяснены некоторые вопросы взаимодействия его с другими антиоксидантами [Herrera, Barbas, 2001]. Так как компоненты антиоксидантной системы находятся во взаимокомпенсаторных отношениях, искусственное повышение в организме одного антиоксиданта может влиять на содержание других [Меньщикова и др., 2006].

Поскольку образование токоферолов в организме млекопитающих невозможно, они являются незаменимыми компонентами пищи. Потребность хищных млекопитающих в витамине Е определяется множеством факторов, таких как физиологическое состояние организма, питательная ценность и состав пищи и др. [Надиров, 1991]. В клетках животных обнаруживается главным образом α-токоферол, локализованный преимущественно в богатых ненасыщенными липидами мембранах митохондрий и лизосом [Wang, Quinn, 1999].

В данной работе оценивалось влияние витамина Е на отдельные компоненты антиоксидантной системы шести органов и тканей представителей двух видов семейства Собачьи (*Canidae*), различающихся по экогенезу.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись 6-месячные самки вуалевых песцов (*Alopex lagopus* L.) и серебристо-черных лисиц (*Vulpes vulpes* L.), разводимые в неволе. Животные каждого вида были разделены на 2 группы: контрольную и подопытную, по 6 особей в каждой. Дополнительно к основному рациону животные подопытных групп в течение 14 дней в ноябре получали с утренней порцией корма dl-α-токоферилацетат в количестве 100 мг/животное. Согласно нормам питания суточная потребность лисиц и песцов в витамине Е составляет от 6–10 до 50 мг [Перельдик и др., 1981; Паркалов, 2006]. В основной рацион исследуемых животных в зверохозяйстве добавляют 15 мг витамина Е на зверя. Образцы тканей печени, почек, сердца, селезенки, легких и скелетной мышцы, а также кровь отбирали в период планового забоя животных на звероферме, замораживали и хранили до анализа при –25 °С.

С помощью хемилюминесцентного анализа определяли уровень генерации активных форм кислорода (АФК) с применением индуктора $FeSO_4$ и активаторов свечения люминола и люцигенина для характеристики ферментативного и неферментативного компонентов системы генерации АФК соответственно [Klinger et al., 1996]. Спектрофотометрически измеряли: активности антиоксидантных ферментов (АОФ) – супероксиддисмутазы (СОД) – по модифицированной адренохромной методике [Misra, Fridovich, 1972] и каталазы по количеству разложенной H_2O_2 [Bears, Sizer, 1952], уровень восстановленного глутатиона (GSH) по методу Эллмана [Sedlak, Lindsay, 1968], а также содержание белка по Лоури [Lowry et al., 1951] с использованием в качестве стандарта бычьего сывороточного альбумина. Концентрации α-токоферола и ретинола в тканях определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [Скурихин, Двинская, 1989], стандартами служили α-токоферол и ретинол фирмы Sigma (США).

Данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики, группы сравнивали с применением непараметрического критерия Манна-Уитни [Коросов, Горбач, 2007]. Взаимозависимость между признаками оценивали методом корреляционного анализа. Напряженность работы системы антиоксидантов характеризовали с помощью показателя индекса скоррелированности: $I=\sum|rij|$, где rij – коэффициенты корреляции между признаками, достоверно отличающиеся от 0 при $p<0,01$.

Результаты и обсуждение

Концентрация α-токоферола в сыворотке крови контрольных песцов и лисиц была практически одинаковой, в то время как в органах значительно различалась (табл. 1). Так, у песцов уровень витамина во всех исследованных органах был значительно выше, чем у лисиц: в селезенке разница составила 9,4 раза, скелетной мышце – 3,4, легких – 2,5, печени и почках – 1,7 и сердце – 1,6 раза. Сходным для двух видов было то, что максимальное количество у песцов и лисиц зафиксировано в почках, среди органов с минимальным содержанием токоферола были сердечная и скелетная мышцы. Известно, что содержание в тканях и метаболизм витамина Е видоспецифичны [Надиров, 1991; Меньщикова и др., 2006]. Витамин Е принимает активное участие в обменных процессах, что и может обусловливать наблюдаемые межвидовые различия. Согласно исследованиям Позднякова [1954], основной обмен у щенков песцов в возрасте от 2 до 6 месяцев примерно на 33% выше, чем у щенков лисиц того же возраста. Вместе с тем другими авторами [Klir, Heath, 1992] не было обнаружено межвидовых различий в уровне основного обмена у песцов и лисиц, виды различались только по величине критических температур и термонейтральной зоне.

При дополнительном введении витамина Е в рацион наблюдалось увеличение уровня α-токоферола в сыворотке крови песцов подопытной группы, у лисиц же его содержание даже несколько снижалось. Незначительные изменения содержания токоферола в сыворотке связаны с тем, что при дополнительном приеме витамина Е не наблюдается прямой корреляции между ежедневным поступлением и его уровнем в плазме крови. Для человека установлено, что концентрация токоферола в крови лимитирована (≤ 150 мг RRR-α-токоферилацетата) и может повышаться лишь в 2–3 раза, не-

Таблица 1. Содержание α-токоферола и ретинола в сыворотке (мкмоль/л) и органах (мкг/г) песцов и лисиц

Орган, ткань	Группа	Песцы		Лисицы	
		Ретинол	Токоферол	Ретинол	Токоферол
Сыворотка	К	0,28±0,04	119,27±5,28	0,24±0,03	109,96±14,80
	О	0,95±0,20*	143.09±8.47	0,41±0,17	96,20±6,50
Печень	К	нд	52,31±1,24	0,36±0,14	30,21±5,22
	О	нд	24,47±3,42*	0,38±0,21	68,85±32,62
Почки	К	16,64±2,01	166,41±15,74	31,75±3,07	99,23±12,32
	О	15,58±1,73	272,76±43,25*	61,62±12,43*	243,21±32,37*
Сердце	К	нд	22,66±2,33	нд	14,51±1,38
	О	нд	165,19±59,25*	0,61±0,02	31,84±10,81*
Легкие	К	нд	43,61±12,65	нд	17,48±5,87
	О	нд	41,79±14,48	0,25	36,96±15,45
Селезенка	К	0,15	75,84±37,43	0,13±0,02	8,11±1,71
	О	нд	42,69±14,97	0,25±0,05	15,43±3,55
Скелетная мышца	К	нд	37,41±6,85	нд	10,87±1,44
	О	нд	119,69±57,24	нд	44,72±19,19

Примечания. Здесь и в табл. 2–4: К – контрольная группа, О – подопытная группа; * различия между контрольной и подопытной группами достоверны (p<0,05); нд – витамин не детектировался.

зависимо от количества, продолжительности или частоты приема дополнительного витамина. Уровень α-токоферола в плазме не повышается с увеличением дозы потребляемого витамина в связи с тем, что «новый» витамин замещает «старый» в циркулирующих липопротеинах [Traber et al., 1998]. Полученные нами результаты, по-видимому, также обусловлены как активным транспортом самого токоферола, так и видовой спецификой его метаболизма, определяющей малую вероятность возникновения гипервитаминоза Е у собачьих. Дополнительный витамин Е положительно влиял у животных обоих видов на содержание в сыворотке крови витамина А, обладающего антиоксидантными свойствами: концентрация ретинола у песцов повысилась в 3,4 раза, а у лисиц – в 1,8 раза. Взаимодействие в организме этих двух витаминов зависит от уровня обеспеченности ими, применяемой дозы и множества других факторов. Ранее было показано, что витамин Е способствует всасыванию витамина А в кишечнике [Терруан, 1969; Kusin et al., 1974]. Наполи с соавторами [Napoli et al., 1984] продемонстрировали, что витамин Е влияет на метаболизм витамина А в некоторых органах, в частности снижает активность печеночной ретинилэфиргидролазы, фермента, имеющего отношение к мобилизации запасов витамина А, и тем самым способствует повышению его депонирования.

Основным органом, осуществляющим регуляцию обмена витамина Е в организме, является печень, здесь замещение «старого» витамина на «новый» происходит быстрее всего [Надиров, 1991; Palace, 1999; Меньщикова и др., 2006]. В печени исследуемых животных изменения содержания α-токоферола, вызванные его дополнительным приемом, различались: у лисиц данный показатель увеличился в 2,3 раза, а у песцов – снизился в 2,1 раза по сравнению с контролем. Наблюдаемые изменения концентрации витамина Е в печени животных подопытных групп могут быть связаны с реакцией организма на дополнительное поступление витамина с пищей и перераспределением его к органам, где потребность в нем увеличена. Снижение содержания токоферола в печени песцов, вероятно, отражает увеличение функциональной нагрузки на орган на фоне применения повышенной дозы витамина. Уровни генерации АФК в печени контрольных песцов и лисиц не различались, тем не менее у песцов активность СОД и содержание белка были ниже, а активность каталазы и уровень глутатиона – выше (табл. 2, 3). Дополнительное введение витамина Е в рацион способствовало усилению работы неферментативного компонента системы генерации АФК в печени у лисиц, снижению уровня GSH и увеличению количества белка у песцов. Интенсификация синтеза общего белка в печени песцов, вызванная дополнительным витамином Е, связана, возможно, с увеличением содержания α-токоферолсвязывающих белков (α-ТСБ), осуществляющих внутриклеточную транспортировку α-токоферола и содержащихся преимущественно в печени млекопитающих [Brigelius-Flohe et al., 2002].

Печень является центральным органом поддержания гомеостаза витамина А и основным местом его депонирования у большинства млекопитающих [Higashi et al., 2004]. Содержание ретинола в данном органе зависит от вида животного. Так, например, в печени собак концентрация витамина А намного выше, чем у человека, крыс, свиней и овец, но ниже, чем у полярного медведя [Schweigert et al., 1990]. В печени исследуемых песцов ретинол не был обнаружен, у лисиц же он детектировался лишь у половины особей в каждой группе, что могло быть обусловлено низким содержанием вита-

Таблица 2. Активности антиоксидантных ферментов, содержание глутатиона и белка в тканях органов песцов

Орган, ткань	Группа	Активность СОД, у.е./г ткани	Активность каталазы, мкмоль H_2O_2* мин / г ткани	Глутатион, ммоль/100 г ткани	Содержание белка, мг/г ткани
Печень	К	246,05±25,97	576,62±45,11	0,42±0,03	120,41±7,27
	О	239,61±15,57	624,28±60,69	0,34±0,02*	153,35±4,77*
Почки	К	191,39±6,67	180,29±5,72	0,35±0,01	200,96±12,49
	О	166,06±12,49	187,83±13,00	0,43±0,01*	157,85±7,33*
Сердце	К	72,12±11,01	21,28±2,77	0,37±0,03	63,17±8,36
	О	194,37±23,19*	25,45±2,21	0,22±0,01*	75,39±5,15
Легкие	К	114,64±13,16	24,14±2,56	0,23±0,02	112,81±12,03
	О	59,56±8,74*	30,79±2,00	0,17±0,01*	89,59±3,72
Селезенка	К	159,17±21,15	22,49±8,12	0,09±0,02	85,94±10,02
	О	214,38±17,03	17,46±1,48	0,09±0,01	96,83±4,04
Скелетная мышца	К	68,85±11,98	13,01±1,13	0,21±0,02	31,27±5,88
	О	74,09±6,47	17,76±0,78*	0,33±0,05*	51,26±3,98*

Таблица 3. Активности антиоксидантных ферментов, содержание глутатиона и белка в тканях органов лисиц

Орган, ткань	Группа	Активность СОД, у.е./г ткани	Активность каталазы, мкмоль H_2O_2* мин / г ткани	Глутатион, ммоль/100 г ткани	Содержание белка, мг/г ткани
Печень	К	327,86±14,67	593,62±36,11	0,28±0,03	196,03±14,08
	О	287,58±16,65	543,69±50,86	0,25±0,02	151,25±25,90
Почки	К	214,98±20,74	141,49±20,95	0,61±0,06	150,80±10,91
	О	209,28±13,54	138,45±17,06	0,47±0,03	154,63±4,99
Сердце	К	33,24±8,09	17,78±1,29	0,27±0,02	48,42±5,48
	О	50,22±16,52	24,07±2,97	0,30±0,03	50,34±4,30
Легкие	К	27,92±3,74	11,72±1,10	0,16±0,02	81,76±8,29
	О	49,41±4,98*	14,09±0,39*	0,18±0,02	88,72±8,60
Селезенка	К	139,67±14,10	18,39±2,39	0,26±0,01	83,47±15,47
	О	142,22±12,83	20,86±2,57	0,18±0,02*	97,56±5,44
Скелетная мышца	К	84,96±15,19	12,79±2,39	0,21±0,02	42,49±7,46
	О	109,38±8,39	10,49±2,14	0,22±0,01	73,73±4,87*

мина А в корме животных, поскольку он откладывается в печени только при адекватном поступлении с пищей. Дополнительный витамин Е не повлиял на содержание ретинола в печени песцов и лисиц.

Наиболее высокая концентрация витамина Е у обоих видов была зафиксирована в почках. Хотя в данном органе не было отмечено межвидовых различий в уровнях генерации АФК, у песцов удельная активность СОД, а также уровни глутатиона и ретинола были ниже, а содержание белка – выше. У подопытных песцов концентрация α-токоферола в почках выросла в 1,6 раза, а у лисиц – в 2,5 раза, уровень ретинола увеличился у лисиц в 1,9 раза. Дополнительный прием витамина Е сопровождался усилением работы неферментативного компонента системы генерации АФК, увеличением удельной активности каталазы и уровня GSH, а также снижением количества белка у песцов. У лисиц достоверных изменений показателей АОС почек не было обнаружено. Почки как главный выделительный орган имеют обильное кровоснабжение и напряженный обмен веществ. У представителей семейства *Canidae* почки занимают особое место в метаболизме витамина А, осуществляя экскрецию больших его количеств с мочой, что может являться одним из механизмов защиты животных от интоксикации данным витамином [Raila et al., 2000]. Наряду с этим отмечают более высокое по сравнению с печенью содержание ретинола в почках лисиц [Raila et al., 2000], а также как диких [Senoo et al., 2004], так и разводимых в неволе песцов [Петрова и др., 1987].

Одной из главных мишеней для витамина Е является мышечная ткань, а его дефицит способствует развитию заболеваний сердца, а также беломышечной болезни, основной причиной которых является повреждение клеток, вызванное окислительным стрессом [Kushi, 1999; Palace et al., 1999]. Миокард по сравнению с другими мышечными тканями богаче фосфолипидами, жирные кислоты которых, окисляясь, высвобождают значительную часть энергии, необходимой для его сокращения [Гомбоева, 2000]. Клетки сердечных мышечных волокон имеют большую мембранную поверхность, высокую напряженность процессов окисления, обильно снабжаются кровью и интенсивно генерируют активные кислородные радикалы, в связи с чем потребность сердечной ткани в антиокислительной защите велика [Архипенко и др., 1987; Надиров, 1991; Зайчик, Чурилов, 2001]. Помимо антиокислительной защиты, витамин Е выполняет в мышечных волокнах ряд важных биологических функций: нормализует обменные процессы, регулирует активность протеинкиназы С, способствует накоплению гликогена, принимает участие в синтезе сокра-

тительных белков миокарда и скелетных мышц [Ребров, Громова, 2008]. Замещение витамина Е в мышцах осуществляется медленнее, чем в печени и селезенке [Меньщикова и др., 2006].

В результате эксперимента были выявлены однонаправленные изменения в содержании витамина Е в сердечной и скелетной мышцах животных обоих видов. У песцов концентрация α-токоферола выросла в сердце в 7,3, а в скелетной мышце в 3,2 раза, у лисиц – в 2,2 и 4,1 раза соответственно. В сердце у песцов контрольной группы отмечалась более интенсивная работа ферментативного компонента системы генерации АФК и более высокий уровень GSH по сравнению с лисицами. Чувствительность системы антиоксидантной защиты сердечной мышцы представителей семейства *Canidae* к дополнительному α-токоферолу, как и в других органах, характеризовалась видоспецифичностью. Активности СОД и каталазы увеличились как у лисиц, так и у песцов, однако у последних изменение активности СОД было более значительным и сопровождалось снижением уровня GSH. Это может свидетельствовать о повышении O_2, потребляемого данной тканью песцов под действием витамина Е, а также об активном использовании в антиоксидантной защите сердца ресурса глутатиона, который важен для защиты клеток с высоким уровнем окислительного фосфорилирования [Меньщикова и др., 2006]. Данные по влиянию токоферола на АОС сердца противоречивы, а получаемые результаты связаны, очевидно, как с дозой, так и с видовыми особенностями экспериментальных животных. Показано стимулирующее влияние α-токоферола на удельные активности СОД и каталазы в сердце крыс различных возрастов [Asha Devia et al., 2003]. Другими авторами не отмечено влияния дополнительного витамина Е на отдельные эндогенные антиоксиданты сердца морских свинок. Они связывают это с возможной способностью токоферола увеличивать общую мощность АОС, не влияя на ее отдельные компоненты [Rojas et al., 1996].

Скелетная мышца песцов характеризуется более высокой аэробной мощностью за счет большей объемной плотности митохондрий по сравнению с другими млекопитающими, в том числе и представителями того же семейства *Canidae* [Kayar et al., 1994]. Содержание α-токоферола в мышечной ткани песцов было в 3,4 раза выше, чем у лисиц, тем не менее уровни генерации АФК, активности АОФ и содержание GSH в скелетной мышце животных двух видов не различались. Дополнительный витамин Е привел у лисиц к снижению удельных активностей АОФ и увеличению уровня белка, а у песцов – к повышению активности каталазы, уровней GSH и белка. Интенсификация синтеза белка в скелетной мышечной ткани как лисиц, так и песцов, вызванная дополнительным приемом витамина Е, возможно, как и в печени, связана с увеличением содержания α-ТСБ, осуществляющих внутриклеточную транспортировку витамина.

Витамин Е является самым важным липофильным антиоксидантом легких, который защищает липиды сурфактанта от окисления. При различных окислительных повреждениях ткани происходит мобилизация витамина из других органов [Kolleck et al., 2002]. В легких контрольных песцов по сравнению с лисицами наблюдались менее интенсивная работа неферментативного компонента системы генерации АФК, более высокие уровни α-токоферола, глутатиона и белка, а также значительно более высокие активности СОД (в 4 раза) и каталазы. Ранее было показано, что у песца и другого эндемика Арктики – северного оленя – существуют некоторые морфофункциональные особенности бронхиального дерева, направленные на адаптацию организма к экстремальным климатическим факторам [Воевода, Устюжанинова, 1997]. Так, у песца анатомическое мертвое пространство относительно массы тела и объема легких в 1,4–1,5 раза больше, чем у собаки за счет более сильного ветвления бронхиального дерева и большего количества кровеносных капилляров в альвеолах. Дополнительный витамин Е привел у лисиц к снижению работы неферментативного компонента системы генерации АФК и к увеличению общих активностей АОФ, а у песцов – к снижению активностей СОД и уровня GSH, что, по-видимому, отражает необходимость восстановления α-токофероксильного радикала. Восстановителями α-токофероксильного радикала (образующегося при восстановлении витамином Е фосфолипидных пероксильных радикалов) до α-токоферола являются витамин С и глутатион, от присутствия которых в клетке зависит проявление витамином Е антиоксидантных свойств [Rojas et al., 1996].

Уровни генерации АФК и активности АОФ в селезенке исследуемых животных контрольных групп не различались, тем не менее у песцов отмечено более низкое содержание GSH, а у лисиц α-токоферол в данном органе был самым низким. Дополнительный витамин Е привел к снижению содержания глутатиона у лисиц, что также может быть связано с функцией α-токоферола как необходимого антиоксиданта и модулятора иммунной системы. Отмечают особую важность витамина Е для пролиферации Т-хелперов, что связано с тушением им АФК, образующихся как митоген-индуцирующие продукты липооксигеназного пути [Lee, Wan, 2000].

Для того чтобы оценить степень функционального напряжения АОС органов при введении в рацион дополнительного витамина Е, мы использовали корреляционный анализ. Число корреляционных связей между показателями и индекс скоррелированности (ИС) позволяют охарактеризовать степень нагрузки и участие различных органов в ответной реакции [Илюха, 2004]. Как в случае отдельных компонентов АОС, так и в случае интегральной оценки состояния этой системы по степени скоординированности (степень и сила скоррелированности между показателями) отмечалась видо- и тканеспецифичность реакции на дополнительное введение витамина Е. У животных обоих видов нагрузка привела к увеличению ИС в печени и легких и снижению в сердце и скелетной мышце, однако в сердце у лисиц ИС снизился значительнее (табл. 4). В почках и селезенке животных двух видов изменения были разнонаправленными и более существенными у песцов.

Таблица 4. Индексы скоррелированности между показателями антиоксидантной системы различных органов и тканей

Орган, ткань	Песцы		Лисицы	
	К	О	К	О
Печень	0	1,86	1,83	5,55
Почки	3,49	2,52	2,59	2,77
Сердце	1,71	1,64	5,19	2,89
Легкие	2,68	5,46	3,5	6,21
Селезенка	3,77	6,25	4,66	4,41
Скелетная мышца	4,49	2,74	2,69	0,97

Особое место занимает вопрос о взаимодействии между жирорастворимыми витаминами А и Е. Анализ корреляционных связей показал, что и здесь отмечается ткане- и видоспецифичность. Так, у контрольных песцов зависимость между сывороточным витамином А и содержанием витамина Е в селезенке была положительной, а у лисиц – отрицательной. В почках, где концентрация витамина Е была самой высокой, у контрольных песцов отмечена положительная зависимость от уровня данного витамина в крови, а у контрольных лисиц – положительная связь между уровнем витаминов А и Е в ткани. У лисиц, получавших дополнительную дозу витамина Е, в печени, легких и селезенке была отмечена положительная связь между уровнем ретинола в сыворотке и его содержанием в тканях. Здесь, вероятно, проявилось витамин А сберегающее действие α-токоферола. У подопытных песцов сывороточный уровень витамина А был положительно связан с содержанием витамина Е в легких и селезенке. В скелетной мышце у песцов контрольной группы содержание витамина Е находилось в обратной зависимости от его концентрации в крови, тогда как у подопытных животных эта зависимость становилась положительной. Взаимодействие витаминов – это сложный, многосторонний, быстро меняющийся во времени процесс, зависящий от множества факторов.

Ранее было показано [Илюха, 2004], что функционирование АОС, участвующей в приспособительных реакциях организма к факторам внешней среды, обусловливается экологическими особенностями формирования вида. Во время эксперимента организм исследуемых животных находился в стадии подготовки к зимним условиям, поэтому межвидовые различия могли быть обусловлены разным уровнем жировых запасов, которые в значительной степени определяют способность животных к депонированию жирорастворимых витаминов. Песцы, в отличие от близких в систематическом отношении лисиц (оба вида принадлежат к одному семейству), характеризуются более поздними (на 2–4 недели) сроками размножения и обладают более интенсивным энергетическим обменом, однако осенью разница в уровне основного обмена между двумя видами минимальна [Перельдик и др., 1981]. Указанные физиологические особенности песцов связаны с экологическими условиями Арктики, где происходило формирование вида. Лисицы же имеют самый обширный географический ареал среди представителей отряда *Carnivora* [Canids.., 2004], в связи с чем не обладают узкоспециализированными адаптациями, что, вероятно, и обусловливает различия реакции системы антиоксидантной защиты этих двух видов семейства *Canidae* на дополнительный витамин.

Поступающий в организм животных в течение экспериментального периода витамин Е аккумулировался преимущественно в почках и мышечной ткани. Активность ферментов антиоксидантной системы была максимальной в печени и почках, самые низкие значения были у песцов в скелетной мышце, а у лисиц в легких. Именно в легких у лисиц дополнительный витамин Е вызвал увеличение активности СОД и каталазы, тогда как у песцов в данном органе активность СОД снизилась. В сердце у песцов возросла активность СОД, а в скелетной мышце – каталазы. Наблюдаемая органоспецифичность реакции АОС животных определяется функциональной ролью органа и особенностями действия данного вещества на антиоксидантную защиту тканей. Необходимо отметить, что потребность тканей в антиоксидантах, в частности в витамине Е, зависит от степени ненасыщенности липидов в составе ткани. Например, липиды сердечной мышцы содержат жирные кислоты с высокой степенью ненасы-

щенности, поэтому они более чувствительны к пероксидативному повреждению, чем мышечные липиды при дефиците витамина Е [Horwitt, 1986]. Концентрация токоферола в тканях млекопитающих изменяется линейно с количеством витамина в пище и зависит от типа ткани, дозы витамина, вида животных и продолжительности тестового периода [Yang, Desai, 1977], а включение витамина Е в состав ткани определяется необходимостью осуществления его антиоксидантного действия в органе [Brown et al., 1997].

Отмеченная реакция на витамин Е компонентов АОС могла быть обусловлена взаимокомпенсаторными отношениями между ними. Как правило, изменение концентрации или активности одних антиоксидантов оказывает влияние на другие, благодаря чему сохраняется общая активность радикальных процессов, жизненно важных для поддержания гомеостаза [Зенков и др., 2001]. Известно, что в регенерации окисленной формы витамина Е участвуют глутатион и витамин С [Rojas et al., 1996]. Возможно, поэтому наиболее чувствительным к влиянию экзогенного витамина Е компонентом АОС всех исследованных органов песцов, за исключением селезенки, оказался уровень восстановленного глутатиона (содержание небелковых тиолов). У лисиц, напротив, данный показатель изменялся только в селезенке.

Любой антиоксидант, включая и антиоксидантные витамины, фактически является редокс-агентом, защищающим от свободных радикалов в одних случаях и способствующим их генерации в других [Herbert, 1996]. Возможно, отмеченные нами изменения антиоксидантов в некоторых органах лисиц и песцов, дополнительно получавших витамин Е, были вызваны показанной для α-токоферола способностью инверсии антиоксидантного действия в прооксидантное *in vivo* при переходе от более низких концентраций вещества к более высоким [Меньщикова и др., 2008], в том числе и вследствие образования инициирующих свободнорадикальное окисление α-токофероксильных радикалов [Bowry, Ingold, 1995].

Таким образом, реакция АОС тканей шести органов песцов и лисиц на дополнительный витамин Е характеризовалась видо- и органоспецифичностью. Наибольшее количество изменений исследованных показателей было отмечено у песцов. Самым чувствительным компонентом системы антиоксидантной защиты организма, реагирующим на данное воздействие, оказался уровень восстановленного глутатиона.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ НШ–3731.2010.4.

Литература

Архипенко Ю. В., Джапаридзе Л. М., Гуткин Д. В. и др. Сравнительная оценка влияния недостаточности витамина Е на перекисное окисление липидов и транспорт Ca^{2+} в сердечной и скелетной мышцах // Вопр. мед. хим. 1987. № 1. С. 122–126.

Воевода Т. В., Устюжанинова Н. В. Морфо-функциональные особенности воздухоносной системы у эндемика Арктики – песца // Бюл. СО РАМН. 1997. № 2. С. 112–118.

Гомбоева А. Ц. Биохимия тканей: Уч. пособие для преподавателей и студентов. Чита, 2000. 33 с.

Зайчик А. Ш., Чурилов Л. П. Основы патохимии: Уч. для студентов медицинских ВУЗов. СПб: ЭЛБИ, 2001. 688 с.

Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньщикова Е. Б. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. М.: МАИК Наука/Интерпериодика, 2001. 343 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.

Коросов А. В., Горбач В. В. Компьютерная обработка биологических данных. Петрозаводск: изд-во ПетрГУ, 2007. 75 с.

Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К. и др. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М: Слово, 2006. 556 с.

Меньщикова Е. Б., Зенков Н. К., Ланкин В. З. и др. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА, 2008. 284 с.

Надиров Н. К. Токоферолы и их использование в медицине и сельском хозяйстве. М.: Наука, 1991. 336 с.

Паркалов И. В. Пушные звери в среде естественного обитания и перспектива клеточного звероводства в современных условиях. СПбИИ РАН: Нестор-История, 2006. 238 с.

Перельдик Н. Ш., Милованов Л. В., Ерин А. Т. Кормление пушных зверей. М.: Колос, 1981. 335 с.

Петрова Г. Г., Изотова С. П., Берестов В. А. Закономерности депонирования витаминов А, B_1 и B_2 в организме пушных зверей // Очерки по физиологии пушных зверей. Л.: Наука, 1987. С. 96–109.

Поздняков Е. В. Биологические особенности в обмене веществ у пушных зверей (сем. *Canidae*): автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1954. 23 с.

Ребров В. Г., Громова О. А. Витамины, макро- и микроэлементы. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 960 с.

Скурихин В. Н., Двинская Л. М. Определение α-токоферола и ретинола в плазме крови сельскохозяйственных животных методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии // С.-х. биология. 1989. № 4. С. 127–129.

Терруан Т. Взаимодействия витаминов. М., 1969. 372 с.

Asha Devia S., Prathimaa S., Subramanyam M. V. Dietary vitamin E and physical exercise: II. Antioxidant status and lipofuscin-like substances in aging rat heart // Exp. Gerontol. 2003. Vol. 38. P. 291–297.

Bears R. F., Sizer I. N. A spectral method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase // J. Biol. Chem. 1952. Vol. 195, N 1. P. 133–140.

Bowry V. W., *Ingold K. U.* Extraordinary kinetic behavior of the α-tocopheroxyl (vitamin E) radical // J. Org. Chem. 1995. Vol. 60. P. 5456–5467.

Brigelius-Flohe R., Kelly F. G., Salonen J. T. et al. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research // Am. J. Clin. Nutr. 2002. Vol. 76. P. 703–716.

Brown K. M., Morrice Ph. C., Duthie G. G. Erythrocyte vitamin E and plasma ascorbate concentrations in relation to erythrocyte peroxidation in smokers and nonsmokers: dose response to vitamin E // Am. J. Clin. Nutr. 1997. Vol. 65. P. 496–502.

Canids: foxes, wolves, jackals and dogs / Eds.: C. Sillero-Zubiri, M. Hoffmann, D. W. Macdonald. IUCN – The World Conservation Union, 2004. 430 p.

Coombes J. S., Powers S. K., Rowell B. et al. Effects of vitamin E and α-lipoic acid on skeletal muscle contractile properties // J. Appl. Physiol. 2001. Vol. 90. P. 1424–1430.

Herbert V. Introduction of the symposium: prooxidant effect of antioxidant vitamins // J. Nutr. 1996. Vol. 126. P. 1197–1200.

Herrera E., Barbas C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives // J. Physiol. Biochem. 2001. Vol. 57, N 1. P. 43–56.

Higashi N., Imai1 K., Sato M. et al. Intralobular Distribution of Vitamin A-Storing Lipid Droplets in Hepatic Stellate Cells with Special Reference to Polar Bear and Arctic Fox // Comp. Hepatol. 2004. N 3. P. 16–18.

Horwitt M. K. The promotion of vitamin E // J. Nutr. 1986. Vol. 116. P. 1371–1377.

Kayar S. R., Hoppeler H., Jones J. H. et al. Capillary blood transit time in muscles in relation to body size and aerobic capacity // J. Exp. Biol. 1994. Vol. 194. P. 69–81.

Klinger W., Karge E., Kretzschmar M. et al. Luminol-and lucigenin-amplified chemiluminescence with rat liver microsomes. Kinetics and influence of ascorbic acid, glutathione, dimethylsulfoxide, N-t-butyl-a-phenyl-nitrone, copper-ions and a copper complex, catalase, superoxide dismutase, hexobarbital and aniline // Exp. Toxicol. Pathol. 1996. Vol. 48, N 5. P. 447–460.

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, N 4. P. 705–707.

Kolleck I., Sinha P., Rüstow B. Vitamin E as an antioxidant of the lung mechanisms of vitamin E delivery to alveolar type II cells // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2002. Vol. 166. P. 62–66.

Kontush A., Finckh B., Karten B. et al. Antioxidant and prooxidant activity of α-tocopherol in human plasma and low density lipoprotein // Lipid Res. 1996. Vol. 37. P. 1436–1448.

Kushi L. H. Vitamin E and heart disease: a case study // Am. J. Clin. Nutr. 1999. Vol. 69 (suppl). P. 1322–1329.

Kusin J. A., Reddy V., Sivakumar B. Vitamin E supplements and the absorption of a massive dose of vitamin A // Am. J. Clin. Nutr. 1974. Vol. 27. P. 774–776.

Lee Ch.-Y. J., Wan J. M.-F. Vitamin E supplementation improves cell-mediated immunity and oxidative stress of Asian men and women // J. Nutr. 2000. Vol. 130. P. 2932–2937.

Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randan R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193, N 1. P. 265–275.

Meydani S. N., Meydani M., Rail L. C. et al. Assessment of the safety of high-dose, short-term supplementation with vitamin E in healthy older adults // Am. J. Clin. Nutr. 1994. Vol. 60. P. 704–709.

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, N 10. P. 3170–3175.

Napoli J. L., McCormick A. M., O`Meara B., Dratz E. A. Vitamin A metabolism: alpha-tocopherol modulates tissue retinol levels in vivo, and retinyl palmitate hydrolysis in vitro // Arch. Biochem. Biophys. 1984. Vol. 230, N 1. P. 194–202.

Palace V. P., Hill M. F., Farahmand F., Singal P. K. Mobilization of Antioxidant Vitamin Pools and Hemodynamic Function After Myocardial Infarction // Circulation. 1999. Vol. 99. P. 121–126.

Raila J., Buchholz I., Aupperle H. et al. The distribution of vitamin A and retinol-binding protein in the blood plasma, urine, liver and kidneys of carnivores // Vet. Res. 2000. Vol. 31. P. 541–551.

Ricciarelli R., Zingg J.-M., Azzi A. Vitamin E: protective role of a Janus molecule // FASEB J. 2001. Vol. 15. P. 2314–2325.

Rojas C., Cadenas S., Lypez-Torres M. et al. Increase in heart glutathione redox ratio and total antioxidant capacity and decrease in lipid peroxidation after vitamin E dietary supplementation in guinea pigs // Free Radic. Biol. Med. 1996. Vol. 21, N 7. P. 907–915.

Schweigert F. J., Uehlein-Harrell S., Zucker H. Effect of feeding on vitamin A concentrations in blood plasma of dogs // Zentralbl. Veterinarmed. A. 1990. Vol. 37, N 8. P. 605–609.

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.

Senoo H., Wake K., Wold H. L. et al. Decreased Capacity for Vitamin A Storage in Hepatic Stellate Cells for Arctic Animals // Comparative Hepatology. 2004. N 3(Suppl 1). P. 18.

Traber M. G., Ramakrishnan R., Kayden J. Human plasma vitamin E kinetics demonstrate rapid recycling of plasma RRR-α-tocopherol // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. Vol. 91. P. 10005–10008.

Wang X., Quinn P. J. Vitamin E and its function in membranes // Prog. Lipid Res. 1999. Vol. 38, N 4. P. 309–336.

Yang N. Y. J., Desai A. D. Effect of high levels of dietary vitamin E on liver and plasma lipids and fat soluble vitamins in rats // J. Nutr. 1977. Vol. 107. P. 1418–1426.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Баишникова Ирина Валерьевна
ведущий биолог
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: iravbai@mail.ru
тел. (8142) 573107

Baishnikova, Irina
Institute of Biology, Karelian Research Center,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: iravbai@mail.ru
tel. (8142) 573107

Сергина Светлана Николаевна
научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: cvetnick@yandex.ru
тел. (8142) 573107

Sergina, Svetlana
Institute of Biology, Karelian Research Center,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: cvetnick@yandex.ru
tel. (8142) 573107

Ильина Татьяна Николаевна
старший научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: ilyina@bio.krc.karelia.ru
тел. (8142) 573107

Ilyina, Tatyana
Institute of Biology, Karelian Research Center,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: ilyina@bio.krc.karelia.ru
tel. (8142) 573107

Тютюнник Николай Николаевич
главный научный сотрудник, д.с.-х.н., профессор
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: tyutyunnik@krc.karelia.ru
тел. (8142) 573107

Tyutyunnik, Nikolay
Institute of Biology, Karelian Research Center,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: tyutyunnik@krc.karelia.ru
tel. (8142) 573107

Илюха Виктор Александрович
зав. лаб. экологической физиологии животных, д.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: ilyukha@krc.karelia.ru
тел. (8142) 573107

Ilyukha, Victor
Institute of Biology, Karelian Research Center,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: ilyukha@krc.karelia.ru
tel. (8142) 573107

Труды Карельского научного центра РАН
№ 3. 2011. С. 12–15.

УДК 582.632:581.132:581.52

ИССЛЕДОВАНИЕ CO_2-ГАЗООБМЕНА ЛИСТЬЕВ БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ И КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ В УСЛОВИЯХ ЗАСУХИ 2010 г.

В. К. Болондинский, Л. М. Виликайнен

Институт леса Карельского научного центра РАН

В условиях продолжительной атмосферной засухи исследовался CO_2-газообмен саженцев березы повислой (*Betula pendula*) и карельской березы (*Betula pendula* var. *carelica*) при разной оводненности почвы. При достаточном количестве почвенной влаги у саженцев березы повислой и карельской березы обнаружены достоверные различия в CO_2-газообмене молодых и сформировавшихся листьев. В условиях водного стресса фотосинтез уменьшался в среднем в 12 раз у сформировавшихся листьев и в 7,5 раза у молодых. Статистически значимая разница в величинах дыхания как в нормальных условиях, так и при водном стрессе отсутствовала.

Ключевые слова: Betula L., карельская береза, CO_2-газообмен, водный стресс.

V. K. Bolondinskii, L. M. Vilikainen. INVESTIGATION OF CO_2 EXCHANGE IN LEAVES OF SILVER BIRCH AND KARELIAN BIRCH DURING DROUGHT IN 2010

In the conditions of prolonged atmospheric drought the CO_2 gas exchange of seedlings of silver birch (*Betula pendula*) and Karelian birch (*Betula pendula* var. *carelica*) was investigated at different soil water contents. When the amount of soil moisture was sufficient, reliable differences between the CO_2 gas exchange of young and mature leaves were found in seedlings of silver birch and Karelia birch. In the situation of water stress, photosynthesis dropped on average 12 times in mature leaves and 7.5 times in young leaves. No statistically significant differences were found in the respiration rates either under normal conditions or at water stress.

Key words: Betula L., Karelian birch, gaseous CO_2 exchange, water stress.

Введение

Показатели CO_2-газообмена листа традиционно используются для сравнительного анализа различных видов и разновидностей уже не одно десятилетие [Patton, Jones, 1989]. Считается, что величина максимальной скорости фотосинтеза генетически детерминирована [Заленский, 1977]. Обычно исследователи работают на зрелых, сформировавшихся листьях, и сравнительно мало работ на листопадных древесных, где газообмен изучался бы в ходе онтогенеза листа [Ceulemans, Impens, 1979]. У березы повислой максимальный фотосинтез зафиксирован на листьях, закончивших рост [Oleksyn et al., 2000], у ивы, тополя – при достижении листом 70–80 % от своего конечного размера [Reich, 1984; Кайбеяйнен, 2009]. Водный стресс приводит к снижению фотосинтеза из-за уменьшения устьичной проводимости, а также торможения оттока

сахаров из листьев [Лархер, 1978], однако неясно, как это проявляется у листьев разного возраста. Задачей настоящей работы было изучение влияния на CO_2-газообмен молодых и сформировавшихся листьев березы повислой и карельской березы атмосферной засухи при разной оводненности почвы.

Материалы и методы

Измерения CO_2-газообмена (*P*) с 30-кратной повторностью проводили на интактных молодых, достигших примерно 70 % своей конечной площади, и сформировавшихся листьях с помощью портативного газоанализатора LI 6200 (Li-Cor, USA). В начале засухи 2010 г. на территории агробиологической станции КарНЦ РАН 10 сосудов с 2-летними саженцами березы были помещены под прозрачный навес, и влажность почвы в них регулировалась поливом. Содержание влаги в сосудах контролировалось их частым взвешиванием. Температура листа и воздуха, фотосинтетически активная радиация (*ФАР*) и другие параметры измерялись датчиками Li-Cor. В ряде экспериментов оценивалась устьичная проводимость листа. Рассчитывались показатель использования ФАР при фотосинтезе – количество мкмоль CO_2/100 мкмоль фотонов (K_p) и коэффициент эффективности, или экономический коэффициент фотосинтеза (E_p), равный отношению брутто-фотосинтеза к темновому дыханию (*R*). $E_p (P+R)/R$ и характеризует максимально возможную эффективность газообмена [Лархер, 1978].

Результаты и обсуждение

С повышением температуры воздуха в начале июля до 27–28 °С при хорошей оводненности почвы у всех саженцев наблюдался интенсивный рост побегов и листьев. Несмотря на атмосферную засуху, продолжавшуюся более двух недель, были зафиксированы высокие значения CO_2-газообмена, превышающие показатели, полученные ранее при сходных почвенных условиях при умеренных температурах и дефиците водяных паров воздуха [Болондинский, 2010]. Даже при очень высоком для нашего региона дефиците водяных паров в воздухе (до 3,5 кПа) максимум фотосинтеза у 80 % саженцев наблюдался днем и полуденная депрессия фотосинтеза имела место в редких случаях. При этом, как показали более точные исследования, устьичная проводимость была максимальной в утренние часы и к полудню уменьшалась практически у всех деревьев [Болондинский и др., 2010].

При влажности почвы в сосудах, близкой к полевой влагоемкости, фотосинтез у сформировавшихся листьев карельской березы (*БК*) и березы повислой (*БП*) составлял 22 июля соответственно 16,97±2,46 и 15,17±3,16 мкмоль · $м^{-2} \cdot с^{-1}$, у молодых листьев – 10,90±1,87 и 11,00±2,46 мкмоль · $м^{-2} \cdot с^{-1}$; дыхание – 1,76±0,55 и 1,47±0,52, у молодых листьев – 2,22±0,51 и 2,14±0,60 мкмоль · $м^{-2} \cdot с^{-1}$ (табл. 1). Различия фотосинтеза молодых и сформировавшихся листьев были статистически значимы с 99 % вероятностью у *БК* и с 95 % вероятностью у *БП*; для дыхания они были незначимы у *БК* и с 90 % вероятностью имели место у *БП*, то есть можно отметить лишь тенденцию к повышению дыхания у молодых листьев по сравнению со зрелыми, что, очевидно, связано с их интенсивным ростом. В жаркую погоду (температура воздуха днем 28–32 °С, ночью – 20–24 °С) при достаточном количестве почвенной влаги у саженцев наблюдался очень быстрый рост листьев и побегов. Листья достигали 80–90 % от своей конечной площади за 5–6 дней. При этом содержание хлорофилла в них на грамм сырого веса составляло 60–70 % от показателей зрелых листьев. По всей вероятности, эти два фактора и являлись основной причиной пониженного фотосинтеза у молодых листьев.

Показатель использования *ФАР* при фотосинтезе (K_p) у сформировавшихся листьев *БК* и *БП* составлял соответственно 0,98±0,14 и 0,82±0,16, у молодых – 0,59±0,03 и 0,59±0,14 мкмоль CO_2/100 мкмоль фотонов; коэффициент эффективности фотосинтеза (E_p) у зрелых листьев – 11,28±3,16 и 12,35±4,42, у молодых – 5,99±0,69 и 6,54±2,42 (см. табл. 1). Различия этих параметров у молодых и сформировавшихся листьев как БК, так и БП были статистически значимы с 95 % вероятностью. Значимых различий между какими-либо параметрами *БК* и *БП* не обнаружено. Значения E_p молодых листьев, и особенно сформировавшихся, 22 июля были близки к максимальным за вегетацию величинам, что обусловлено не только высокими величинами CO_2-газообмена, но и сравнительно низким для такой жаркой погоды дыханием даже у растущих листьев. Оно очень близко к значениям, измеренным у зрелых листьев в дни с умеренной температурой воздуха при достаточном количестве влаги в почве. Максимум дыхания у листа площадью, составлявшей 20–25 % от максимальной, приближался к 6 мкмоль·$м^{-2} \cdot с^{-1}$. При этом температура воздуха не превышала 22 °С. Температурный оптимум CO_2-газообмена после 15-дневного периода с дневной температурой воздуха 26–28 °С был сдвинут в область высоких температур. Для сравнения, оптимальные температуры для фотосинтеза у березы в прохладный период августа – начала сентября составили 10–13 °С [Болондинский, 2010].

Таблица 1. Средние значения внешних факторов среды, фотосинтеза и дыхания листьев березы повислой и карельской березы при сильной атмосферной засухе и высоком содержании влаги в почве 22 июля 2010 г.

Параметры	S_l	ФАР	T	D	P	R	K_p	E_p
	см^2	мкмоль · м$^{-2}$ · с$^{-1}$	°С	кПа	мкмоль · м$^{-2}$ · с$^{-1}$			
	Карельская береза, сформировавшиеся листья							
M	20,6	1772	34,7	2,47	16,97	-1,76	0,98	11,28
σ	2,5	415	2,2	0,06	2,46	0,55	0,14	3,16
	Карельская береза, молодые листья							
M	12,0	1855	34,8	2,61	10,90	-2,22	0,59	5,99
σ	1,3	280	1,0	0,11	1,87	0,51	0,03	0,69
	Береза повислая, сформировавшиеся листья							
M	16,4	1860	34,0	2,57	15,17	-1,47	0,82	12,35
σ	2,8	410	1,6	0,13	3,16	0,52	0,16	4,42
	Береза повислая, молодые листья							
M	11,5	1860	33,7	2,49	11,00	-2,14	0,59	6,54
σ	1,7	297	1,27	0,13	2,46	0,60	0,14	2,42

Примечания. Здесь и в табл. 2: S_l – площадь листа в ассимиляционной камере, *T* – температура листа, *D* – дефицит водяного пара в камере, *P* – нетто-фотосинтез, *R* – темновое дыхание, K_p – показатель использования *ФАР* при фотосинтезе (мкмоль CO_2/100 мкмоль фотонов), E_p – коэффициент эффективности фотосинтеза, *M* – среднее значение, *σ* – стандартное отклонение.

Таблица 2. Средние значения внешних факторов среды, фотосинтеза и дыхания листьев березы повислой и карельской березы при сильной атмосферной засухе и низком содержании влаги в почве 29 июля 2010 г.

Параметры	S_l	ФАР	T	D	P	R	K_p	E_p
	см^2	мкмоль · м$^{-2}$ · с$^{-1}$	С	кПа	Мкмоль · м$^{-2}$ · с$^{-1}$			
	Карельская береза, сформировавшиеся листья							
M	19,3	957	34,7	2,4	1,39	-1,27	0,15	1,89
σ	6,2	467	1,2	0,4	1,52	0,68	0,28	0,88
	Карельская береза, молодые листья							
M	13,4	1180	36,1	2,7	1,83	-1,82	0,16	1,91
σ	2,6	485	2,1	0,9	2,21	0,30	0,19	0,95
	Береза повислая, сформировавшиеся листья							
M	16,6	1138	35,2	2,3	0,88	-1,20	0,08	1,59
σ	3,9	248	1,0	0,6	1,51	0,24	0,15	0,95
	Береза повислая, молодые листья							
M	12,1	1300	35,2	2,5	1,22	-1,61	0,09	1,78
σ	3,1	268	0,7	0,4	1,08	0,65	0,07	0,76

В условиях сильной атмосферной засухи саженцы в сосудах начинали испытывать водный дефицит уже на 3-й день после полива, что выражалось в уменьшении устьичной проводимости и, как следствие, снижении фотосинтеза. По мере уменьшения содержания влаги в сосудах устьичная проводимость снизилась к 29 июля примерно в 6,5 раза. У двух растений CO_2-газообмен в дневное время был отрицательным, то есть дыхание на свету превышало фотосинтез. При проведении экспериментов в самые жаркие дни засухи 2010 г. температура воздуха составляла 33 °С, а в ассимиляционной камере доходила за минуту измерения до 27–38 °С. Фотосинтез у зрелых и молодых листьев карельской березы составил соответственно 1,39±1,52 и 1,83±2,21 мкмоль·м$^{-2}$·с$^{-1}$, у березы повислой – 0,88±1,51 и 1,22±1,08 мкмоль·м$^{-2}$·с$^{-1}$ (табл. 2). Средние величины фотосинтеза сформировавшихся листьев уменьшились по сравнению с состоянием, когда саженцы не испытывали недостатка почвенной влаги, у *БК* и *БП* соответственно в 8,6 и 17,2 раза, молодых листьев – в 6 и 9 раз. Средние величины дыхания в почвенную засуху уменьшились у зрелых листьев *БК* и *БП* соответственно в 1,4 и 1,2 раза, молодых листьев – 1,2 и 1,3 раза. Большая вариабельность значений фотосинтеза в засуху вызвана значительными колебаниями содержания воды в сосудах. Там, где росли растения с меньшей площадью листьев, общее содержание воды оказывалось больше, так как в ходе суммарной транспирации испарялось меньшее количество воды. Хотя верхний слой почвы был практически сухим во всех сосудах, в глубине сосудов с меньшей площадью листьев еще оставалась какая-то доступная влага. Кроме того, проявлялись индивидуальные различия между растениями.

В связи с сильным падением фотосинтеза значительно изменились коэффициенты использования *ФАР* при фотосинтезе (K_p) и эффективности фотосинтеза (E_p). K_p у зрелых листьев *БК* и *БП* уменьшились соответственно в 6,5 и 10,3 раза, у молодых – в 3,7 и 6,6 раза. E_p у зрелых листьев *БК* и *БП* снизились соответственно в 6,1 и 7,8 раза, у молодых – в 3,1 и 3,7 раза. Подавление эффективности фотосинтеза в условиях почвенной засухи было более значительным у сформировавшихся листьев. Тенденция поддержать

углеродный баланс на приемлемом уровне проявлялась прежде всего у молодых листьев.

Как у молодых, так и у зрелых листьев *БК* фотосинтез снижался в меньшей степени, чем у *БП*. Это связано с более сильной устьичной регуляцией у *БП*, которая оперативно реагирует на увеличивающийся водный стресс. Устьица у *БК* дольше остаются приоткрытыми, что дает некоторый выигрыш в поглощении CO_2, но небезопасно при критической потере влаги. Дальнейшая усушка сосудов привела к практически полному прекращению фотосинтеза у *БК*, крайне невыгодному с точки зрения углеродного и водного баланса состоянию, и, как результат, к пожелтению примерно 20–30 % зрелых листьев. Растения же *БП* еще какое-то время сохраняли очень низкий, но положительный баланс и поддерживали соотношение поглощаемой углекислоты и потери влаги на приемлемом уровне. После обильного полива фотосинтез у всех растений довольно быстро восстанавливался практически до нормального уровня.

В отличие от дня с хорошей оводненностью почвы, при сильной почвенной засухе не обнаружено статистически достоверных различий в параметрах сформировавшихся и молодых листьев. Статистически значимые отличия для двух сравниваемых дней получены для P, K_p и E_p в каждой группе листьев. Какие-либо достоверные различия отсутствовали для дыхания, а также при сравнении параметров у *БК* и *БП*.

Выводы

Таким образом, в условиях атмосферной засухи и высокой температуры воздуха при достаточном количестве почвенной влаги у саженцев *БП* и *БК* обнаружены достоверные различия в CO_2-газообмене молодых и сформировавшихся листьев. В условиях водного стресса фотосинтез уменьшался в среднем в 12 раз у сформировавшихся листьев и в 7,5 раза у молодых. Хотя у молодых листьев поглощение углекислоты снижалось в меньшей степени, чем у сформировавшихся, различия в фотосинтезе нивелировались из-за большой вариабельности показаний. Статистически значимой разницы в величинах дыхания как в нормальных условиях, так и при водном стрессе выявить не удалось. Обнаружена тенденция большего поглощения углекислоты карельской березой по сравнению с березой повислой при недостатке почвенной влаги.

Литература

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

Болондинский В. К., Придача В.Б., Позднякова С. В., Виликайнен Л. М. Исследование газообмена у листьев карельской березы и березы повислой в аномально жаркое лето 2010 г. // Растение и стресс: тез. докл. Всерос. симпозиума. М., 2010. С. 66–67.

Заленский О. В. Эколого-физиологические аспекты изучения фотосинтеза. 37-е Тимирязевское чтение. Л.: Наука, 1977. 57 с.

Кайбеяйнен Э. Л. Параметры световой кривой фотосинтеза у *Salix dasyclados* и их изменение в ходе вегетации // Физиол. раст. 2009. Т. 56, № 4. С. 490–499.

Лархер В. Экология растений. М.: Мир, 1978. 382 с.

Ceulemans R., Impens I. Study of CO_2 Exchange Processes, Resistances to Carbon Dioxide and Chlorophyll Content during Leaf Ontogenesis in Poplar // Biol. Plant. 1979. Vol. 21. P. 302–306.

Oleksyn J., Zytkowiak R., Reich P. B. et al. Ontogenetic Patterns of Leaf CO_2 Exchange, Morphology and Chemistry in *Betula pendula* Trees // Trees. 2000. Vol. 14. P. 271–281.

Patton L., Jones M. B. Some Relationships between Leaf Anatomy and Photosynthetic Characteristics of Willows // New Phytol. 1989. Vol. 111. P. 657–661.

Reich P. B. Relationships between Leaf Age, Irradiance, Leaf Conductance, CO_2 Exchange, and Water Use Efficiency in Hybrid Poplar // Photosynthetica. 1984. Vol. 17. P. 445–453.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Болондинский Виктор Константинович
научный сотрудник, к.б.н.
ИЛ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: bolond@krc.karelia.ru
тел. (8142) 768160

Виликайнен Людмила Матвеевна
физик
ИЛ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: bolond@krc.karelia.ru
тел. (8142) 768160

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

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

Труды Карельского научного центра РАН
№ 3. 2011. С. 16–20.

УДК 597.2/.5:577.151.04:574.24

ВЛИЯНИЕ МИНЕРАЛИЗАЦИИ НА АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОН S-ТРАНСФЕРАЗЫ У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ПРЕСНОВОДНЫХ РЫБ СЕВЕРНЫХ ВОДОЕМОВ

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

Институт биологии Карельского научного центра РАН

В статье приводятся данные сравнительного анализа активности глутатион S-трансферазы (GST), фермента второй фазы биотрансформации ксенобиотиков, в печени, мышцах, почках и жабрах щук (*Esox lucius* L.), сигов (*Coregonus lavaretus* L.) и плотвы (*Rutilus rutilus* L.), выловленных из чистого водоема и водоема, загрязненного отходами железорудного производства. Исследованы видовая специфика активности фермента, а также зависимость показателей активности от возраста изучаемых рыб. Результаты свидетельствуют о чувствительности GST к минеральному загрязнению и указывают на активацию механизмов биохимической адаптации гидробионтов под воздействием неблагоприятных факторов внешней среды.

Ключевые слова: глутатион S-трансфераза, рыбы, минеральное загрязнение, экологический мониторинг.

E. V. Borvinskaya, L. P. Smirnov, I. V. Sukhovskaya, N. N. Nemova. GLUTATHIONE S-TRANSFERASE IN SOME NORTHERN FRESHWATER FISHES: THE EFFECT OF WATER MINERALIZATION

The comparative studies of glutathione S-transferase (GST) activity were performed on liver, muscles, kidneys and gills of pike (*Esox lucius* L.), whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) and roach (*Rutilus rutilus* L.) from a reference lake and the polluted mining factory lake. Species and age variability was also investigated. GST activity was found to be altered in the polluted area compared with the reference lake. We supposed that the altered GST activity is probably a metabolic adaptation of fish tissues to primarily mineral contamination.

Key words: glutathione S-transferase, fish, water mineralization, ecological monitoring.

Введение

На водоем обычно действует целый комплекс экологических факторов, поэтому натурные исследования воздействий различного рода часто более объективны, чем модельные [Pandey et al., 2008; Fernandes et al., 2008]. Рыбы, как известно, являются удобными объектами при исследовании влияния различных ксенобиотиков, в том числе токсических, на живой организм [Кашулин и др., 1999; Немова, Высоцкая, 2004; Немова, 2005]. Они аккумулируют неблагоприятные эффекты комплекса различных воздействий, имеют сравнительно большие размеры и продолжительность жизни, обладают повышенной устойчивостью к ксенобиотикам, поэтому могут быть использованы для

прогноза различного рода воздействий на водные экосистемы.

Способность рыб к выживанию в изменяющихся условиях среды во многом зависит от диапазона адаптивных возможностей комплекса защитных систем организма, в том числе двухфазной системы биотрансформации ксенобиотиков. Функционирование этой системы осуществляется через каскадное взаимодействие набора ферментов, участвующих в обезвреживании токсических веществ, одним из которых является глутатион S-трансфераза (GST). Модифицирующее действие на активность GST многих чужеродных соединений техногенного происхождения, таких как полиароматические углеводороды, хлорированные бифенилы, тяжелые металлы и др., делают перспективным применение этого фермента в качестве биомаркера антропогенного воздействия на биоту [Blanchette et al., 2007; Левина и др., 2007; Борвинская и др., 2009]. В литературе практически отсутствуют данные о влиянии изменения минерального состава среды на активность GST. Кроме того, очень мало работ связано с изучением особенностей функционирования этого фермента у рыб, являющихся обитателями пресноводных экосистем Субарктики.

Задача настоящего исследования – изучение активности GST у пресноводных рыб, выловленных из водоемов с разным уровнем минерализации.

Материал и методы

В работе использованы три вида пресноводных рыб: щука (*Esox lucius* L.), сиг (*Coregonus lavaretus* L.) и плотва (*Rutilus rutilus* L.).

Материал собирали в июне 2009 и 2010 г. в озерах, расположенных на севере Республики Карелия. Оз. Костомукшское (64°61′ с.ш., 30°47′ в.д.) используется Костомукшским горнообогатительным комбинатом для сброса промывных вод и захоронения пылеобразных фракций пустой породы (хвостов обогащения). В настоящее время вода в озере отличается аномально высокой минерализацией (до 646 мг/л), в основном за счет ионов K^+, Na^+, Ca^{2+}, SO_4^{2-}, HCO^{3-}, а также большим количеством мелкодисперсной минеральной взвеси (1,34 мг/л) [Состояние водных объектов.., 2007; Ильмаст и др., 2010]. Размерно-весовые характеристики (АС, вес) пойманных в этом озере рыб: щука 31,5–50 см, 264–923 г; сиг 22–32,5 см, 101–770 г; плотва (АД, вес) 13–17,5 см, 50–71 г. Возраст рыб составлял 3–8 лет для щуки, 4–12 лет для сига и 5–8 лет для плотвы. В 2010 г. в хвостохранилище отловлены рыбы со следующими характеристиками без разделения по полу: щука 38,2–47,5 см, 437–1374 г; сиг 18,5–23,2 см, 62–112 г; плотва 13,3–14,5 см 42–50 г. Возраст рыб составлял 3–5 лет.

В качестве контроля использовали рыбу, выловленную в тот же период из чистого оз. Каменное (64°28′ с.ш., 30°13′ в.д.), которое расположено на территории Костомукшского государственного заповедника и считается эталонным водоемом таежной зоны. Общая минерализация воды в озере составляет около 11 мг ионов на литр [Состояние водных объектов.., 2007]. Размерно-весовые характеристики рыб из улова 2009 г.: щука 46–78 см, 815–3000 г; сиг 19–31 см, 51–292 г; плотва 15,8–24,6 см, 61–284 г. Возраст рыб составлял 5–9 лет для щуки, 2–6 лет для сига и 5–11 лет для плотвы. В 2010 г. отловлены щука 47,6–56,2 см, 834–1374 г; сиг 18,8–23,8 см, 60–115 г; плотва 14,1–15,7 см, 52–63 г. Возраст 3–5 лет.

Активность GST определяли в печени, мышцах, почках и жабрах рыб. Органы извлекали сразу после вылова и хранили до анализа в жидком азоте. Образцы ткани измельчали с помощью гомогенизатора Поттера-Эльвейэма в 0,125 М калий-фосфатном буферном растворе (pH 6,5), взятом в соотношении 1:10 – 1:900 в зависимости от типа ткани. Гомогенат центрифугировали при 110000g в течение часа при 4°С на ультрацентрифуге Optima 80L (Beckman, USA). Активность фермента регистрировали в надосадочной жидкости по возрастанию оптической плотности (D_{340}) продукта конъюгации 1-хлоро-2,4-динитробензола (CDNB) с восстановленным глутатионом (GSH) [Habig et al., 1974]. Концентрацию белка в супернатанте оценивали по поглощению при 205 нм [Noble and Bailey, 2009; Суховская и др., 2010], используя бычий сывороточный альбумин и восстановленный глутатион в качестве стандартов при построении калибровочного графика. Относительную активность GST рассчитывали по количеству µмоль CDNB, превращенного ферментом за 1 мин в пересчете на мг белка в цитозоле.

Статистическая обработка данных велась с применением многофакторного дисперсионного анализа (MANOVA) и рангового коэффициента корреляции Спирмена. Порог доверительной вероятности при оценке достоверности различий принят равным 0,95. Данные представлены в таблицах в виде медиан значений.

Результаты и обсуждение

Анализ результатов за 2009 г. показал, что исследованные виды рыб по-разному реагируют на изменение минерального состава среды (табл. 1). Так, у плотвы, выловленной из оз. Костомукшское, не было выявлено статистически значимых изменений в активности GST, хо-

тя в жабрах и почках наблюдалась тенденция к снижению активности фермента по сравнению с рыбами из контрольного водоема. У сигов различия между вариантами выявлены только в почках (активность GST у опытных рыб ниже в 2,4 раза), но при заданном $p \leq 0,05$ они также статистически не значимы.

Между щуками из опытного и контрольного водоемов статистически достоверные отличия по исследованному показателю выявлены в жабрах и почках. У щук из сильноминерализованного оз. Костомукшское активность GST была в 1,8 раза (жабры) и 4,9 раза (почки) выше, чем у рыб из контрольного озера.

В мышцах всех исследованных видов рыб различия между вариантами эксперимента были несущественными либо отсутствовали.

Так как использованная в экспериментах рыба имела большой возрастной диапазон, был проведен корреляционный анализ, который показал наличие положительной зависимости между возрастом и активностью GST в мышцах щук, выловленных в 2009–2010 гг. из оз. Костомукшское (rs =0,71) и в 2009 г. из оз. Каменное (rs =0,65). В жабрах щук из оз. Каменное в 2009 г. корреляция была отрицательной (rs = –0,52), а в жабрах сигов из уловов 2009 г. в оз. Костомукшское выявлена сильная положительная зависимость (rs =0,78). В отличие от полученных нами результатов, другие исследователи [Larose et al., 2008; Ирейкина, 2008] не выявили зависимости между активностью GST и возрастом у таких рыб, как окунь, ряпушка и камбала.

Из уловов 2010 г. для анализа была отобрана рыба с небольшими различиями по длине, весу и возрасту. В ряде тканей активность GST у рыб в 2010 г. была выше по сравнению с 2009 г., например, в почках плотвы независимо от места вылова (в 3–11 раз) и жабрах плотвы из оз. Каменное (в 4 раза) (табл. 2). Если в 2009 г. у рыб, отловленных в оз. Костомукшское, активность фермента в жабрах и почках была ниже, а в печени выше, чем в контроле, то в 2010 г. вектор изменений показателей активности был противоположным. Тем не менее анализ активности GST в тканях плотвы, выловленных из водоема с высоким уровнем минерализации в 2010 г., так же как и в 2009 г., не выявил каких-либо существенных различий по сравнению с рыбами из контрольного водоема.

Более высокая активность GST в мышцах и почках рыб из уловов 2010 г. по сравнению с предыдущим годом обнаружена также у сига и щуки. Причина этого явления пока неясна. Вероятно, этот феномен может быть связан с влиянием на рыбу комплекса внешних факторов – климатических условий, гидрологического и гидрохимического режимов, существовавших в том или ином году в период сбора материала.

В экспериментах 2010 г. были использованы сиги, имевшие близкие размерно-весовые характеристики и возраст. Активность GST в жабрах, мышцах и почках имела сходные значения и только в печени рыб она была достоверно ниже у сигов из опытного водоема по сравнению с контролем.

Статистически значимое повышение активности фермента в жабрах и почках щук из опытного водоема, пойманных в 2009 г., сохранялось у рыб из уловов 2010 г. Полученные данные можно объяснить, на наш взгляд, участием GST в поддержании интенсивного метаболизма в этих тканях. В условиях минерального загрязнения (в 60 раз превышающего контроль) на жабры и почки ложится большая нагрузка по поддержанию солевого баланса в организме. Усиленный режим работы этих органов может быть причиной нако-

Таблица 1. Активность GST (μM CDNB/мин/мг белка) в тканях рыб из озер с разным уровнем минерализации (вылов 2009 г.)

Орган, ткань	Плотва		Сиг		Щука	
	оз. Костомукшское	оз. Каменное	оз. Костомукшское	оз. Каменное	оз. Костомукшское	оз. Каменное
Жабры	16,03	29,71	9,41	8,94	834,00*	465,95
Мышцы	8,22	8,50	10,37	7,78	7,37	6,35
Печень	98,07	71,88	108,23	92,75	699,88	704,62
Почки	3,79	13,55	18,22	42,48	31,96*	6,59

* Здесь и в табл. 2 различия между вариантами эксперимента статистически значимы при $p \leq 0,05$.

Таблица 2. Активность GST (μM CDNB/мин/мг белка) в тканях рыб из озер с разным уровнем минерализации (вылов 2010 г.)

Органы, ткань	Плотва		Сиг		Щука	
	оз. Костомукшское	оз. Каменное	оз. Костомукшское	оз. Каменное	оз. Костомукшское	оз. Каменное
Жабры	68,97	50,94	10,49	11,10	623,97*	366,58
Мышцы	4,95	4,53	16,91	15,11	48,84	11,3
Печень	70,92	84,4	91,07*	103,69	938,82	830,52
Почки	41,56	38,73	48,46	44,59	45,68*	18,16

пления эндогенных токсинов, в том числе продуктов окислительного стресса, что в свою очередь является причиной активации ферментов системы детоксикации. Щука, являясь эвритопным видом, встречается в водоемах, существенно различающихся по минеральному составу, и приспособилась к обитанию в слабоэвтрофицированных озерах Карелии с очень низким уровнем минерализации, которые формировались по мере отступления ледника. Тем не менее у этой рыбы сохранились механизмы поддержания гомеостаза в условиях повышенной минерализации, несмотря на то что щука заселила озера Карелии тысячи лет назад после завершения ледникового периода.

Обращает на себя внимание то, что активность GST у данного вида рыб в жабрах и печени в целом отличалась очень высокими значениями. Из табл. 1–2 видно, что в печени и жабрах щуки, облигатного хищника, она была существенно выше (в 10–92 раз), чем в тканях плотвы и сига, для которых характерно смешанное питание. Так как щука является конечным хищником в субарктических пресных водоемах, у нее могли эволюционно выработаться механизмы усиленной защиты от накопления токсикантов в пищевой пирамиде, что подтверждается данными других исследований по влиянию пищевой ориентации трофического уровня на активность ферментов детоксикации [Solé et al., 2009].

Из трех видов рыб, обитающих в оз. Костомукшское, плотва демонстрирует наиболее слабый ответ GST на внешнее воздействие. Это может указывать на низкий адаптационный потенциал детоксикационной системы этих рыб, что обусловливает большую чувствительность к антропогенному загрязнению. Нарушенное соотношение полов в популяции плотвы из оз. Костомукшское, где в уловах доминируют самки (90%) [Такшеев, 2005; Ильмаст и др., 2010], свидетельствует в пользу слабой устойчивости данного вида к негативным факторам, так как самцы, как правило, менее резистентны и начинают элиминироваться из водоемов, испытывающих значительную техногенную нагрузку [Лукин и др., 1984].

Хотя в тканях сига наблюдали изменение активности GST под влиянием техногенных вод, тем не менее различия были достоверны только в печени рыб, а тренд изменений отличался по годам. В свою очередь в почках и жабрах щуки различия между вариантами эксперимента были статистически значимы и имели межгодовую повторяемость, это позволяет сделать вывод о том, что активность GST в этих органах щуки может быть использована как один из маркеров реакции рыб северных водоемов на изменение минерального состава водной среды. Следует отметить, что некоторые исследователи считают нецелесообразным применение GST как биомаркера загрязнения водной среды, так как в 77% лабораторных и полевых исследований не было зафиксировано однозначного ответа этого фермента на воздействие [Van der Oost et al., 2003]. При этом в подавляющем большинстве случаев изучалась активность GST только в печени рыб, тогда как другие органы оставались без внимания исследователей. Наши данные показывают, что изучение тканеспецифических особенностей функционирования молекулярных биомаркеров позволяет расширить список видов-индикаторов, которые могут быть использованы в экологическом мониторинге того или иного региона.

Таким образом, было выявлено влияние высокого уровня минерального загрязнения на активность GST у рыб. Изменение активности фермента, участвующего в детоксикации широкого ряда липофильных органических токсикантов, может указывать на неспецифическую реакцию организма в ответ на стресс, вызванный изменением ионного состава среды. Использование живыми системами неспецифических реакций в адаптациях к тем или иным факторам является благоприобретенной эволюционной особенностью, которая способствует минимизации метаболических трат при развитии защитных механизмов и повышает адаптивные возможности организмов.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что активность GST может быть использована в качестве дополнительного биохимического маркера при оценке состояния рыб – обитателей северных водоемов с повышенной степенью минерализации.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ «Ведущие научные школы Российской Федерации» НШ 3731.2010.4; программы ОБН РАН «Биологические ресурсы России: оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга» на 2009–2011 гг.; Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биологическое разнообразие» на 2009–2011 гг.

Литература

Борвинская Е. В., Смирнов Л. П., Немова Н. Н. Глутатион S-трансферазы рыб – потенциальные эколого-биохимические индикаторы антропогенного воздействия на водную среду // Труды Карельского научного центра РАН. 2009. № 3. С. 8–20.

Ильмаст Н. В., Стерлигова О. П., Такшеев С. А., Кучко Я. А. Плотва (*Rutilus rutilus*) Костомукшского хвостохранилища /// Проблемы изучения и сохранения позвоночных животных антропогенных водоемов: матлы Всерос. науч. конф. с междунар. участием. Саранск, 2010. С. 67–70.

Ирейкина С. А. Молекулярные биомаркеры антиоксидантной системы и биотрансформации загрязняющих веществ у рыб и моллюсков из импактных районов залива Петра Великого (Японское море): автореф… канд. биол. наук. Владивосток, 2008. 20 с.

Кашулин Н. А., Лукин А. А., Амудсен П. А. Рыбы пресных вод субарктики как биоиндикаторы техногенного загрязнения. Апатиты: Кольский научный центр РАН, 1999. 142 с.

Левина И. Л., Москвичев Д. В., Зинчук О. А. Экологические аспекты токсичности азоловых пестицидов для гидробионтов. Ростов-на-Дону, 2007. 180 с.

Лукин А. А., Моисеенко Т. И., Кашулин Н. А. Мониторинг природной среды Кольского Севера. Апатиты: Кольский филиал АН СССР, 1984. С. 58–63.

Немова Н. Н. Биохимические эффекты накопления ртути у рыб. М.: Наука, 2005. 164 с.

Немова Н. Н., Высоцкая Р. У. Биохимическая индикация состояния рыб. М.: Наука, 2004. 215 с.

Состояние водных объектов Республики Карелия. По результатам мониторинга 1998–2006 гг. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 2007. 210 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 Карельского научного центра РАН. 2010. № 2. С. 68–71.

Такшеев С. А. Состояние рыбной части сообщества Костомукшского хвостохранилища и его оценка биохимическими методами: дис… канд. биол. наук. Петрозаводск, 2005. 122 с.

Blanchette B., Feng X., Singh B. R. Marine Glutathione S-Transferases // Mar. Biotechnol. 2007. Vol. 9, N 5. P. 513–542.

Fernandes C., Fontannhas-Fernandes A., Ferreira M., Salgado M.A. Oxidative stress response in gill and liver of Liza saliens, from the Esmoriz-Paramos Coastal Lagoon, Portugal // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2008. Vol. 55. P. 262–269.

Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. Glutathione S-Transferases.The first enzymatic step in mercapturic acid formation // J. Biol.Chem. 1974. Vol. 249, N 22. P. 7130–7139.

Larose C., Canuel R., Lucotte M., Di Giulio R.T. Toxicological effects of methylmercury on walleye (*Sander vitreus*) and perch (*Perca flavescens*) from lakes of the boreal forest // Comp. Biochem. Physiol. 2008. Vol. 147. Part C. P. 139–149.

Noble J. E. and Bailey M.J. A. Quantitation of Protein // Methods Enzymol. 2009. Vol. 463. P. 73–95.

Pandey S., Parvez S., Ansari R.A. et al. Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata Bloch* // Chem. Biol. Interact. 2008. Vol. 174, N 3. P. 183–192.

Solé M., Rodríguez S., Papiol V. et al. Xenobiotic metabolism markers in marine fish with different trophic strategies and their relationship to ecological variables // Comp. Biochem. and Physiol. 2009. Vol. 149. Part C. P. 83–89.

Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen P.E. Fish Bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review // Environ. Toxicol. Pharmacol. 2003. Vol. 13. P. 57–149.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Борвинская Екатерина Витальевна
стажер-исследователь
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: katsu@inbox.ru
тел. (8142) 571879

Смирнов Лев Павлович
ведущий научный сотрудник, д.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: leo@bio.krc.karelia.ru
тел. (8142) 571879

Суховская Ирина Викторовна
научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: suhovska@krc.karelia.ru
тел. (8142) 571879

Немова Нина Николаевна
директор ИБ КарНЦ РАН, зав. лаб. экологической физиологии растений, д.б.н., проф., чл.-корр. РАН
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: nemova@krc.karelia.ru
тел. (8142) 783615

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

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

Suhovskaya, Irina
Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: suhovska@krc.karelia.ru
tel. (8142) 571879

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

Труды Карельского научного центра РАН
№ 3. 2011. С. 21–27.

УДК 597.552.511:(591.5+575.21)

РЕОРЕАКЦИЯ И ФОРМИРОВАНИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ГРУПП СЕГОЛЕТОК АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ (*SALMO SALAR* L.)

А. Е. Веселов[1], Д. С. Павлов[2], М. А. Скоробогатов[2], Д. А. Ефремов[1], К. Ю. Потапов[3]

[1] *Институт биологии Карельского научного центра РАН*
[2] *Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН*
[3] *Петрозаводский государственный университет*

Экспериментально исследовали локомоторные показатели реореакции сеголеток атлантического лосося двух фенотипических групп, образовавшихся после расселения из близко расположенных нерестовых гнезд. Показано, что заселение микробиотопов, имеющих различные гидрологические характеристики, определяется реореакцией мальков. Часть из них проявляла повышенную способность сопротивляться потоку и заселяла микробиотопы с высокими скоростями течения. В дальнейшем это должно отразиться на формировании возрастных групп по срокам обитания в реке (от 2 до 4 лет) и на наступлении смолтификации.

Ключевые слова: молодь атлантического лосося, фенотипические группы, реореакция, локомоторные компоненты.

A. E. Veselov, D. S. Pavlov, M. A. Skorobogatov, D. A. Efremov, K. Yu. Potapov. RHEOTACTIC RESPONSES AND PHENOTYPIC AGGREGATION OF JUVENILE ATLANTIC SALMON *SALMO SALAR*

Movement parameters of the rheotactic response of juvenile Atlantic salmon from two phenotypic aggregations which had formed after the dispersal of fry from closely situated spawning redds were tested under experimental conditions. It was showed that occupation of micro habitats with different hydrological parameters depends on by the rheotactic response of the fry. Part of them demonstrated higher ability to resist water currents and occupied sites with high current velocities. Obviously, it may eventually affect the rate of accumulation of phenotypic differences, formation of age groups differing in the duration of stay in the river (2 to 4 years), as well as early or late onset of smoltification.

Key words: juvenile Atlantic salmon, phenotypic aggregation, rheotactic responses.

Введение

Данные подводных наблюдений 2005–2007 гг. показали, что в прибрежной части порога Ареньгский основного русла р. Варзуги и в устье впадающего в него притока Ареньга ежегодно к IV декаде июня образуются скопления ранних сеголеток лосося. Происходит это в результате их расселения из нерестовых гнезд центральной части порога [Pavlov et al., 2010]. По возникшим в течение летнего периода различиям в размерно-весовых и биохимических показателях (энергетического обмена и липидного статуса) было доказано формирование из

этих скоплений устойчивых фенотипических групп [Павлов и др., 2007а,б, 2008].

Известно, что основной врожденной поведенческой реакцией рыб, обитающих в потоке, является реореакция, она компенсирует снос рыб против течения и способствует их удержанию в районе обитания [Павлов, 1979]. В онтогенезе молоди рыб существенные изменения показателей происходят на первых этапах развития, так как интенсивно меняется морфология тела, развиваются локомоторные органы, органы чувств и плавательная способность [Васнецов, 1953; Алеев, 1963; Павлов, 1979, 1986]. Для реореакции это сопровождается снижением пороговых и увеличением критических скоростей течения. Реореакция может служить мерой отношения к потоку и быть ключом к раскрытию адаптивных механизмов, реализуемых в поведении рыб. Она влияет на закономерности пространственного расселения рыб и соответственно на возникновение фенотипических групп сеголеток лосося.

В связи с этим задача работы заключалась в изучении роли реореакции при расселении сеголеток лосося из нерестовых гнезд и формировании фенотипических групп.

Материалы и методы

Наблюдения за расселением сеголеток из нерестовых гнезд и образованием прибрежных и устьевых групп проводили в 2005–2007 гг. с помощью подводного метода, позволяющего получить достоверные данные [Keenleyside, 1962; Wankowski, Thorpe, 1979; Павлов и др., 1981]. Используя аппарат электролова (Fa-2, Норвегия), сеголеток (0+) собирали с площадей микробиотопов в прибрежной части порога главного русла р. Варзуги и в устье притока Ареньга (66°32′43′′ с.ш., 36°12′06′′ в.д.). Мальков (в каждой пробе 30 экз.) отлавливали с момента образования устойчивых групп в последней декаде июня и повторно в первую декаду августа, выдерживая в русловых садках в течение суток до начала эксперимента.

Исследовали локомоторную компоненту реореакции сеголеток лосося. Эксперименты проводили в специально сконструированной гидродинамической установке (рис. 1). Экспериментальная камера представляет собой стеклянную трубку диаметром 20 мм и длиной 1 м, в головной части которой находятся успокоители потока. Скорость течения внутри рабочей камеры изменяли в пределах 0–0,8 м/с при помощи двух кранов, установленных перед трубкой. В рабочую камеру, предварительно наполненную водой, через разъем сливного патрубка пересаживали по одному мальку из исследуемой фенотипической группы.

У каждого малька измеряли три показателя реореакции с трехразовой повторностью. Пороговая скорость течения ($V_{пор.}$) для реореакции регистрировалась при медленном (30–40 с) увеличении скорости течения от нулевого значения до момента, когда малек начинал проявлять двигательную реакцию в виде нистагма глаз, изгиба плавников или хвостовой части тела. Показатель $V_{акт.}$ характеризовал достижение (за 15–20 с) такой скорости течения, при которой ориентированный против течения малек, находясь в тактильном контакте с дном, переставал удерживаться только за счет прижимного давления потока на плавники и включал активную локомоцию. Критическая скорость ($V_{крит.}$) течения (выставлялась за 10 с) отмечалась при прекращении мальком сопротивления наибольшей скорости течения и сбросе его на защитную сетку. После эксперимента мальков взвешивали и измеряли длину.

Скорость течения в экспериментальной камере находили, измеряя объем воды (W) в мерном сосуде и время (t) его наполнения из сливного патрубка. Объем воды в мерном сосуде в опытах изменялся в пределах от 50 до 1000 см^3.

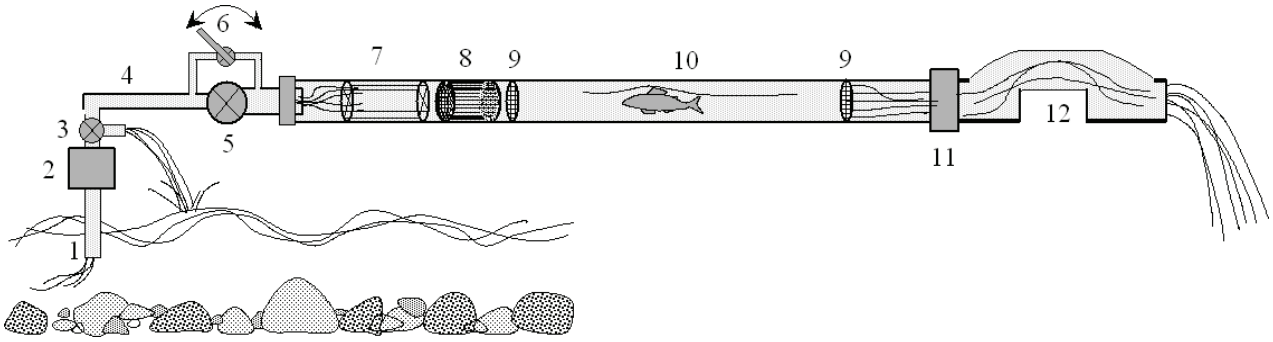


Рис. 1. Схема гидродинамической установки

1 – всасывающий патрубок, 2 – электронасос, 3 – водосбросной кран, 4 – шланг водоподачи, 5 – вентильный кран (сильный поток), 6 – шаровый кран (слабый поток), 7, 8 – успокоители потока, 9 – защитная сетка, 10 – экспериментальная камера, 11 – разъем для посадки рыбы, 12 – колено для поддержания уровня воды при отсутствии течения

По этим величинам рассчитывали расход воды в трубе Q = W/t, а затем вычисляли среднюю скорость течения – V = Q/S, где S – площадь поперечного сечения трубы, S = 3,14 см^2.

Результаты и обсуждение

Образование фенотипических групп сеголеток лосося. Нерестовые гнезда атлантического лосося с вылупившимися эмбрионами располагались в центральной части главного русла р. Варзуги. С помощью подводных наблюдений установлено, что в течение 2–3 суток при подъеме температуры воды от 9 до 12–13°С личинки (обычно к 12–16 июня) появляются в поверхностном слое галечного грунта (рис. 2 а). В области расположения нерестовых гнезд плотность личинок достигала 13–17 экз./м^2. Затем в течение пяти суток происходило их массовое активно-пассивное расселение, в основном по направлению речного потока. В этот период личинки полностью переключались на экзогенное питание, у них закладывался чешуйный покров и завершался переход на стадию малька. Плотность распределения в шлейфе расселения снижалась до 3, реже 7 экз./м^2 (рис. 2 б). На седьмые сутки мальков обнаруживали на границе порога с плесом, одновременно прекращалось их расселение по течению (рис. 2 в). Плотность распределения колебалась в тех же пределах, однако на восьмой-девятый день преобладающим становилось активное, против потока перераспределение из случайно заселенных микробиотопов вдоль границы порога к прибрежным участкам главного русла или в устье притока Ареньга (рис. 2 г, д). Здесь, в прибрежье и устье ежегодно образовывались фенотипические группы (рис. 2 е), из которых мальков отлавливали для эксперимента (участки I и II). Плотность распределения в этих группах к концу июня составляла 2–12 экз./м^2.

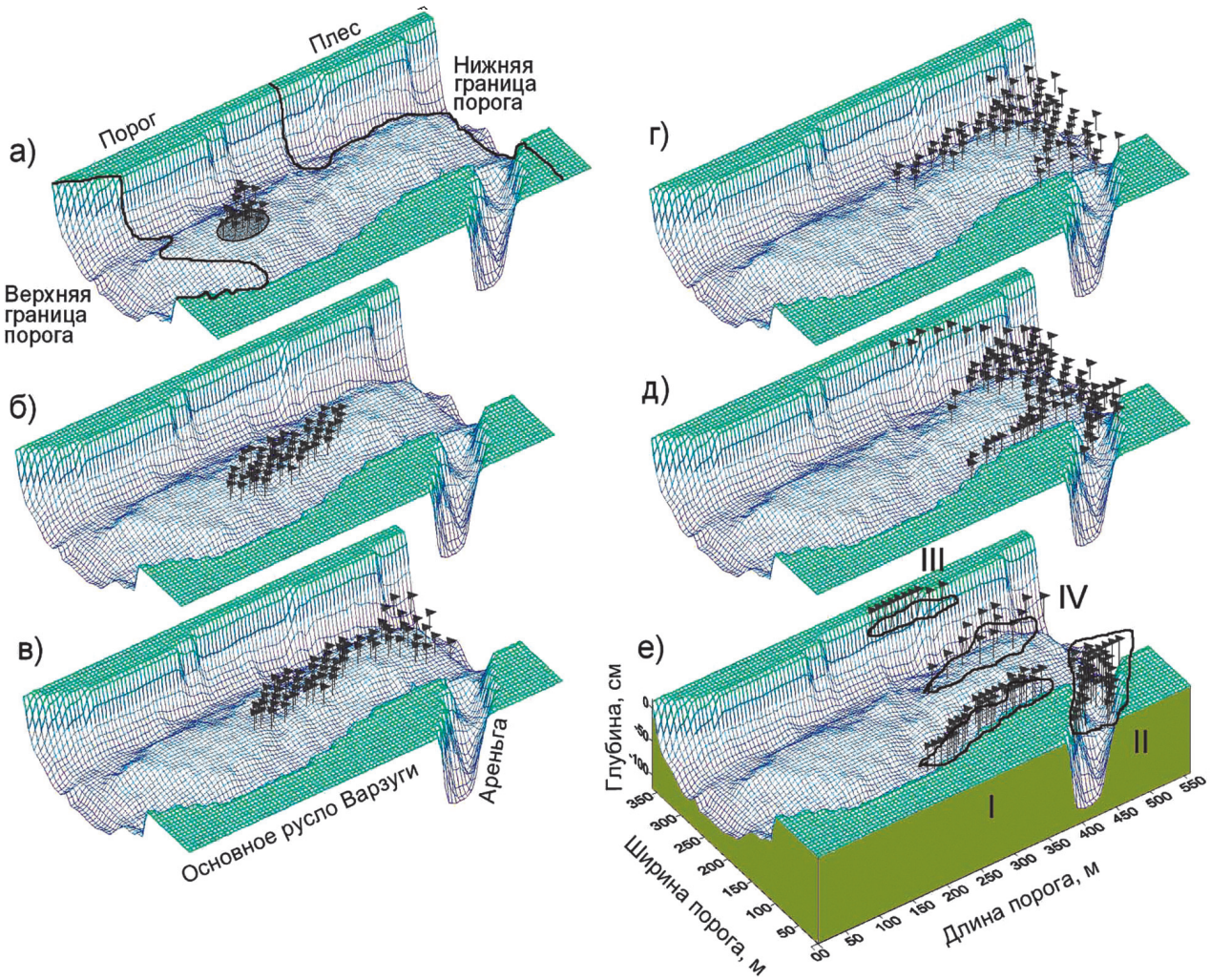


Рис. 2. Схема расселения сеголеток лосося из нерестовых гнезд центральной части порога р. Варзуги (а – е) и формирования фенотипических групп (е)

I – прибрежная (правая), II – устьевая в Ареньге, III – прибрежная (левая), IV – русловая

Сравнение микробиотопов показало, что в притоке (участок II) грунт крупнее. Он состоит на 35–45 % из мелких (5–10 см) и на 40–50 % из средних размеров валунов (11–25 см), содержание гальки (1,0–4,9 см) не превышало 15 %. На таком грунте хорошо представлены нитчатые водоросли и обрастания мха, способствующие развитию кормовой базы – зообентоса беспозвоночных организмов [Шустов, 1983]. Фракционный состав грунта прибрежного правого участка (I), где отлавливали мальков, напротив, состоял преимущественно из гальки (до 65–80 %) и мелких валунов (15–30 %), а также содержал незначительное (около 5 %) количество валунов средних размеров. Этот грунт почти не имел обрастаний. Оценка варьирующих глубин в целом не выявила существенных различий по микробиотопам, однако средняя поверхностная скорость течения в притоке Ареньга (0,97 м/с), кроме периода малой воды в августе, была достоверно выше за счет большего уклона русла, чем в прибрежье Варзуги (0,58 м/с).

Таким образом, участок обитания в притоке за счет более крупных фракций грунта и повышенных скоростей течения обеспечен более разнообразными микростациями для молоди лосося. Это также подтверждалось плотностью распределения: 7–12 экз./100 м^2 в притоке и 2–5 экз./100 м^2 в прибрежье. Далее экспериментально исследовали образовавшиеся две фенотипические группы сеголеток лосося на различия в локомоторных показателях реореакции.

Локомоторные показатели реореакции фенотипических групп сеголеток лосося. Экспериментально установлено, что минимальная скорость течения ($V_{пор.}$), стимулирующая двигательную реакцию в виде нистагма глаз, изгиба плавников, достоверно не различается между особями обоих групп как в июне, так и в августе (табл.). Можно предположить, что проявление реореакции на пороговую скорость течения, или чувствительность к потоку, изначально одинакова у сеголеток лосося и различия, как показано [Veselov et al., 1998; Веселов и др., 2001], проявляются лишь в возрасте 1+ и старше. Следовательно, показатель $V_{пор.}$ менее существен для избрания будущего микробиотопа обитания, чем способность лавировать и физически противостоять неоднородному турбулентному потоку при совершении пищевых или оборонительных бросков и перемещении в придонном пространстве.

В связи с этим при усилении потока исследовали более значимые для активного освоения подвижного пространства обитания показатели $V_{акт.}$ и $V_{крит.}$

Показатель $V_{акт.}$ характеризует достижение такой скорости течения, при которой малек, находясь в тактильном контакте с дном, перестает удерживаться только за счет прижимного давления потока на развернутые им грудные и брюшные плавники. Происходит смещение его относительно неподвижных ориентиров, что и стимулирует включение локомоции, обеспечивающей возврат и устойчивое поддержание исходной позиции. Установлено, что в июне показатель $V_{акт.}$, измеренный у мальков прибрежной группы основного русла р. Варзуги, достоверно меньше, чем у мальков из устья притока. К августу эти различия усиливаются (см. табл.). Это свидетельствует о раннем включении локомоции прибрежными сеголетками и, следовательно, совершаемыми ими повышенными энергетическими тратами в одинаковых с устьевыми мальками условиях потока.

Другой локомоторный показатель реореакции – $V_{крит.}$ – характеризует краткосрочно выдерживаемую максимальную для малька скорость потока. Его значения отражают способность рыбы совершать пищевые или оборонительные броски из спокойных по течению придонных слоев в толщу воды, характеризующуюся стремительным потоком. Например, на таких участках порогов, где поверхностная скорость течения около 1,5–2 м/с, что не редкость для лососевых нерестовых рек [Веселов, Калюжин, 2001; Калюжин и др., 2009]. Экспериментально нами выявлены достоверные различия по этому показателю между обеими группами в пользу устьевых мальков (II), причем они возрастают в летний период (см. табл.).

Анализируя оба показателя ($V_{акт.}$ и $V_{крит.}$), можно сказать, что в динамичных по структуре потока речных условиях обитания для устьевых сеголеток с развитием реореакции и локомоторных способностей повышается доступность по градиенту скоростей течения разнообразных микробиотопов и микростаций [Веселов, Калюжин, 2001]. Это в свою очередь связано с широтой вариации кормовых условий [Барышев, Веселов, 2003; Барышев, 2004], определяющих темп роста [Шустов, Смирнов, 1978]. Например, исследования бентоса в бассейне р. Варзуги показали, что в среднем количество амфибиотических насекомых существенно больше в притоках, чем в главном русле [Барышев, Веселов, 2003; Барышев, 2004], поэтому к августу среди образовавшихся групп проявились четкие размерно-весовые различия (см. табл.).

Во многих притоках нерестовых рек, имеющих сложную гидрографическую структуру, складывается более благоприятное для сеголеток лосося и развития кормовых организмов сочетание рельефа и гидрологических факторов (глубина, скорость течения, фракционный состав грунта). В июне – начале июля в прибрежных микробиотопах Варзуги поверхностная скорость течения была ниже, чем в устье

Сравнительная характеристика показателей реореакции для прибрежной и устьевой фенотипических групп сеголеток лосося р. Варзуги в июне и августе

Период вылова, группы сеголеток (n = 30)		Показатели реореакции			Длина, см	Вес, г
		$V_{пор.}$	$V_{акт.}$	$V_{крит.}$		
Июнь,	Прибрежные	0,83±0,35	6,08±0,64	26,17±2,15	2,65±0,09	0,079±0,010
IV декада	Устьевые	1,02±0,54	7,77±0,80	34,27±2,33	2,73±0,12	0,094±0,015
Август,	Прибрежные	0,65±0,11	15,33±2,17	42,02±3,12	4,11±0,13	0,68±0,10
I декада	Устьевые	0,72±0,18	23,51±2,66	56,11±6,85	4,68±0,18	0,98±0,13

Ареньги. Установлено, что интенсивность заселения мальками притоков выше, чем их продвижение вдоль берега главного русла. Например, за 5–6 суток они перемещались от устья вверх по притоку на 250–300 м, а обитающие в прибрежье сеголетки – вдоль берега против течения всего на 100–150 м. Существенно и то, что разница дневных и ночных температур в притоках больше (5–7°С), чем в главном русле (3–5°С) [Павлов и др., 2008]. Это также может оказывать положительное влияние на рост молоди и накопление фенотипических различий [Сущеня, 1978; Константинов и др., 1987, 1989; Веселов, Калюжин, 2001], отражающихся на проявлении «силовых» ($V_{акт.}$ и $V_{крит.}$) показателей локомоторной компоненты реореакции и способности осваивать микробиотопы с высокими скоростями течения.

Таким образом, заселение микробиотопов, имеющих различные гидрологические характеристики, определяется реореакцией мальков. Часть из них проявляла повышенную способность сопротивляться потоку и заселила микробиотопы с высокими скоростями течения. У молоди лососевых (Salmonidae), как и у ряда других рыб, существует дифференциация на группы по морфологическим и физиолого-биохимическим показателям [Thorpe, 1977; Павлов и др., 2007б и др.]. Одна из предпосылок образования групп, по-видимому, связана с изначальной разнокачественностью икры по биохимическим показателям, например по липидному статусу [Нефедова и др., 2010]. Известно также, что икринки лососевых рыб, и в частности атлантического лосося, отличаются друг от друга по размерам, массе и объему запасенных веществ [Казаков, 1982]. Эта разнокачественность икры в последующем сказывается на интенсивности роста и развитии ранней молоди. Она влияет и на результаты первичного расселения сеголеток атлантического лосося из нерестовых гнезд [Веселов, Калюжин, 2001]. Можно предположить, что это определяет неодинаковые стартовые возможности расселения личинок в разные по условиям обитания микробиотопы и в значительной степени влияет на проявление такого интегрального показателя, как реореакция. Внутрипопуляционная неоднородность формируется под влиянием условий окружающей среды и встречается даже у потомства одной пары производителей [Павлов и др., 2007а]. Ее адаптивное значение заключается в повышении выживаемости молоди [Павлов и др., 2010].

Заключение

Выявленные по показателям реореакции устойчивые различия сравниваемых групп сеголеток, которые возникли сразу после расселения из одних и тех же нерестовых гнезд, по-видимому, свидетельствуют о первичном влиянии разнокачественности эмбрионов на формирование различий по показателям реореакции. Наличие фенотипических групп у сеголеток лосося, по нашему мнению, играет значительную роль в дальнейшей дифференциации молоди лосося, поэтому проявившиеся различия реореакции можно рассматривать как одну из предпосылок возникновения фенотипических групп. В дальнейшем эти различия отразятся на выживаемости в зимний период, темпе роста, сроках смолтификации и миграции на нагул молоди в море. Неоднородные условия среды обитания, как и начальная разнокачественность эмбрионов, вероятно, и определяют формирование сложной по числу прожитых лет в реке и море возрастной структуры атлантического лосося в крупных реках, например, Варзуге на Кольском полуострове [Казаков и др., 1992; Лысенко, Берестовский, 1999; Зубченко и др., 2002].

Работа выполнена при поддержке фонда РФФИ (грант № 11-04-00686_а).

Литература

Алеев Ю. Г. Функциональные основы внешнего строения рыб. М.: изд-во АН СССР, 1963. 247 с.

Барышев И. А. Амфибиотические насекомые выростных участков молоди атлантического лосося в бассейне реки Варзуга // Мат. II Всерос. симпозиума по амфибиотическим и водным насекомым. Воронеж: Воронежский государственный университет, 2004. С. 7–13.

Барышев И. А., Веселов А. Е. Влияние кормовых условий на распределение молоди лосося в бассейне р. Варзуги (Кольский п-ов) // Тез. Междунар. конф. «Трофические связи в водных сообществах и экосистемах». Борок, 2003. С. 6.

Васнецов В. В. Этапы развития костистых рыб // Очерки по общим вопросам ихтиологии. М., 1953. С. 207–217.

Веселов А. Е., Калюжин С. М. Экология, поведение и распределение молоди атлантического лосося. Петрозаводск: Карелия, 2001. 160 с.

Веселов А. Е., Сысоева М. И., Бахмет И. Н. Изменение локомоторной компоненты реореакции в онтогенезе молоди атлантического лосося // Экологические проблемы онтогенеза рыб: физиолого-биохимические аспекты. М.: изд. МГУ, 2001. С. 125–134.

Зубченко А. В., Веселов А. Е., Калюжин С. М. Биологические основы управления запасами семги в реке Варзуге и Варзугском рыбопромысловом районе: Практ. рекомен. Петрозаводск; Мурманск: Остленд, 2002. 77 с.

Казаков Р. В. Биологические основы разведения атлантического лосося. М.: Легкая и пищевая промсть, 1982. 144 с.

Казаков Р. В., Кузьмин О. Г., Шустов Ю. А., Щуров И. Л. Атлантический лосось реки Варзуги. СПб: Гидрометеоиздат, 1992. 108 с.

Калюжин С. М., Веселов А. Е., Лумме Я. И. Лососевые реки полуострова Рыбачий. Петрозаводск: изд-во Карельского научного центра РАН, 2009. 180 с.

Константинов А. С., Зданович В. В., Калашников Ю. Н. Влияние перемены температуры на рост эвритермных и стенотермных рыб // Вопр. ихтиологии. 1987. Т. 27, вып. 6. С. 971–977.

Константинов А. С., Зданович В. В., Тихомиров Д. Г. Влияние осцилляции температуры на интенсивность обмена и энергетику молоди рыб // Вопр. ихтиологии. 1989. Т. 27, вып. 6. С. 1019–1027.

Лысенко Л. Ф., Берестовский Е. Г. Лососи реки Варзуга. Мурманск: изд-во ММБИ Кольского научного центра РАН, 1999. 36 с.

Нефедова З. А., Мурзина С. А., Руоколайнен Т. Р. и др. Липидный состав разных порций текучей икры атлантического лосося *Salmo salar* L. // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Т 1. Экологическая физиология и биохимия водных организмов. Петрозаводск, 2010. С. 215–218.

Павлов Д. С. Биологические основы управления поведением рыб в потоке воды. М.: Наука, 1979. 319 с.

Павлов Д. С., Мочек А. Д., Капустин С. Н. Дневное распределение рыб в реке, по данным подводных наблюдений // Вопр. ихтиол. 1981. Т. 21, вып. 1. С. 177–180.

Павлов Д. С. Миграция рыб во внутренних водоемах и их связь с течениями // Журн. общей биологии. 1986. Т. 47, № 2. С. 173–182.

Павлов Д. С., Лупандин А. И., Костин В. В. Механизмы покатной миграции молоди речных рыб. М.: Наука, 2007а. 211 с.

Павлов Д. С., Мещерякова О. В., Веселов А. Е. и др. Показатели энергетического обмена у молоди атлантического лосося *Salmo salar*, обитающей в главном русле и притоке реки Варзуга (Кольский полуостров) // Вопр. ихтиол. 2007б. Т. 47, № 6. С. 819–826.

Павлов Д. С., Нефедова З.А., Веселов А.Е. и др. Липидный статус сеголеток атлантического лосося *Salmo salar* L. из разных микробиотопов р. Варзуга // Вопр. ихтиол. 2008. Т. 48, № 5. С. 679–685.

Сущеня Л.М. Рост водных животных в условиях колеблющихся температур // Труды ВГБО: Элементы водных экосистем. 1978. Т. 22. С. 140–150.

Шустов Ю. А., Смирнов Ю. А. Питание, рост и расселение молоди в реках // Лососевые нерестовые реки Онежского озера. Биологический режим, использование. Л.: Наука, 1978. 102 с.

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

Keenleyside M. H. A. Skin-diving observations of Atlantic salmon and brook trout in the Miramichi River, New Brunswick // J. Fish. Res. Bd Canada, 1962. Vol. 19, N 4. P. 625–634.

Pavlov D. S., Ponomareva V. Yu., Veselov A. Je., Kostin V. V. Reoreaction as a Mechanism of Formation on Phenotypic Groups of Underyerling of the Atlantic Salmon *Salmo salar* // J. of Ichthyol. 2010. Vol. 50, N 6. P. 483–488.

Thorpe J. E. Bimodal distribution of length of juvenile Atlantic salmon under artificial rearing conditions // J. Fish Biol. 1977. Vol. 11. P. 175–184.

Wankowski J. W. J., Thorpe J. E. Spatial distribution and feeding in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. juveniles // J. Fish. Biol. 1979. Vol. 14, N 3. P. 239–248.

Veselov A. Je., Kazakov R. V., Sysoyeva M. I., Bahmet I. N. Ontogenesis of reotactic and optomotor responses of juvenile Atlantic salmon // Aquaculture. Special issue: Salmonid smoltification V. 1998. Vol. 168. P. 17–26.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Веселов Алексей Елпидифорович
главный научный сотрудник, д.б.н., профессор
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: veselov@krc.karelia.ru
тел. (8142) 767812

Павлов Дмитрий Сергеевич
директор ИПЭЭ РАН, академик РАН
Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН
Ленинский пр., 33, Москва, Россия, 119071
эл. почта: pavlov@sevin.ru
тел. (495) 9522088

Veselov, Alexey
Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: veselov@krc.karelia.ru
tel. (8142) 767812

Pavlov, Dmitry
Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Science
Leninsky pr., 33, 119071, Moscow, Russia
e-mail: pavlov@sevin.ru
tel. (495) 9522088

Скоробогатов Михаил Александрович
ведущий научный сотрудник, д.т.н., профессор
Институт проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова РАН
Ленинский пр., 33, Москва, Россия, 119071
эл. почта: skorobogatov1@rambler.ru
тел. (495) 9522088

Ефремов Денис Александрович
ведущий биолог, аспирант
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: denisefremov@list.ru
тел. (8142) 769810

Потапов Кирилл Юрьевич
аспирант
Петрозаводский государственный университет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: liricman@gmail.com
тел. (8142)781741

Skorobogatov, Mikhail
Institute of Ecology and Evolution,
Russian Academy of Science
Leninsky pr., 33, 119071, Moscow, Russia
e-mail: skorobogatov1@rambler.ru
tel. (495) 9522088

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

Potapov, Kirill
Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: liricman@gmail.com
tel. (8142)781741

Труды Карельского научного центра РАН
№ 3. 2011. С. 28–38.

УДК 591.545:597.552.51(282.247.211)

ОПЫТ ИСКУССТВЕННОЙ ИНКУБАЦИИ ИКРЫ АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ (*SALMO SALAR* L.) В р. СУНЕ (БАССЕЙН ОНЕЖСКОГО ОЗЕРА)

А. Е. Веселов[1], Д. С. Павлов[2], М. А. Скоробогатов[2], Д. А. Ефремов[1], Е. Н. Белякова[3], К. Ю. Потапов[3]

[1] *Институт биологии Карельского научного центра РАН*
[2] *Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН*
[3] *Петрозаводский государственный университет*

Разработана и испытана новая технология искусственного воспроизводства атлантического лосося. Завершение заводской инкубации икры происходит в речных условиях путем закладки в марте эмбрионов на стадии «глазок» в гнезда-инкубаторы и установки их на дно реки. Предложены две конструкции искусственных гнезд-инкубаторов икры, позволяющие получать жизнестойких мальков, самостоятельно расселяющихся по выростным участкам рек. В этих конструкциях для создания благоприятных условий развития эмбрионов используется естественно очищенный от наносов подрусловой поток. Испытания в течение 2,5 мес. гнезд, установленных на пороге р. Суны (бассейн Онежского озера), показали высокую эффективность инкубации икры в естественных условиях. В трубчатых гнездах-инкубаторах, вкручиваемых в грунт, выход личинок достиг 95 %, в плоских, прижимаемых ко дну, – 94–97 %. Результатом инкубации стало самостоятельное расселение жизнестойких личинок лосося из гнезд-инкубаторов по выростному участку порога.

Ключевые слова: атлантический лосось, инкубация икры, гнездо-инкубатор.

A. E. Veselov[1], D. S. Pavlov[2], M. A. Skorobogatov[2], D. A. Efremov[1], E. N. Belyakova[3], K. Yu. Potapov[3]. AN EXPERIENCE OF ARTIFICIALLY INCUBATING ATLANTIC SALMON (*SALMO SALAR* L.) EGGS IN THE SUNA RIVER (LAKE ONEGA BASIN)

A new technology for artificial reproduction of Atlantic salmon was developed and tested. The final stage of incubation of hatchery-reared eggs takes place in the river: in March eyed eggs are placed into incubation redds which are then planted into/onto the riverbed. We proposed two designs of artificial redds for egg incubation, which supply viable fry that would independently disperse across nursery areas. The «redds» are designed so that the underflow, where impurities are naturally filtered away, creates the conditions favourable for the embryos. Trials of the redds in a rapid in the Suna River (Lake Onega basin), which lasted 2.5 months, proved egg incubation in the natural settings to be very effective. Larvae emergence from pipe-shaped incubation redds twisted into the riverbed was 95 %, and that from flat ones pressed onto the riverbed – 94–97 %. Eventually, viable salmon fry from the incubation redds independently dispersed across the nursery area of the rapid.

Key words: Atlantic salmon, egg incubation, incubation redd.

Введение

Известно, что неконтролируемое рыболовство, вырубка леса и молевой сплав древесины, строительство гидротехнических сооружений, сброс сточных вод и т. д. в прошлом веке привели к резкому сокращению численности в популяциях лососевых видов рыб. Некоторые из них безвозвратно исчезли. Вместе с тем интерес исследователей к созданию искусственных и эффективных устройств, позволяющих инкубировать икру в реках, отчетливо проявился лишь с 80-х гг. прошлого столетия, в основном в европейских странах и на Северо-Американском континенте. Связано это с практикой рекультивации нерестово-выростных биотопов и восстановлением запасов прежде всего лососевых видов рыб [Scrivener, 1988; Der Lachs.., 2005; Lippeaue.., 2009]. Вместе с тем результаты инвентаризации и паспортизации нерестовых рек Восточной Фенноскандии позволили выявить и в этом регионе ряд рек с нестабильным воспроизводством, а также с утраченными популяциями лосося [Веселов, 2006]. В связи с этим проблема восстановления запасов нерестовых производителей лососевых рыб актуальна и для Северо-Запада России.

Существует ряд подходов к решению задачи восстановления численности лососевых рыб или воссоздания стад в реках, где они были утрачены. Наиболее распространено заводское воспроизводство с последующим выпуском молоди в реки на стадии пестрятка или смолт [Казаков, 1982]. Между тем для небольших или труднодоступных рек этот метод весьма затратен. Кроме того, хорошо известно, что заводская молодь слабо приспособлена к естественным условиям обитания и в большом количестве погибает [Щуров, 1990].

Идея инкубации икры лососевых рыб в естественных условиях возникала неоднократно на протяжении почти столетнего периода [Кузнецов, 1923; Тихий, 1925; Барков, Гринюк, 1970 и др.]. Суть ее заключается в искусственном оплодотворении икры и дальнейшей инкубации в речной гальке или специальных устройствах, размещенных в естественных условиях. Как известно, искусственное оплодотворение практически исключает потери, имеющие место при естественном нересте, – неполное оплодотворение, вымывание икры потоком при строительстве гнезда, выедание хищниками, гибель в плотном грунте при недостатке кислорода. Разрабатывая инкубационные устройства и технологии их использования, авторы стремятся получить жизнестойких личинок лосося, которые способны сами расселяться из них по выростным участкам рек. В результате из цикла воспроизводства исключается ряд негативных последствий, имеющих место при заводском выращивании, таких как слабая физическая выносливость, отсутствие навыков пищевого и оборонительного поведения в интенсивном речном потоке и, как следствие, высокий уровень гибели такой молоди еще до ее ската в нагульные водоемы [Казаков, 1982; Щуров, 1990].

Необходимо отметить, что естественные речные условия, в которых проводятся испытания конструкций и технологий, существенно различаются. Так, в нерестовых реках Германии, Шотландии или южной Норвегии в зимний период практически нет устойчивого ледового покрова, и это позволяет разработчикам закладывать в технологию периодический контроль процесса инкубации, включающий очистку фильтрующих элементов и удаление погибших эмбрионов [Bams, 1985; Donaghy, Verspoor, 2000 и др.]. Между тем на севере России в реках образуется мощный и устойчивый ледовый покров на протяжении 5–7 месяцев, что практически исключает использование инкубационных устройств, в которых предусматривается обслуживание.

В связи с этим цель настоящей работы заключалась в разработке технологии и инкубационных устройств, которые позволяют в реках Восточной Фенноскандии получать жизнестойкую молодь атлантического лосося. Это наиболее важно для восстановления численности стад лососевых рыб в реках, где их запасы по различным причинам существенно снизились, а также для воссоздания стад на тех реках, где популяции лосося были утрачены.

Материалы и методы

Работа проводилась с 20 марта по 22 июня 2008 г. на территории заповедника «Кивач», на одноименном пороге р. Суны (62°16’ с.ш., 33°59’ в.д.), расположенном в 300 м ниже водопада. Река относится к бассейну Онежского озера, до 1964 г. имела статус лососевого нерестового водоема [Смирнов, 1971]. В настоящее время в результате планомерных выпусков молоди шуйской популяции пресноводного лосося в реку в районе порога Кивач наблюдаются возврат производителей, их нерест и появление новых генераций молоди. Таким образом, использование икры пресноводного лосося шуйской популяции, географически близкой к р. Суне, вполне оправданно. В условиях высокой прозрачности воды немаловажно расположение порога Кивач на заповедной территории, то есть весьма заметные испытываемые конструкции фактически находились под охраной.

Икра пресноводного лосося была получена на Шуйском рыбопункте (п. Нижний Бесовец) и

инкубировалась с осени 2007 г. на Кемском рыбоводном заводе. Согласно разработанной нами сокращенной технологии, оплодотворенную икру выдерживали на рыбоводном заводе с октября по март. Ко второй половине марта развитие эмбрионов достигало стадии «глазок». В течение указанного периода процесс инкубации икры контролировался, производился отсев погибших эмбрионов. Затем 20 марта, когда с большей части порога в р. Суне сошел лед, икра, помещенная в термобокс, была доставлена с рыбоводного завода в заповедник. В тот же день ее заложили в гнезда-инкубаторы и установили на двух площадках галечно-валунного грунта порога.

Специально были разработаны и изготовлены два типа компактных конструкций гнезд-инкубаторов лососевой икры с целью получения жизнестойких, свободно расселяющихся личинок. Одна из них – цилиндрическая, вкручиваемая или погружаемая в галечный грунт, условно названная «штопор». Вторая – по виду уплощенная «шайба», прижимаемая ко дну под весом стального грузового кольца (рис. 1а, б, г). В обеих конструкциях гнезд-инкубаторов заложена идея использования подруслового потока для обеспечения благоприятных условий развития икры – омывания, оттока метаболитов и аэрации.

Всего было установлено три вкручиваемых и 10 донных гнезд, в которые загружено около 1150 икринок. Точное количество икры определялось по фотографиям, сделанным перед закрытием гнезд (см. рис. 1в). В дальнейшем область расселения и плотность распределения сеголеток лосося из искусственных гнезд контролировали подводными наблюдениями.

Конструкции гнезд-инкубаторов

В разработанной конструкции «штопор» естественно очищенная от наносов вода подруслового потока забиралась с оптимальной глубины (10–12 см) в грунте порога. Данное устройство за счет вспомогательного приспособления может быть установлено в разных по гидрологическим условиям реках, в том числе в таких руслах, дно которых сложено крупными фракциями гальки и мелкого валуна. Устройство состоит из корпуса цилиндрической формы, внутреннее пространство которого используется в качестве инкубационной камеры (рис. 2а). Сверху камера закрыта крышкой, имеющей наклон к горизонтальной поверхности под углом от 5 до 45°. При ее наклоне менее 5° выход активно плавающих личинок из устройства затруднен, поэтому они могут в нем задерживаться. Наибольший эффект концентрации личинок перед выходным патрубком наблюдался при наклоне крышки на угол более 15°. При углах свыше 45° приходилось увеличивать высоту устройства, что делало его не защищенным от сносимых остатков древесины или кусков льда. Крышка может быть повернута относительно оси и установлена вертикально, что удобно при загрузке оплодотворенной икры в устройство. Инкубационная камера разделена на две части концентрирующим кольцом с внутренним диаметром 10–15 мм. Величина отверстия определялась возможностью попадания подвижных личинок через концентрирующее кольцо в верхнюю часть камеры и последующего их выхода из устройства. Кольцо также снижало вероятность обратного ската личинок. В нижней части камеры установлен

Рис. 1. Порог под водопадом Кивач (20.03.2008). Вкручивание гнезда типа «штопор» в грунт (а), рабочее положение «штопора» (б). Фотографирование икры для учета заложенного количества в каждое из гнезд (в), гнезда типа «шайба» перед загрузкой оплодотворенной икры (г)

перфорированный поддон, на котором закреплен искусственный инкубационный субстрат в виде бугорков из силикона. В полузатопленном состоянии устройства на субстрат «проливается» оплодотворенная икра. Ниже поддона в корпусе со стороны подсасываемого из грунта подруслового потока высверлены отверстия для поступления очищенной воды внутрь корпуса устройства. Еще ниже отверстий находится разрыхлитель грунта. Он изготовлен в виде двух перпендикулярно установленных пластин треугольной формы с углом при вершине от 90 до 120°. Лабораторные гидравлические исследования показали, что указанные пределы изменения угла при вершине наиболее оптимальны для разрыхления грунта путем вкручивания данного устройства. Для крепления коловорота при вкручивании гнезда в грунт с внешней части корпуса имеются вертикальные приливы. Расселение личинок лосося происходит из верхней части камеры, где предусмотрен эвакуационный патрубок. Вода подруслового потока просачивается через отверстия и пространство между пластинами рыхлителя грунта, попадая в инкубационную камеру, где постоянным свежим потоком эмбрионы омываются и аэрируются, подобно тому, как это происходит в естественных нерестовых гнездах.

Инкубатор типа «шайба» представляет собой цилиндрический уплощенный полимерный бокс диаметром 12 см (рис. 2б). Внутри устройства расположен перфорированный поддон, на поверхности которого нанесен силиконовый субстрат в виде разделительных бугорков. В верхней части гнезда закреплен эвакуационный патрубок. С наружной стороны инкубатора насаживается стальное грузовое кольцо, обеспечивающее прижим ко дну и устойчивость конструкции в период паводка.

Перед установкой «шайбы» в речной поток в камеру через патрубок с помощью воронки заливают вместе с водой около 100 оплодотворенных икринок лосося. Затем при погружении в воду выходное отверстие патрубка закрывают крышкой. В воде через отверстие в пробке воздух выпускается из гнезда. При его покачивании икра, находящаяся в камере, равномерно распределяется по инкубационному субстрату в пространстве между силиконовыми бугорками. Гнездо-инкубатор ставят на мелкую гальку дна и слегка вдавливают, чтобы поддон тесно соприкасался с грунтом, а патрубок был направлен по течению. При снятии пробки с патрубка в гнездо начинает поступать вода подруслового потока, подсасываемая через поддон. Весь период инкубации происходит омывание эмбрионов слабым и ровным потоком, который выводится через эвакуационный патрубок.

После того как из икринок вылупятся личинки, они некоторое время лежат на боку на субстрате, а затем поднимаются «на плав», совершая хаотичные движения. При полном рассасывании желточного мешка движение становится круговым, и это способствует случайному попаданию личинок в эвакуационный патрубок и выходу их наружу в естественный поток. Подъем «на плав» может растянуться по времени на одну неделю, поэтому личинки «выходят» через патрубок постепенно. Расположение устройства в речном потоке, использование подруслового потока для омывания икры и снабжения ее кислородом создают условия в инкубационной камере, близкие к условиям в естественных нерестовых гнездах.

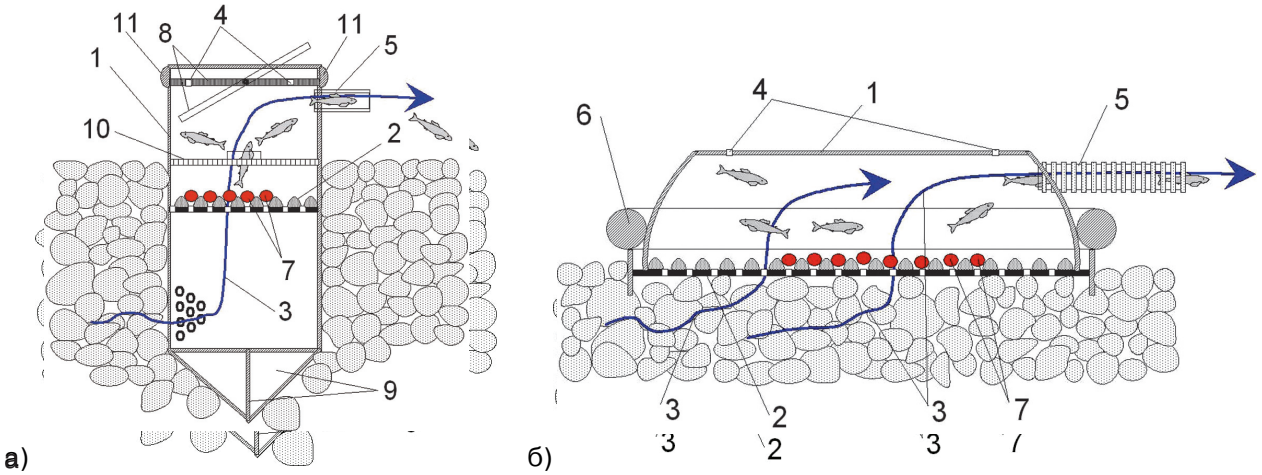


Рис. 2. Схема гнезд-инкубаторов типа «штопор» (а) и «шайба» (б)

1 – корпус гнезда, 2 – субстрат с силиконовыми лунками, 3 – поступление воды подруслового потока, 4 – дренажные отверстия, 5 – патрубок для оттока воды и выхода личинок, 6 – грузовое кольцо, 7 – икра, 8 – поворачиваемая крышка для загрузки икры, 9 – разрыхлитель грунта, 10 – концентрирующее кольцо, 11 – приливы

Результаты

На р. Суне под водопадом Кивач 2 мая проведена первая проверка искусственных гнезд-инкубаторов, которые были установлены 20 марта 2008 г. с загруженной в них икрой пресноводного лосося на стадии развития «глазок». Температура воды достигла 2–3°С, река в районе порога полностью освободилась от льда. Для контроля развития эмбрионов, оценки характера и степени заиления были подняты три конструкции типа «штопор» и четыре – типа «шайба» (рис. 3 а–г).

Конструкция «штопор». После поворота крышек и последовательного переливания содержимого гнезд в раздельные пластиковые контейнеры установлено, что практически все личинки выклюнулись. Выживаемость эмбрионов во всех трех гнездах составила 96–97%. От погибших икринок остались почти пустые белые оболочки. Следует отметить высокую чистоту воды внутри конструкций – заиление к моменту проверки отсутствовало, однако в целом производительность данной конструкции остается весьма низкой из-за малой площади инкубационного субстрата. По этой причине в гнездо типа «штопор» загружалось всего 24–27 икринок.

Конструкция «шайба». Содержимое поднятых конструкций было также перелито в раздельные пластиковые контейнеры. Визуальный контроль показал, что выклюнулось 96–97 % эмбрионов, то есть из 100 загруженных икринок число погибших составило всего 3–4 шт. Выклюнувшиеся эмбрионы, как и в гнезде «штопор», демонстрировали высокую подвижность, несмотря на наличие крупного желточного мешка, перемещались они в основном лежа на боку.

Отметим, что в конструкции «шайба» наблюдалось заиление в виде мелкодисперсного ила, который комковался внутри инкубационного пространства, а также им были забиты некоторые отверстия в поддоне, через которые вода поступает в гнездо.

По окончании контрольных работ, проводившихся 2 мая, эмбрионы были «перелиты» в гнезда, конструкции собраны и установлены в пороге на прежние места.

Вторая проверка осуществлялась 23 мая, когда температура воды достигла 7–8°С. Перед этим, с 5 по 17 мая, в реке прошел основной пик паводка и уровень воды стал весьма быстро снижаться. Срок проверки выбран не случайно, так как при такой температуре в естественных гнездах личинки лосося находятся в активном состоянии и далее при ее повышении до 10–11°С начинают постепенно «выбираться» из гальки на поверхность дна. К этому моменту в реке изменились гидрологические условия: уровень воды после основного паводка остался повышенным на 10 см, и на 30 % снизилась прозрачность воды. За истекший период с правой стороны порога (по течению) грунт оказался сильно вспаханным за счет сброса через водопад льдин с вышерасположенных озеровидных расширений. Это затруднило поиск установленных там конструкций типа «шайба». В дальнейшем такие особенности весеннего паводка следует учитывать при выборе мест для установки гнезд-инкубаторов. Всего было поднято одна конструкция типа «штопор» и две – типа «шайба» (рис. 4 а–г).

Конструкция «штопор». Содержимое через верхнюю поворотную крышку перелито в пластиковый контейнер (рис. 4б). За истекший пе-

Рис. 3. Первая контрольная проверка успешности выклева личинок лосося в гнездах-инкубаторах типа «штопор» (а, б) и «шайба» (в, г) (02.05.2008) на пороге под водопадом Кивач

Рис. 4. Вторая контрольная проверка (23.05.2008) жизнеспособности личинок лосося в гнездах-инкубаторах (а), содержимое «штопора» (б) и «шайбы» (в), личинки лосося перед выходом из гнезда (г)

риод погибло только две личинки, а остальные оказались живыми и подвижными. Желточный мешок рассосался у них на 2/3 объема. Вода содержала незначительное количество взмученного мелкодисперсного ила.

Конструкция «шайба». Подсчет личинок и оценка их состояния осуществлялись также после открытия крышки и переливания содержимого в пластиковый контейнер. Замутнение воды в этом типе гнезда было несколько выше, чем в «штопоре», однако выживаемость личинок тоже оказалась высокой – всего в гнезде № 10 погибла одна личинка и в гнезде № 6 – две (рис. 4 в, г).

Снижение количества личинок на 2–3 экз. в обоих типах конструкций свидетельствовало о начале их выхода из гнезд в межгалечное пространство речного грунта. Причем это был активный выход жизнеспособных личинок, так как вымывание погибших невозможно из-за конструктивных особенностей обоих гнезд.

С целью продолжения испытания содержимое контейнеров было снова залито в соответствующие гнезда, которые затем установили на прежние места в грунт реки.

Заключительная проверка искусственных гнезд-инкубаторов в р. Суне была проведена 6 июня 2008 г. (рис. 5). Все три конструкции типа «штопор» были обнаружены и подняты. Личинки вышли из гнезд в окружающее придонное пространство. Повреждений корпуса или нарушения установки в грунт не наблюдалось. Эффективность инкубации икры в них составила около 93%. Из десяти установленных гнезд-инкубаторов типа «шайба» найдено девять. По соотношению заложенной икры, выклюнувшихся эмбрионов и покинувших гнезда личинок эффективность инкубации в 8 конструкциях достигла 94–97 %. В некоторых гнездах еще оставались отдельные личинки, у которых полностью рассосался желточный мешок (рис. 5 а). В гнезде № 5, которое оказалось засыпанным мелким песком, икра погибла (рис. 5 б). Это связано со вспахиванием грунта льдинами, сносимыми в паводковый период, и перемещением песка.

Расселение личинок из гнезд. В обоих вариантах конструкций выход и расселение личинок из гнезд-инкубаторов начались с 22 мая и продолжались до первых чисел июня, то есть в те же сроки, что и при естественном нересте. Подводными наблюдениями, выполненными 23 и 25 мая, установлено, что при прогреве воды до 11–12°С происходило массовое расселение личинок лосося из гнезд-инкубаторов. К этому моменту желточные мешки полностью рассосались и личинки лосося покидали гнезда через эвакуационные патрубки, попадая в поверхностный слой грунта. Возле гнезд на площади около 5 м^2 плотность распределения личинок достигала 17±6 экз./м^2. Затем в течение 5–7 сут происходило их первичное расселение вниз по течению на расстояние около 20–25 м, почти до границы порога с плесом. К 30 мая плотность распределения личинок возле гнезд-инкубаторов снизилась до 8±3 экз./м^2. В процессе расселения личинки становились мальками – переключались на экзогенное питание и приобретали чешуйный покров (рис. 5 в). На этой стадии их перемещение по течению заканчивалось и начиналось вторичное перераспределение из центральной части русла к прибрежным участкам порога. Как нами показано ранее, вторичное расселе-

Рис. 5. Третья контрольная проверка (06.06.2008) результатов выхода личинок лосося из гнезд: последние личинки в «шайбе» (а), погибшие личинки в гнезде, засыпанном песком (б), отловленные возле гнезд мальки (в)

ние сеголеток лосося происходит при активной локомоции против течения и связано с устойчивым проявлением у них реореакции [Veselov et al., 1998]. К III–IV декадам июня, с переходом паводкового режима в меженный, расселение сеголеток лосося завершалось и их распределение приняло мозаично-агрегированный характер, как и у диких пестряток лосося старших возрастных групп.

Обсуждение

Известно, что еще в 1905–1906 гг. Вальтер Гейн провел опыты по инкубации икры и выдерживанию личинок форели в грунте. Он выявил преимущества такого метода выращивания личинок под слоем гальки по сравнению с искусственным разведением, так как были достигнуты высокая выживаемость и саморасространение личинок по участкам обитания. В 1908 г. появились новые образцы искусственных инкубаторов, представлявшие собой деревянные ящики (120 • 60 • 45 см). Эти ящики устанавливали осенью в русле ручьев на предполагаемых выростных участках и последовательно загружали слоем гальки, затем слоем оплодотворенной икры и покрывали снова галькой. Ящики «зимовали» до весеннего выхода из них и самостоятельного расселения личинок [Тихий, 1925].

Наш соотечественник И. И. Кузнецов [1923] писал: «... достигнуть правильного решения ... можно только тогда, когда явится возможность приблизить способ искусственного размножения к размножению естественному, то есть если будем пользоваться для оплодотворения икры рыбою в тех реках... которая зайдет в речку сама, а икру выращивать не в заводах, а в речке, применяясь, с одной стороны, к благоприятным условиям выращивания в естественных условиях и, с другой стороны, устраняя все неблагоприятные в них условия развития икры и мальков (обсыхание, промерзание гнезд и проч.)». Выводы И. И. Кузнецова были основаны на проведенном в 1918 г. опыте с закапыванием оплодотворенной икры кеты и горбуши в галечный грунт на р. Праурэ (приток р. Амур, Дальний Восток). Результат превзошел ожидания. Проверка состояния искусственных гнезд в марте показала наличие первых жизнеспособных личинок в поверхностном слое гальки «...среди которых немного было со всосавшимися пузырями, а большинство еще с узким не сросшимся продольным швом на брюшке... окрашенным в розово-серебристый цвет». Повторная проверка через пять дней выявила, что личинки из средних слоев гальки «перебрались» в верхние и группировались у поверхности в межгалечном пространстве, постепенно расселяясь по участку обитания.

Все это довольно точно отражает расселение личинок лосося из естественных гнезд [Phillips, Koski, 1969; Веселов, Калюжин, 2001] и подтверждает идею возможности искусственной инкубации оплодотворенной икры в реках с получением практически «дикой» молоди без затратного заводского выращивания. И. И. Кузнецов показал преимущества этого метода над заводским воспроизводством, однако военно-политическая обстановка и экономические трудности в реализации проводимых мероприятий не давали возможности развиться этому направлению еще долгое время. Вместе с тем М. И. Тихий [1925] подвел итог работам того периода: как отечественные, так и иностранные исследователи не имели возможности полного учета результатов инкубации при экспериментах и, следовательно, эффективность метода неизвестна, закапывание икры в грунт – весьма трудоемкий процесс, оптимальная глубина закладки икры не проработана.

Затем в начале 70-х гг. прошлого века появилась разработка С. И. Баркова и И. Н. Гринюка [1970, 1971]. Они предложили закапывать оплодотворенную икру в речной грунт с помощью специальной лопатки. К сожалению, авторы повторили печальный опыт – в тот период не было возможности контролировать результат, используя метод подводных наблюдений

или электролов, поэтому приспособление так и осталось не востребованным.

С конца 70-х гг. прошлого столетия широкое распространение среди экспериментаторов получили боксы Виберта (Vibert boxes), представлявшие собой перфорированные пластиковые коробки, умещавшиеся на ладони, в которые послойно закладывали гальку и оплодотворенную икру лососевых видов рыб. Сами боксы или их модификации в виде сетчатых цилиндров после загрузки закапывались на разную глубину в речной грунт. В большинстве случаев авторы сталкивались с главной проблемой – накоплением в боксах губительных для эмбрионов осадков, постепенно затруднявших аэрацию икры и эмбрионов, отток метаболитов. Вместе с тем в чистых реках удавалось получить высокий выход саморасселяющихся личинок [Harshbarger, Porter, 1979, 1982; Rubin, 1995 и мн. др.].

Таким образом, способ закладки оплодотворенной икры в грунт и дальнейшее развитие молоди лосося в естественных речных условиях давно привлекали рыбоводов, но их осуществление затруднялось из-за технических сложностей и трудоемкости работ. В настоящее время, с появлением новых технологий и материалов, проведением детальных исследований естественного нереста, структуры и гидравлики нерестовых гнезд, а также возможностями транспортной доставки икры, такой способ воспроизводства лосося снова становится перспективным [Лупандин и др., 2005; Веселов и др., 2007].

Основная проблема искусственных гнезд-инкубаторов – это накопление внутри конструкций осадков типа ила, песчинок, растительных остатков. В речных условиях, как известно, в галечном грунте существует естественно-очищенный подрусловой поток [Леман, Кляшторин, 1987], который формирует благоприятные условия для развития эмбрионов лососевых рыб – транспорта кислорода и оттока продуктов жизнедеятельности.

Ряд европейских исследователей пошел по пути конструирования речных гнезд-инкубаторов, которые периодически должны обслуживаться, то есть изыматься из реки для промывки или смены фильтра, отсева погибших эмбрионов. В условиях теплой зимы и практически при отсутствии ледового покрова это вполне оправданно [Bams, 1985; Donaghy, Verspoor, 2000], однако на территории Северо-Запада России, при суровых зимах и ледоставе на протяжении 7–8 месяцев, наблюдение и корректировка процесса инкубации становятся невозможными. В связи с этим в основу функционирования конструкций гнезд-инкубаторов лососевой икры, устанавливаемых в реках, нами было положено использование подрусловогo потока.

Разработка технологии искусственного воспроизводства лососевых рыб в естественных условиях была начата нами в 2003 г. на реках Умба, Индера (бассейн Белого моря) и Лососинка (бассейн Онежского озера) [Лупандин и др., 2005]. С 2006 г. и по настоящее время они проводятся в двух направлениях.

Первое – это разработка полноцикловой и сокращенной технологий. Полноцикловая – когда сразу после оплодотворения (октябрь) икра закладывается в устройства, устанавливаемые на порогах рек до весны следующего года. Сокращенная – инкубация икры на рыбоводном заводе происходит только до стадии «глазка», достигаемой в марте (использована на р. Суне). Затем ее транспортируют к реке и закладывают в гнезда-инкубаторы, которые через пропиленные во льду майны устанавливают на дне реки. В обоих вариантах выход и расселение жизнестойких личинок из гнезд-инкубаторов происходит в конце мая – начале июня, как и при естественном нересте. Существенно и то, что сокращенная технология позволяет доставлять икру по бездорожью с помощью снегоходов, и то, что эта икра уже пройдет контроль на выживаемость на рыбоводном заводе. На стадии «глазок» икра имеет высокую устойчивость к механическим воздействиям, поэтому допускается ее длительная транспортировка [Казаков, 1982]. Выбор периода перевозки – март – обусловлен еще и тем, что температура воздуха становится близкой к нулю или несколько выше, что также защищает икру от повреждения низкими температурами при загрузке в искусственные гнезда-инкубаторы.

Второе направление исследований – это разработка конструкций гнезд-инкубаторов, устанавливаемых на дне реки, в которых для инкубации икры используется вода подрусловогo потока. Положительный результат удалось достичь в тех конструкциях, где водозабор осуществлялся через перфорированный поддон [Веселов и др., 2007]. В пространстве поддона, прижатого к галечному грунту, происходило резкое снижение скорости течения. За счет этого наносные взвеси осаждались, а очищенный поток проникал через отверстия в субстрате, омывая икру. В этом случае конструкции гнезд-инкубаторов можно было сделать более компактными и защищенными от внешних повреждений сносимым льдом или древесиной. Испытания в 2007 г. на реках Лососинке (Карелия) и Индере (Кольский п-ов) показали перспективность данного направления работ по искусственному воспроизводству лосося в естественных условиях. В резуль-

тате был предложен новый способ и две новые конструкции гнезд-инкубаторов, которые в условиях р. Суны позволили достичь высокой эффективности инкубации икры (в отдельных гнездах она составляла 97 %). Этим способом можно устанавливать гнезда-инкубаторы со льда или в промоины в весеннее время, когда икра находится на стадии «глазок». Следует, однако, принять во внимание то, что вода в р. Суне относительно более чистая, чем в других лососевых реках, поэтому необходимо продолжить совершенствовать способ водозабора подруслового потока и провести испытания на реках с большим количеством влекомых потоком частиц.

Таким образом, апробированная новая технология исключает полноцикловую инкубацию икры на рыбоводных заводах, подращивание молоди и транспортировку ее к месту выпуска в реку. Она также не предусматривает наличие необходимого для нереста субстрата и может применяться на достаточно обширных частях порогов и перекатов рек, при наличии подходящих гидравлических режимов потока, идентичных естественным выростным участкам. При высоком проценте искусственно оплодотворенной икры и защите ее в гнездах-инкубаторах от хищников разработчики, как показали результаты эксперимента, вправе рассчитывать на высокий процент выхода жизнестойких личинок лосося, которые будут развиваться в природной среде, физически не отличаясь от дикорастущей молоди.

Заключение

Разработана новая технология искусственного воспроизводства лососевых рыб в естественных условиях, основанная на завершении заводской инкубации эмбрионов со стадии «глазок» до полноценных личинок с помощью гнезд-инкубаторов, устанавливаемых на дне реки. Предложены две новые компактные конструкции, позволяющие получать жизнестойких мальков, самостоятельно расселяющихся по выростным участкам рек. В этих гнездах для создания благоприятных условий развития эмбрионов используется естественно очищенный от наносов подрусловой поток (патент на полезную модель №83687, 2009 г. и патент на изобретение №2386248, 2010 г.).

Испытание в течение 2,5 мес. (конец марта – начало июня) двух типов конструкций, установленных на пороге р. Суны, показало высокую эффективность инкубации икры в естественных условиях. В конструкциях гнезд типа «штопор» выход личинок лосося составил около 95 %, типа «шайба» – 94–97 %. В первой наблюдается меньшее заиление, однако во второй инкубируется значительно большее количество икры.

Гибридный вариант обеих конструкций в настоящее время испытывается на р. Лижме (Кондопожский район, Карелия), проверку которых предполагается провести 2 и 20 мая 2011 г., перед началом естественного выхода личинок из нерестовых гнезд.

Следующим этапом работ станет масштабное испытание усовершенствованных конструкций с целью получения высоких плотностей распределения сеголеток лосося (3–5 экз./м^2 к началу августа). Провести такую работу предполагается на пустующих порогах и перекатах нерестовых модельных рек Карелии и Кольского п-ова. Положительный опыт создания искусственных гнезд и инкубации в них икры будет использован для восстановления численности популяций атлантического лосося на рекультивированных после лесосплава реках. Этот опыт необходим для полной реконструкции стад на бывших лососевых реках, которые утратили их в результате гидростроительства или иной хозяйственной деятельности, но сохранили к настоящему времени все необходимые гидробиологические показатели, соответствующие требованиям к размножению и развитию лососевых видов рыб.

Работа выполнена по программе Президиума РАН «Биологические ресурсы России», тема «Разработка инновационной технологии искусственного воспроизводства лососевых рыб в естественных условиях с использованием гнезд-инкубаторов».

Литература

Барков С. И., Гринюк И. Н. Приспособление для закладки оплодотворенной икры лососевых рыб в искусственные нерестовые бугры. Авторское свидетельство №286399. Официальный бюллетень изобретений и открытий. М., 1970. № 34. 4 с.

Веселов А. Е. Инвентаризация и систематизация рек Карелии и Кольского полуострова как среды воспроизводства атлантического лосося *Salmo salar* L. // Доклады Академии наук. Общая биология. Наука, 2006. Т. 407, № 3. С. 1–5.

Веселов А. Е., Калюжин С. М. Экология, поведение и распределение молоди атлантического лосося. Петрозаводск: Карелия, 2001. 160 с.

Веселов А. Е., Аликов Л. В., Скоробогатов М. А. и др. Искусственная инкубация икры атлантического лосося *Salmo salar* L. в естественных условиях // Труды Карельского научного центра РАН. Вып. 11. Петрозаводск: КарНЦ РАН. 2007. С. 14–20.

Гринюк И. Н. Результаты опыта по разведению семги методом посадки икры на ранней стадии ее развития в искусственные гнезда. Фонды ПИНРО, № 2881. 1971. 11 с.

Казаков Р. В. Биологические основы разведения атлантического лосося. М.: Легкая и пищевая промсть, 1982. 144 с.

Кузнецов И. И. Значение промысла лососевых Дальнего Востока и искусственное рыборазведение как одно из главных средств для охранения рыбных запасов // Рыбные и пушные богатства Дальнего Востока. Сб. статей. Владивосток: изд. Научпромбюро Дальрыбохоты, 1923. С. 134–214.

Леман В. Н., Кляшторин Л. Б. Оценка состояния нерестилищ тихоокеанских лососей: метод. указ. М.: ВНИРО, 1987. 28 с.

Лупандин А. И., Павлов Д. С., Веселов А. Е., Калюжин С. М. Искусственное воспроизводство атлантического лосося (*Salmo salar*) в естественных условиях // Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами. М: КМК, 2005. С. 434–445.

Павлов Д. С., Скоробогатов М. А., Веселов А. Е., Калюжин С. М. Устройство для инкубации икры в естественных условиях. Патент на полезную модель № 83687. Заявка № 2008144253 от 20 июня 2009 г. 2009. 4 с.

Павлов Д. С., Скоробогатов М. А., Веселов А. Е., Калюжин С. М. Способ инкубации икры в искусственных гнездах-инкубаторах, устанавливаемых в реках. Патент на полезную модель № 99688. Заявка № 2010124239, приоритет от 16 июня 2010 г. 2010. 4 с.

Смирнов Ю. А. Лосось Онежского озера. Биология, воспроизводство, использование. Л.: Наука, 1971. 141 с.

Тихий М. И. О разведении лососевых в грунте // Известия отдела прикладной ихтиологии и научно-промысловых исследований. 1925. Т. III, вып. 2, С. 125–133.

Щуров И. Л. Экологические аспекты поведения заводской молоди атлантического лосося в речных условиях: автореф. ... канд. биол. наук. КарНЦ АН СССР, 1990. 25 с.

Bams R. A. Comparison of Three Instream Incubation Techniques for Coho Salmon // North American Journal of Fisheries Management. 1985. N 5. P. 159–172.

Der Lachs kehrt zurück. Stand der Wiederansiedlung in Rheinland-Pfalz / Redaktion: *Brenner T., Schneider J.* (BFS). Ministerium für Umwelt und Forsten Rheinland-Pfalz (MUF). 2005. Mainz. 63 s.

Donaghy M. J., Verspoor E. A New Design of Instream Incubator for Planting Out and Monitoring Atlantic salmon Eggs // North American Journal of Fisheries Management. 2000. N 20. P. 521–527.

Harshbarger T. J., Porter P. E. Survival of Brown Trout Eggs: Two Planting Techniques Compared // The Progressive Fish-Culturist. 1979. Vol. 41, N 4. P. 206–209.

Harshbarger T. J., Porter P. E. Embryo Survival and Fry Emergence from Two Methods of Planting Brown Trout Eggs // North American Journal of Fisheries Management. 1982. N 2. P. 84–89.

Lippeaue. Eine Flusslandschaft im Wandel. Arbeitsgemeinschaft Biologischer Umweltschutz im Kreis Soest e.V. (ABU). 2009. 47 s.

Phillips R. W., Koski K. V. A fry trap method for estimating salmonid survival from egg deposition to fry emergence // Journal of the Fisheries Research Board of Canada. 1969. N 26. P. 133–141.

Rubin J.-F. Estimating the success of natural spawning of salmonids in streams // Journal of Fish Biology. 1995. N 46. P. 603–622.

Scrivener J. C. Two Devices to Assess Incubation Survival and Emergence of Salmonid Fry in an Estuary Streambed // North American Journal of Fisheries Management. 1988. N 8. P. 248–258.

Veselov A. Je., Kazakov R. V., Sysoyeva M. I., Bahmet I. N. Ontogenesis of reotactic and optomotor responses of juvenile Atlantic salmon // Aquaculture. 1998. Vol. 168. P. 17–26.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Веселов Алексей Елпидифорович
главный научный сотрудник, д.б.н., профессор
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: veselov@krc.karelia.ru
тел. (8142) 767812

Veselov, Alexey
Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: veselov@krc.karelia.ru
tel. (8142) 767812

Павлов Дмитрий Сергеевич
директор ИПЭЭ РАН, академик РАН
Институт проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова РАН
Ленинский пр., 33, Москва, Россия, 119071
эл. почта: pavlov@sevin.ru
тел. (495) 9522088

Pavlov, Dmitry
Institute of Ecology and Evolution,
Russian Academy of Science
Leninsky pr., 33, 119071, Moscow, Russia
e-mail: pavlov@sevin.ru
tel. (495) 9522088

Скоробогатов Михаил Александрович
ведущий научный сотрудник, д.т.н., профессор
Институт проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова РАН
Ленинский пр., 33, Москва, Россия, 119071
эл. почта: skorobogatov1@rambler.ru
тел. (495) 9522088

Skorobogatov, Mikhail
Institute of Ecology and Evolution,
Russian Academy of Science
Leninsky pr., 33, 119071, Moscow, Russia
e-mail: skorobogatov1@rambler.ru
tel. (495) 9522088

Ефремов Денис Александрович
ведущий биолог, аспирант
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: denisefremov@list.ru
тел. (8142) 769810

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

Белякова Елена Николаевна
аспирант
Петрозаводский государственный университет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: belyakovalena@yandex.ru
тел. (8142)781741

Belyakova, Elena
Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: belyakovalena@yandex.ru
tel. (8142)781741

Потапов Кирилл Юрьевич
аспирант
Петрозаводский государственный университет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: liricman@gmail.com
тел. (8142)781741

Potapov, Kirill
Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: liricman@gmail.com
tel. (8142)781741

Труды Карельского научного центра РАН
№ 3. 2011. С. 39–44.

УДК 546.48 : [633.491 : 632.651]

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ИОНОВ КАДМИЯ НА ВЫЛУПЛЕНИЕ ЛИЧИНОК КАРТОФЕЛЬНОЙ ЦИСТООБРАЗУЮЩЕЙ НЕМАТОДЫ

Л. И. Груздева, Е. М. Матвеева, А. А. Сущук

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Экспериментально изучено влияние кадмия на становление паразито-хозяинных отношений, в частности на процесс вылупления инвазионных личинок картофельной цистообразующей нематоды. Апробирован метод использования логистической модели, позволяющей выявлять влияние исследуемых веществ на все стадии процесса вылупления картофельной нематоды. Показано, что ионы кадмия ускоряют наступление периода активного вылупления личинок: в контроле 50% личинок, находящихся в цисте, вылупилось к 18 дню, в опытных вариантах – к 14 дню эксперимента. Сжатие во времени стадии активного вылупления личинок дает паразиту преимущество ускоренного проникновения в корни картофеля и способствует увеличению степени зараженности растений на загрязненных кадмием картофельных полях.

Ключевые слова: кадмий, картофельная цистообразующая нематода, вылупление.

L. I. Gruzdeva, E. M. Matveeva, A. A. Suschuk. EXPERIMENTAL STUDY OF EFFECTS OF CADMIUM IONS ON THE HATCHING PROCESS OF POTATO CYST NEMATODE LARVAE

The effect of cadmium on the establishment of host-parasite interactions, particularly, on the hatching of potato cyst nematode invasive juveniles was experimentally studied. Application of a logistic model allowed us to reveal the influence of the tested substances at all stages of the nematode hatching process. It was shown that cadmium ions speeded up the period of the most active juvenile emergence from cysts. In the control 50% of juveniles hatched by the 18th day, in the experiment they emerged early (by the 14th day). The parasite benefited from the shortening of this stage as it could sooner penetrate the host roots and raise the infestation level of the plants in the cadmium-contaminated fields.

Key words: cadmium, potato cyst forming nematode, juvenile hatching.

Введение

Одним из примеров влияния человека на естественные природные сообщества служит создание условий для широкого распространения патогенных организмов. Для Карелии таким инвазийным видом является картофельная цистообразующая нематода *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Behrens, 1975 – опасный вредитель картофеля. В настоящее время картофельная нематода (КЦН) отмечена в большинстве областей европейской части России. Несмотря на карантинные ограничения, этот паразит имеет тенденцию к прогрес-

сирующему распространению в зонах России, где выращивается картофель. В Республике Карелия она была выявлена впервые на приусадебных участках в 1976 г. [Соловьева и др., 1980]. За более чем 30 лет картофельная нематода продвинулась далеко на север, граница ее ареала от 62° достигла 67° с.ш. [Груздева, Матвеева, 2010].

Картофельная нематода является облигатным седентарным эндопаразитом корневой системы растений картофеля. Как узкоспециализированный паразит она характеризуется почти абсолютной зависимостью от растения-хозяина для прохождения жизненного цикла, который начинается с процесса вылупления личинок нематоды, их проникновения в корни картофеля, дальнейшего развития через ряд личиночных стадий до фазы самок, их оплодотворения и превращения в цисты. Последние, находясь в почве, являются стацией переживания неблагоприятных условий для вновь сформированных личинок нематоды. Массовый выход личинок из цист на начальном этапе становления паразитохозяинных отношений возможен только после стимуляции корневыми выделениями хозяина во время активного роста придаточных корней растений картофеля. В отсутствие культуры цисты могут сохранять жизнеспособность в течение длительного времени (10–15 лет), что является адаптивной стратегией паразита к переживанию неблагоприятных условий среды, которая осуществляется через облигатную и факультативную диапаузы.

Исследования по изучению фауны почвенных нематод картофельных полей Республики Карелия показали высокую численность инвазионных личинок нематоды в загрязненных тяжелыми металлами почвах [Груздева, Сущук, 2008]. Повышенное содержание тяжелых металлов (ТМ) в почве может быть обусловлено как естественными причинами (особенности геологического строения подстилающих пород), так и техногенным загрязнением среды. Примером естественного повышенного фона ТМ может служить о. Кижи. Почвы острова сформированы на шунгитовой морене и флювиогляциальных отложениях (озовые гряды), которые благодаря шунгитам и диабазам обогащены *Co*, *Ni*, *Cd*, *Cr*, *Zn*, *Pb*, *Cu* и другими микроэлементами [Морозова, 2005]. Исследования почв индивидуальных участков, расположенных вдоль авто- и железнодорожных магистралей на территории г. Петрозаводска, показали наличие в них широкого спектра металлов-загрязнителей: *Pb*, *Ni*, *Co*, *Zn*, *Mn*. Анализ золы сельскохозяйственных культур, выращенных на огородных участках в черте города, выявил значительные количества в них *Ni, Pb, Mn, Cr, Co, Zn, Sr* [Федорец, Медведева, 2005].

По рекомендации ЮНЕП (Программа ООН по окружающей среде) в программы мониторинга включены *Hg*, *Pb*, *Cd* как опасные для теплокровных организмов. Наиболее сильными фитотоксикантами считают: *Cd>Ni>Cu>Zn>Cr>Pb* (ряд по убыванию токсичности) [Лазарева, 1992]. В обобщенном виде ряд токсичности металлов для микроорганизмов выглядит следующим образом: *Hg>Ag>Cd>Pb>Cu>Co>Ni>Zn* [Евдокимова и др., 1984].

Цель исследования – выявление роли тяжелых металлов в становлении паразито-хозяинных отношений и возможного механизма влияния техногенного загрязнения на уровень паразитарной инвазии на примере изучения процесса вылупления личинок картофельной нематоды в присутствии ионов кадмия. Работа такого плана проводится в России впервые.

Материалы и методы

Цисты *Globodera rostochiensis* Woll, патотип Ro1, были размножены в лабораторных условиях при заражении восприимчивого к нематоде сорта картофеля Невский и хранились в сухом песке при 4°С. Жизнеспособность яиц и личинок нематоды составила 92 %.

Влияние ионов кадмия на вылупление инвазионных личинок нематоды исследовали в лабораторных условиях с использованием сульфата кадмия $CdSO_4$. Концентрации соли подбирали опытным путем на модельных видах свободноживущих нематод. Использовали концентрации соли *Cd* – 1,5; 3 и 6 мг/л. Контроль – корневые диффузаты (КД) восприимчивого сорта картофеля как естественный фактор вылупления паразитической нематоды (контроль 1, КД) и дистиллированная вода (контроль 2, ДВ). В опыте применяли как чистые водные растворы *Cd,* так и смеси с КД в соотношении 1:1.

Процесс вылупления личинок изучали в дисках из органического стекла с лунками диаметром 20 мм и емкостью 1,5 мл, в которые вставлялись капроновые сетки с диаметром ячеек 0,18 мм. Цисты помещали в исследуемые растворы на глубину 1 мм. Диски выдерживали во влажной камере при комнатной температуре [Мяги, 1974]. Количество вылупившихся личинок определяли на часовом стекле под бинокуляром с интервалом в три дня.

Корневые диффузаты картофеля получали следующим способом: картофель выращивали в песчаной культуре 3 недели, затем начинали собирать КД с вегетирующих растений 1 раз в неделю в течение 5 недель. Для этого сосуды с растениями обильно поливали водой (пока вода не появится в поддоне), добавляли еще 50 мл воды и КД уже собирали в отдельный стакан [Matveeva,

2001]. Полученные таким образом КД хранили в закрытых стеклянных бутылках при 4°С.

В каждом варианте (из 8 в опыте) использовали по 1 цисте в 10-кратной повторности. Продолжительность эксперимента составила 38 дней. После этого цисты были вскрыты, количество невылупившихся личинок и яиц было подсчитано для определения максимального процента вылупления.

Результаты эксперимента обработаны статистически с использованием пакета программ Statistica 5 и сопоставлены с логистической (математической) моделью $y = c/(1+\exp(-b \times (t - m)))$, где y – общий процент вылупления, t – время. Модель описывается тремя параметрами: время, когда вылупилось 50 % личинок, находящихся в цисте (*m*), темп (скорость) вылупления (*b*) и максимальный процент вылупившихся личинок (*c*) [Oude Voshaar, 1994, цит. по: Wesemael et al., 2006].

Результаты

Массовый выход личинок из цист наблюдался в корневых диффузатах картофеля (табл. 1). Добавление ионов кадмия не влияло на начало процесса вылупления, выход личинок из цист происходил одновременно в контроле 1, КД и опытных вариантах, однако к концу эксперимента в опытных вариантах отмечено снижение численности вылупившихся личинок. При этом более высокая (6 мг/л) концентрация ионов кадмия увеличивала выход личинок из цист по сравнению с другими исследованными концентрациями *Cd*.

Таблица 1. Вылупление личинок КЦН в растворах, содержащих корневые диффузаты и ионы кадмия

Вариант опыта	Начало вылупления, дни	Общая численность вылупившихся личинок	
		в абсолютных цифрах	в % к контролю
Контроль 1, КД	7	218±20,24	100
КД + 1,5 *Cd*	7	160±46,45	73,4
КД + 3 *Cd*	7	110±39,54*	50,5
КД + 6 *Cd*	7	198±51,22	90,8

* Здесь и в табл. 3 различия между вариантами опыта и контролем статистически достоверны (P < 0,05).

Сопоставляя данные по динамике вылупления личинок с логистической моделью, получили значения параметров модели (табл. 2) и эмпирическую кривую, характеризующую ход процесса вылупления личинок при наличии ионов кадмия (рис. 1).

Во всех вариантах эксперимента максимальный процент вылупившихся личинок составил 57–61 от общего количества яиц и личинок, содержащихся в цистах, скорость процесса вылупления была выше в вариантах с ионами кадмия, что сказывалось на значении *m*. В контроле 1, КД период активного выхода личинок из цист, когда вылупляется более 50 % личинок нематод, наблюдался к 18 дню эксперимента. Соли кадмия ускоряли этот процесс на 4–5 дней по сравнению с контролем (см. рис. 1, табл. 2).

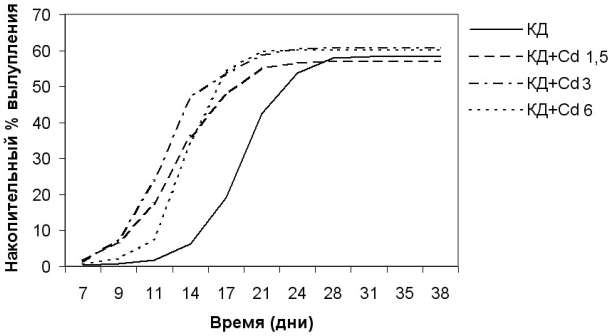


Рис. 1. Эмпирическая кривая, показывающая ожидаемый процент вылупления личинок нематоды в корневых диффузатах картофеля при наличии ионов кадмия

Таблица 2. Параметры логистической модели, описывающей процесс вылупления инвазионных личинок в присутствии корневых диффузатов картофеля и ионов кадмия

Вариант опыта	m, дни	b	c, %	R^2
Контроль 1, КД	18,6±1,08[a]	0,57±0,06[a]	58,8±3,14[a]	0,930
КД + 1,5 *Cd*	13,4±1,17[b]	0,64±0,07[ab]	57,0±10,8[a]	0,933
КД + 3 *Cd*	13,5±1,50[b]	0,86±0,11[b]	60,7±16,0[a]	0,945
КД + 6 *Cd*	13,6±0,40[b]	0,80±0,09[b]	60,4±13,9[a]	0,966

Примечания. Здесь и в табл. 4: логистическая (математическая) модель описывается уравнением $y = c/(1+\exp(-b \cdot (t - m)))$. КД – корневые диффузаты картофеля; 1,5, 3 и 6 *Cd* – концентрации ионов кадмия, мг/л. Параметр *m* – время в днях, когда достигнуто 50% вылупление личинок, содержащихся внутри цист, *b* – темп, или скорость процесса вылупления и *c* – максимальный процент вылупившихся личинок, R^2 – коэффициент детерминированности. Значения, имеющие разные буквенные обозначения, статистически достоверны (P < 0,05).

Исследование влияния ионов кадмия на процесс вылупления личинок КЦН в эксперименте без корневых диффузатов растения-хозяина как естественного фактора вылупления картофельной нематоды показало, что изученные концентрации кадмия стимулировали выход личинок из цист (табл. 3); численность личинок значительно превышала таковую в дистиллированной воде (контроль 2, ДВ).

Таблица 3. Вылупление личинок КЦН в дистиллированной воде и растворах соли кадмия различных концентраций

Вариант опыта	Начало вылупления, дни	Общая численность вылупившихся личинок	
		в абсолютных цифрах	в % к контролю
Контроль 2, ДВ	11	12±4,01	100
1,5 *Cd*	9	22±5,28	183,3
3 *Cd*	10	30±5,34*	248,6
6 *Cd*	9	31±13,5*	256,9

Параметры *m* и *b* логистической модели процесса вылупления личинок картофельной нематоды под воздействием ионов кадмия и без корневых диффузатов картофеля не различались между вариантами опыта, за исключением значений максимального процента вылупившихся личинок *c*, который был выше в вариантах с ионами кадмия (рис. 2, табл. 4).

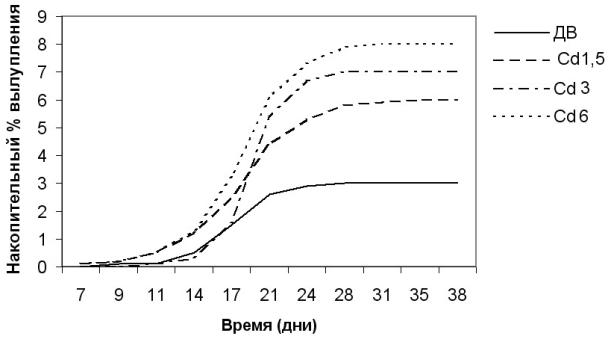


Рис. 2. Эмпирическая кривая, показывающая ожидаемый процент вылупления личинок нематоды в дистиллированной воде и растворах соли кадмия различных концентраций

Таблица 4. Параметры логистической модели, описывающей процесс вылупления инвазионных личинок без корневого диффузата в присутствии дистиллированной воды и ионов кадмия

Вариант опыта	m, дни	b	c, %	R^2
Контроль 2, ДВ	18±0,75[a]	0,41±0,02[a]	3,4±0,91[a]	0,981
1,5 *Cd*	18±0,42[a]	0,37±0,02[a]	6,9±1,22[b]	0,995
3 *Cd*	21±0,96[a]	0,49±0,06[a]	9,3±1,47[b]	0,988
6 *Cd*	21±1,20[a]	0,37±0,01[a]	6,0±1,01[b]	0,992

В целом изученные концентрации соли кадмия при наличии или отсутствии корневых диффузатов растения-хозяина показали стимулирующий эффект на процесс вылупления картофельной нематоды.

Обсуждение

Реальность настоящего времени такова, что наблюдается усиливающееся негативное воздействие человека на природу. Это проявляется в загрязнении почвы тяжелыми металлами, которые включаются в почвенные трофические цепи, а затем проникают и в растения, оказывая отрицательное влияние на их жизнедеятельность [Титов и др., 2007].

Изучение фауны почвенных нематод трансформированных биоценозов показало, что при загрязнении почвы тяжелыми металлами увеличивается количество паразитических нематод растений [Хотько и др., 1982; Yeates et al., 1994; Georgieva et al., 2002; Sánchez-Moreno, Navas, 2007; Pen-Mouratov et al., 2008; Сущук и др., 2008; Matveeva et al., 2010; Suschuk, Gruzdeva, 2010].

Экспериментальные исследования в лабораторных, а ранее и в полевых условиях позволили установить связь между такими факторами, как загрязнение почвы тяжелыми металлами и ее инфицированность КЦН. Так, в пахотных почвах Кижи в условиях монокультуры картофеля отмечена высокая численность нематоды, степень зараженности почвы колебалась от 10 до 214 цист глободеры на 100 г почвы [Груздева, Сущук, 2008]. Определение концентрации ТМ в почве агроценозов показало, что при высоком заражении почвы КЦН (214 цист/100 г почвы) содержание *Cd*, *Zn*, *Mn*, *Ni* больше фонового уровня по Карелии [Федорец и др., 2007].

Пусковым моментом развития нематоды и начальным этапом становления паразито-хозяинных отношений является процесс вылупления, включающий в себя стимуляцию корневыми выделениями картофеля находящихся внутри цист яиц и личинок, выход личинок из цист, нахождение ими хозяина и проникновение в корни растения. При разработке видоспецифичных методов регуляции численности картофельной нематоды необходимо выявить как оптимальные, так и экстремальные условия для развития фитопаразита на всех стадиях жизненного цикла. Проведены исследования механизма вылупления инвазионных личинок как стартового процесса развития нематоды [Perry, 1986, 1998; Jones et al., 1998], химического состава корневых диффузатов картофеля [Evans, 1983; Perry, 1989], облигатной и факультативной диапауз, позволяющих паразиту переживать неблагоприятные условия среды [Antoniou, 1989; Jones et al., 1998]. Проводятся поиск веществ и оценка эффективности способов, регулирующих численность нематоды, в том числе и в ходе процесса вылупления глободеры [Тимофеев, Понин, 1973; Груздева и др., 1999; 2010; Матвеева, Груздева, 1999; Matveeva et al., 2002].

Для вылупления личинок картофельной нематоды, кроме абиотических условий (температура, влажность и др.), необходимы специфические стимуляторы. Без них большинство личинок годами сохраняют жизнеспособность, находясь в неактивном состоянии. В отсутствие естественного фактора вылупления – корневых диффузатов картофеля – дистиллированная вода и ионы кадмия не прерывали диапаузу, в которой находились личинки в цисте, и наблюдалось лишь небольшое спонтанное вылупление нематоды (см. табл. 3), однако растворы соли кадмия более активно стимулировали вылупление нематоды, чем дистиллированная вода.

Известно, что для картофельной нематоды как узкоспециализированного эндопаразита корневые диффузаты картофеля являются наи-

более активными стимуляторами [Мяги, 1973; Evans, 1983; Матвеева, Груздева, 1999; Matveeva et al., 2002]. В настоящей работе самая высокая численность вылупившихся личинок также наблюдалась в варианте с корневыми диффузатами картофеля (см. табл. 1). Первичные данные эксперимента создают впечатление, что исследованные дозы *Cd* не оказывают сильного воздействия на процесс вылупления. Начало вылупления происходит одновременно в контроле и опытных вариантах. Вместе с тем использование логистической модели показало, что добавление ионов кадмия активизировало процесс вылупления, особенно на начальных этапах. Скорость процесса вылупления была выше в вариантах с ионами кадмия, что сказывалось на значении *m* (время в днях, когда наблюдается выход 50% от общего числа личинок, находящихся в цисте); оно значительно сокращалось в опытных вариантах по сравнению с контролем (см. рис. 1, табл. 2). Это создает возможность более раннего проникновения инвазионных личинок в корни картофеля при выращивании на почвах с повышенным содержанием кадмия, что увеличивает зараженность растения-хозяина. Установление данного факта имеет значение для практики возделывания картофеля на участках в черте города и вызывает необходимость предупреждения владельцев об опасности снижения продуктивности растений на загрязненных тяжелыми металлами почвах.

Выводы

Оценена роль ионов кадмия в становлении паразито-хозяинных отношений между картофелем и картофельной цистообразующей нематодой: они стимулируют более ранний выход личинок из цист.

Определено влияние техногенного загрязнения на уровень паразитарной инвазии: более раннее вылупление личинок нематоды из цист в загрязненной кадмием почве дает им преимущество во времени для проникновения в корни растения картофеля.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований ОБН РАН «Биологические ресурсы России: оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга» № 01200955238 и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» № П 1299.

Литература

Груздева Л. И., Матвеева Е. М. Расширение ареала картофельной цистообразующей нематоды на Северо-Западе России // Труды Центра паразитологии. Т. XLVI: Биоразнообразие и экология паразитов. М.: Наука, 2010. С. 71–80.

Груздева Л. И., Матвеева Е. М., Коваленко Т. Е., Лай Г. Н. О регуляции численности картофельной нематоды в агроценозах Карелии // Вестник РАСХН. 1999, вып. 2. С. 41–44.

Груздева Л. И., Матвеева Е. М., Коваленко Т. Е., Сущук А. А. Нематоды как индикаторы состояния и степени изменений почвенной экосистемы в условиях Северо-Запада России // Успехи совр. биол. 2010. Т. 130, № 1. С. 100–112.

Груздева Л. И., Сущук А. А. Влияние степени зараженности почвы картофельной цистообразующей нематодой на структуру сообществ почвенных нематод // Паразитология. СПб: Наука, 2008. Т. 42, № 6. С. 510–516.

Евдокимова Г. А., Кислых Е. Е., Мозгова Н. П. Биологическая активность почв в условиях аэротехногенного загрязнения на Крайнем Севере. Л.: Наука, 1984. 120 с.

Лазарева И. П. К вопросу о химическом загрязнении почв // Почвенные ресурсы Карелии, их рациональное использование и охрана (экологические проблемы). Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 1992. С. 102–131.

Матвеева Е. М., Груздева Л. И. Влияние коры хвойных деревьев на вылупление личинок картофельной нематоды // Вестник РАСХН. 1999, вып. 3. С. 34–36.

Морозова Р. М. К вопросу о загрязнении почв острова Кижи тяжелыми металлами // 10 лет экологическому мониторингу музея-заповедника «Кижи». Итоги, проблемы, перспективы (мат-лы науч.-практ. семинара). Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 2005. С. 66–75.

Мяги Э. А. Совместное действие специфического стимулятора с корневыми выделениями различных растений на вылупление личинок картофельной нематоды // Борьба с картофельной нематодой: мат-лы Всесоюзн. симпозиума. Тарту. 1973. С. 60–62.

Мяги Э. А. Влияние некоторых биотических и абиотических факторов на вылупление личинок (*Heterodera rostochiensis* Woll.). Тарту, 1974. 157 с.

Соловьева Г. И., Потаевич Е. В., Кучко Л. А., Васильева А. П. Цистообразующая картофельная нематода и меры борьбы с ней. Петрозаводск: Карелия, 1980. 24 с.

Сущук А. А., Груздева Л. И., Иешко Е. П. Воздействие тяжелых металлов на фитопаразитических нематод // Тр. Карельского научного центра РАН. Биогеография. Современные проблемы паразитологии. Вып. 13. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2008. С. 84–88.

Тимофеев Н. Н., Понин И. Я. Снижение плотности популяции картофельной нематоды при внесении микродоз пикролоновой кислоты под кормовые травы // Борьба с картофельной нематодой: мат-лы Всесоюзн. симпозиума. Тарту, 1973. С. 63.

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

Федорец Н. Г., Медведева М. В. Эколого-микробиологическая оценка состояния почв города Пет-

розаводска. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2005. 96 с.

Федорец Н. Г., Ткаченко Ю. Н., Ласточкина В. Г. и др. Содержание тяжелых металлов в почвах и растениях с огородов о. Кижи // Бюл. экологических исследований на территории Государственного музея-заповедника «Кижи», 2006 г. Петрозаводск: издательский центр музея-заповедника «Кижи». 2007. С. 17–25.

Хотько Э. И., Ветрова С. Н., Матвеенко А. А., Чумаков Л. С. Почвенные беспозвоночные и промышленное загрязнение. Минск: Наука и техника, 1982. 264 с.

Antoniou M. Arrested development in plant-parasitic nematodes // Helminthological Abstracts. Series B. 1989. Vol. 58. P. 1–19.

Evans K. Hatching of potato cyst nematodes in root diffusates collected from twenty-five potato cultivars // Crop protection. 1983. 2 (1). P. 97–103.

Georgieva S. S., McGrath S. P., Hooper D. J., Chambers B. S. Nematode communities under stress: the long-term effects of heavy metals in soil treated with sewage sludge // Applied Soil Ecology. 2002. Vol. 20. P. 27–42.

Jones P. W., Tylka G. L., Perry R. N. Hatching // Perry R. N. & Wright D. J. (eds). The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes. CAB International, Wallingford, UK. 1998. P. 181–202.

Matveeva E. M. Evaluation of a test for choice of potato cultivars with resistance to *Globodera pallida.* Master of Science in Nematology thesis. University of Gent. 2001. 91 p.

Matveeva E., Gruzdeva L., Kovalenko T. Potato cyst nematode control by wastes of logging and wood industry // The alternative control methods against plant pests and diseases. Lille, 2002. P. 162–169.

Matveeva E. M., Gruzdeva L. I., Suschuk A. A. Hatching of potato cyst nematode Globodera rostochiensis in host root leachates under different invasion conditions // Aspects of Applied Biology 103, 3rd Symposium on Potato Cyst Nematodes. UK, 2010. P. 35–43.

Pen-Mouratov S., Shukurov N., Steinberger Y. Influence of industrial heavy metal pollution on soil free-living nematode population // Environmental Pollution. 2008. Vol. 152. P. 172–183.

Perry R. N. Physiology of hatching. // Lamberti F. & Taylor C. E. (eds). Cyst Nematodes. New York & London: Plenum Press, 1986. P. 119–131.

Perry R. N. Root diffusate and hatching factors // Aspects of Applied Biology. 1989. Vol. 22. P. 121–128.

Perry R. N. The physiology and sensory perception of potato cyst nematode, *Globodera* species // Marks R. J. & Brodie B. B. (eds). Potato cyst nematodes. Biology, Distribution and Control. CAB International, Wallingford, UK. 1998. P. 27–49.

Sánchez-Moreno S., Navas A. Nematode diversity and food web condition in heavy metal polluted soils in a river basin in southern Spain // European J. Soil Biol. 2007. Vol. 43. P. 166–179.

Suschuk A. A., Gruzdeva L. I. Soil nematode communities under heavy metal pollution // Abstracts of 30th International Symposium of the European Society of Nematologists. Vienna, September 19–23, 2010. P. 128.

Wesemael W. M. L., Perry R. N., Moens M. The influence of root diffusate and host age on hatching of the root-knot nematodes, *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax* // Nematology. 2006. Vol. 8 (6). P. 895–902.

Yeates G. W., Orchard V. A., Speir T. W. et al. Impact of pasture contamination by copper, chromium, arsenic timber preservative on soil biological activity // Biol. Fertil. Soils. 1994. Vol. 18. P. 200–208.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Груздева Людмила Ивановна
ведущий научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: gruzdeva@krc.karelia.ru
тел. (8142) 762706

Матвеева Елизавета Михайловна
старший научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: matveeva@krc.karelia.ru
тел. (8142) 783622

Сущук Анна Алексеевна
младший научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: anna_sushchuk@mail.ru
тел. (8142) 762706

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

Matveeva, Elizaveta
Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: matveeva@krc.karelia.ru
tel. (8142) 783622

Suschuk, Anna
Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: anna_sushchuk@mail.ru
tel. (8142) 762706

Труды Карельского научного центра РАН
№ 3. 2011. С. 45–48.

УДК [58.036:581.08.132]:582,739

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ПОЧВЫ НА НЕТТО-ФОТОСИНТЕЗ КУЛЬТУРЫ ТЕПЛИЧНОГО ОГУРЦА

С. Н. Дроздов, Е. С. Холопцева, Э. Г. Попов

Институт биологии Карельского научного центра РАН

В регулируемых условиях среды в четырехфакторном планируемом эксперименте изучено влияние температуры почвы на нетто-фотосинтез интактных растений огурца в фазу четвертого настоящего листа в зависимости от интенсивности света и температуры воздуха, содержания в нем углекислоты. Показано ее влияние на видимый фотосинтез растений, особенно в зоне повышенных температур воздуха и низкой освещенности. Для рассады огурца с. Алма-Атинский 1 максимум нетто-фотосинтеза достигается при отрицательном температурном градиенте почва / воздух 23/38°С, освещенности 25,5 клк и 0,27% содержании CO_2 в воздухе.

Ключевые слова: *Cucumis sativus* L., интактное растение, нетто-фотосинтез, температура почвы, многофакторный эксперимент.

S. N. Drozdov, E. S. Kholoptseva, E. G. Popov. EFFECTS OF SOIL TEMPERATURE ON NET PHOTOSYNTHESIS IN PLANTS

The effect of soil temperature on net photosynthesis in intact cucumber plants at the phase with the fourth true leaf was investigated in a pre-planned four-factor experiment under a controlled environment and in relation with light intensity, air temperature and carbonic acid content. The soil temperature was shown to affect apparent photosynthesis in the plants, especially at high air temperature and low light intensity. Net photosynthesis in cucumber seedlings of the Alma-Atinsky 1 variety peaked at a negative soil/air temperature gradient of 23/38°, when illuminance was 25.5 klux and CO_2 content in the air was about 0.27%.

Key words: Cucumis sativus L., intact plants, net photosynthesis, soil temperature, multifactor pre-planned experiment.

Введение

Установление наряду с поглотительной способностью корня его синтетической функции [Рубин, 1956] повысило интерес исследователей к влиянию температуры почвы на различные стороны жизнедеятельности растений [Коровин, 1961; Радченко, 1966], в том числе и на их CO_2-обмен [Лубнин, Метлякова, 1976; Курец и др., 2003; Дроздов и др., 2008]. Вместе с тем в связи со сложной взаимозависимостью биологических процессов, метеорологических факторов и продолжительностью их действия многие вопросы их влияния, в частности, на фотосинтез растений далеко не выяснены. При этом наиболее актуально изучение влияния температуры почвы у культур защищенного грунта, где факторы внешней среды поддаются регулированию.

Задачей настоящей работы было изучение влияния температуры почвы на нетто-фотосинтез интактных растений огурца на ранних фа-

зах его развития в зависимости от интенсивности освещенности, температуры воздуха и содержания в нем CO_2.

Материалы и методы

Опыты проводили с растениями огурца (*Cucumis sativus* L.) раннеспелого с. Алма-Атинский 1, выведенного для теплиц преимущественно с солнечным обогревом. Растения выращивали по одному в сосуде объемом 0,5 л на песчаной культуре в факторостатных условиях [Дроздов, Курец, 2003]. В возрасте 22–23 суток (в фазе 4-х настоящих листьев) сосуды с растениями поочередно помещали в герметический бокс установки для исследования газообмена с регулированием концентрации углекислоты в воздухе, освещенности и температуры воздуха и почвы [Таланов и др., 1982], где проводили четырехфакторный эксперимент по плану Бокса-Бенкера (табл. 1). Экспозиция в каждой точке плана составляла 30–40 мин и определялась выходом CO_2-обмена на стационарный уровень. Диапазон варьирования факторов в эксперименте выбирался на основании литературных данных в пределах зоны оптимума [Дроздов и др., 1981; Попов, 1986].

Таблица 1. План четырехфакторного эксперимента и интенсивность нетто-фотосинтеза растений огурца с. Алма-Атинский 1 в фазу 4-х листьев

№	E, клк	CO_2, % об.	Тв, °С	Тп, °С	PN, мг CO_2/г · ч
1	23	0,06	26,5	22	26,64
2	5	0,06	26,5	22	8,72
3	23	0,3	26,5	22	38,56
4	5	0,3	26,5	22	29,21
5	14	0,18	38	14	25,76
6	14	0,18	15	14	21,84
7	14	0,18	38	30	22,72
8	14	0,18	15	30	16,83
9	14	0,18	26,5	14	24,96
10	5	0,18	26,5	14	15,04
11	23	0,18	26,5	14	30,88
12	5	0,18	26,5	30	13,76
13	23	0,18	26,5	30	27,04
14	14	0,06	15	22	16,42
15	14	0,3	15	22	29,04
16	14	0,06	38	22	17,04
17	14	0,3	38	22	35,44
18	14	0,18	26,5	22	24,96
19	14	0,06	26,5	14	17,92
20	14	0,3	26,5	14	32,64
21	14	0,06	26,5	30	13,04
22	14	0,3	26,5	30	28,08
23	5	0,18	15	22	18,01
24	23	0,18	15	22	27,21
25	5	0,18	38	22	18,42
26	23	0,18	38	22	36,64
27	14	0,18	26,5	22	27,23

Примечание. Здесь и в табл. 2: E – интенсивность освещенности, CO_2 – концентрация углекислого газа в воздухе, Тв – температура воздуха, Тп – температура почвы, PN – интенсивность нетто-фотосинтеза.

Результаты и обсуждение

Обработка полученных данных методом множественного регрессионного анализа определила численные коэффициенты уравнений количественной зависимости CO_2-обмена от переменных факторов опыта – модели их влияния на нетто-фотосинтез – в виде полинома второй степени:

$$PN = -20{,}87 + 0{,}9045 \cdot E + 67{,}744 \cdot C + 2{,}129 \cdot T_2 - 0{,}00553 \cdot E^2 - 1{,}9815 \cdot E \cdot C + 0{,}02184 \cdot E \cdot T_1 - 0{,}00889 \cdot E \cdot T_2 - 8{,}161 \cdot C^2 + 1{,}0437 \cdot C \cdot T_1 - 0{,}007918 \cdot T_1^2 + 0{,}00544 \cdot T_1 \cdot T_2 - 0{,}05428 \cdot T_2^2$$

где PN – нетто-фотосинтез, мг CO_2/г · ч;

E – освещенность, клк;

T_1, T_2 – температура, °С соответственно воздуха и почвы;

C – концентрация CO_2 в воздухе, %.

Статистическая оценка модели показала высокую степень ее адекватности по критерию Фишера ($F_{расч.} > F_{табл.}$) при уровне надежности $\alpha = 0{,}05$ и коэффициенту множественной детерминации $R_2 = 0{,}86$.

Анализ модели численными методами позволил определить потенциальный максимум нетто-фотосинтеза и соответствующие ему условия внешней среды, нижнюю границу зон оптимума по всем исследуемым факторам внешней среды (90% от потенциального максимума по Лархеру, 1978, что однозначно фоновой зоне, как показали исследования) [Дроздов, Курец, 2003], почвенные температурные кривые нетто-фотосинтеза в пределах опыта в зависимости от уровня освещенности, температуры воздуха и содержания в нем CO_2. Учитывая, что условия внешней среды, обеспечивающие максимум нетто-фотосинтеза растений, даже в пределах защищенного грунта, реализуются достаточно редко, более реальную экологическую характеристику экотипа (сорта) дают условия среды зоны оптимума [Дроздов, Курец, 2003]. У исследуемого сорта потенциальный максимум видимого фотосинтеза достигается при отрицательном температурном градиенте между воздухом и почвой, относительно низкой освещенности и повышенном содержании в воздухе углекислоты (табл. 2).

При естественном содержании CO_2 в воздухе (0,036 %) максимум нетто-фотосинтеза интактных растений огурца достигается в условиях более низкой освещенности (20 клк) и температур почвы и воздуха – +22° и +26°С соответственно (рис. 1, кривая 6). Понижение или повышение температуры почвы от максимума при оптимальной освещенности несколько снижает интенсивность видимого фотосинтеза (кривые 3, 6, 9). Уменьшение уровня освещенности усиливает их негативное влияние на нетто-фотосинтез, особенно при высоких темпе-

ратурах воздуха (кривые 1,4,7), что является в основном результатом повышения интенсивности дыхания, в значительной степени за счет роста составляющей дыхания поддержания [Хит, 1972; Дроздов и др., 2005]. Снижение освещенности (5–14 клк, кривые 1, 2, 4, 5, 7, 8), естественно, приводит к уменьшению интенсивности нетто-фотосинтеза со смещением его максимума в сторону пониженных температур как почвы, так и воздуха. Повышение температуры воздуха смещает максимум нетто-фотосинтеза в сторону более высоких температур почвы.

Увеличение до оптимального содержания в воздухе CO_2 (табл. 2) ведет к значительному возрастанию интенсивности нетто-фотосинтеза во всех случаях исследованных уровней освещенности, особенно в пределах зоны оптимума (рис. 2, кривые 3, 6, 9). При этом максимум нетто-фотосинтеза смещается в сторону более высоких температур почвы и воздуха. Потенциальный максимум достигается при более высоком уровне освещенности, что согласуется с литературными данными, свидетельствующими о зависимости эффективности углекислотной подкормки тепличной культуры огурца от освещенности [Bolhar-Narald, 1980]. Возрастание интенсивности освещенности выше 25 клк у огурца приводит к снижению видимого фотосинтеза, особенно за пределами фоновой зоны, что связано с появлением излишка энергии возбуждения [Головко и др., 2008], ведущей к фотоингибированию в ФС II [Карапетян, Бухов, 1986; Behera, Choundhury, 2002].

Таблица 2. Потенциально возможные максимум и оптимум нетто-фотосинтеза растений огурца с. Алма-Атинский 1 в фазу 4-х настоящих листьев и условия внешней среды, обеспечивающие их достижение

Максимум					Оптимум				
PN мг CO_2/г·ч	E, клк	Тв, °С	Тп, °С	CO_2, %	PN мг CO_2/г·ч	E, клк	Тв, °С	Тп, °С	CO_2, %
40,7	25,5	38,0	23,4	0,27	39,2	>22	>30	>17,2	>0,22

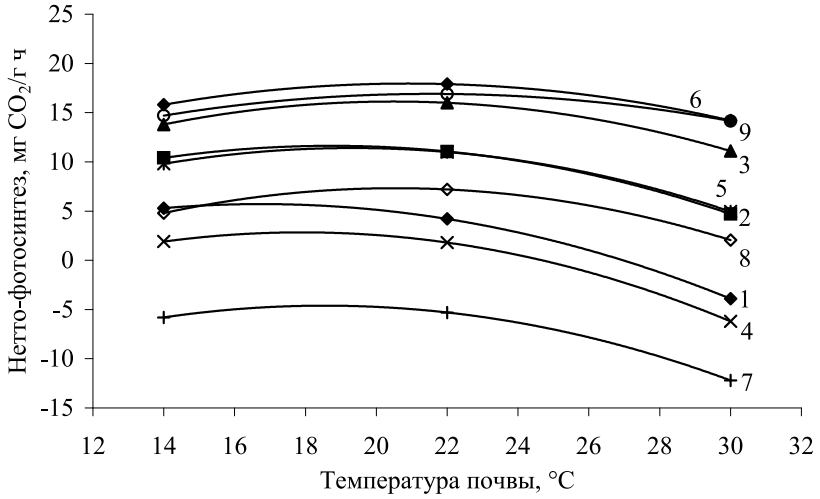


Рис. 1. Влияние температуры почвы на нетто-фотосинтез интактных растений огурца с. Алма-Атинский 1 в фазу 4-х настоящих листьев при естественном содержании в воздухе CO_2 (0,036%), освещенности и температуре воздуха соответственно

Усл. обозн. здесь и на рис. 2: 1 – 5 клк, 15°С; 2 – 14 клк, 15°С; 3 – 23 клк, 15°С; 4 – 5 клк, 26°С; 5 – 14 клк, 26 °С; 6 – 23 клк, 26°С; 7 – 5 клк, 38°С; 8 – 14 клк, 38°С; 9 – 23 клк, 38°С

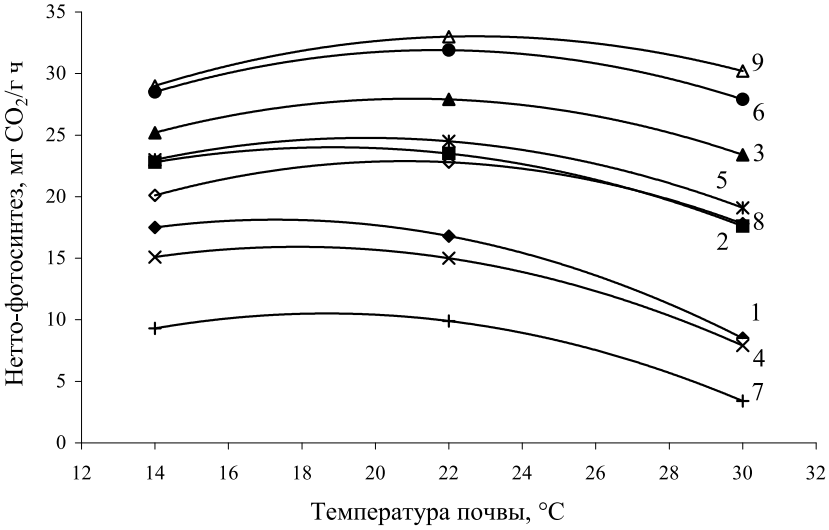


Рис. 2. Влияние температуры почвы на нетто-фотосинтез интактных растений огурца с. Алма-Атинский 1 в фазу 4-х настоящих листьев при повышенном содержании в воздухе CO_2 (0,3%), освещенности и температуре воздуха соответственно

Выводы

Таким образом, исследования показали влияние температуры почвы на нетто-фотосинтез интактных растений огурца, особенно при высокой температуре воздуха и низкой освещенности. Экстремальные температуры почвы, как низкие, так и высокие, усиливают негативное влияние высокой интенсивности света на нетто-фотосинтез. Для рассады огурца с. Алма-Атинский 1 максимум нетто-фотосинтеза достигается при отрицательном температурном градиенте почва / воздух – 23/38°С, освещенности 25,5 клк и 0,27% содержании CO_2 в воздухе.

Литература

Головко Т. К., Дымова О. В., Яцко Я. Н. и др. Пигментный аппарат растений: структура, функция, экофизиология // Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века: мат-лы Всерос. конф. Петрозаводск, 2008. Ч. 6. С. 34–37.

Дроздов С. Н., Курец В. К. Некоторые аспекты экологической физиологии растений. Петрозаводск, 2003. 170 с.

Дроздов С. Н., Попов Э. Г., Холопцева Е. С., Титов А. Ф. Изменение нетто-фотосинтеза растений люпина узколистного под влиянием температуры почвы // Докл. РАСХН. 2008. № 2. С. 19–20.

Дроздов С. Н., Сычева З. Ф., Попов Э. Г. и др. Роль дыхания в формировании терморезистентности растений // Физиология и биохимия растений. 2005. Т. 37, № 1. С. 73–78.

Дроздов С. Н., Титов А. Ф., Балагурова Н. И., Критенко С. П. О терморезистентности проростков огурца и градации температурной шкалы // Физиология растений. 1981. Т. 28, вып. 6. С. 1239–1244.

Карапетян Н. В., Бухов Н. Г. Переменная флуоресценция хлорофилла как показатель физиологического состояния растений // Физиология растений. 1986. Т. 33, вып. 5. С. 1013–1026.

Коровин А. И. Температура почвы и растение на Севере. Петрозаводск, 1961. 192 с.

Курец В. К., Дроздов С. Н., Попов Э. Г. и др. Температурный градиент воздух–почва как фактор оптимизации нетто-фотосинтеза интактных растений // Физиология растений. 2003. Т. 50, № 1. С. 81–87.

Лархер В. Экология растений. М.: Мир. 1978. 384 с.

Лубнин В. Ф., Метлякова А. Д. Влияние температуры корнеобитаемой среды в рассадный период на рост и продуктивность томата, капусты и огурца // Биологические основы овощеводства под пленкой в Восточной Сибири: Сб. трудов. Иркутск: СИФИБР, 1976. С. 11–28.

Попов Э. Г. Зависимость CO_2-газообмена огурца от условий внешней среды (на примере трех сортов) // Термоадаптация и продуктивность растений. Петрозаводск, Карельский филиал АН СССР. 1986. С. 102–109.

Радченко С. И. Температурные градиенты среды и растения. М.; Л.: Наука, 1966. 389 с.

Рубин Б. А. Физиология растений. М.: Советская наука, 1956. Ч. 2. 288 с.

Таланов А. В., Безденежный В. А., Хилков Н. И. Установка для исследования газообмена интактных растений // Влияние факторов внешней среды и физиологически активных веществ на терморезистентность и продуктивность растений. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР, 1982. С. 142–149.

Хит О. Фотосинтез (физиологические аспекты). М.: Мир, 1972. 312 с.

Behera R. K., Choundhury N. K. High irradiance induced pigment degradation and loss of photochemical activity of wheat chloroplasts // Biol. Plant. 2002. Vol. 45, N 1. P. 45–49.

Bolhar–Harald R. Anderungen im Wirkungsgrad der Photosyntese als Basis erohter Produktivitet // Ber. Dtsch. Bot. Ges. 1980. Vol. 93, N 2. P. 425–439.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Дроздов Станислав Николаевич
главный научный сотрудник, д.б.н., профессор
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: drozdov@krc.karelia.ru
тел. (8142) 762706

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

Холопцева Екатерина Станиславовна
старший научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: holop@krc.karelia.ru
тел. (8142) 762712

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

Попов Эдуард Григорьевич
к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
тел. (8142) 762706

Popov, Eduard
Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
tel. (8142) 762706

Труды Карельского научного центра РАН
№ 3. 2011. С. 49–56.

УДК 577.161.3:599

ТОКОФЕРОЛ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ АДАПТАЦИЯХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ РАЗЛИЧНОГО ЭКОГЕНЕЗА

Т. Н. Ильина, Т. Р. Руоколайнен, В. В. Белкин, И. В. Баишникова

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Исследована концентрация витамина Е (α-токоферол) в печени, почках, сердечной и скелетной мышцах 23 видов млекопитающих, которые обитают в природных условиях или разводятся в зоокультуре. У большинства видов наиболее высокое содержание токоферола обнаруживается в печени и почках. Выявлены существенные отличия в распределении и уровне токоферола, в том числе и у систематически близких видов, связанные, вероятно, с экологическими особенностями животных. Результаты позволяют рассматривать токоферол как один из факторов поддержания на стационарном уровне системы природных антиоксидантов.

Ключевые слова: токоферол, антиоксиданты, млекопитающие, виды, адаптация.

T. N. Ilyina, T. R. Ruokolaynen, V. V. Belkin, I. V. Baishnikova. TOCOPHEROL IN PHYSIOLOGICAL ADAPTATION OF MAMMALS WITH DIFFERENT ECOGENESIS

The vitamin E (α-tocopherol) concentration was investigated in liver, kidney, heart and skeletal tissues of 23 mammal species, some of them living in the wild and others farm-bred. In most of the species the tocopherol level was the highest in liver and kidneys. Some significant differences were found in the tocopherol distribution and content, even among taxonomically close species. They were mainly due to ecological peculiarities of the animals. The research data show that tocopherol is an important factor for maintaining the natural antioxidant system at a static level.

Key words: tocopherol, antioxidants, mammals, species, adaptation.

Введение

В естественной среде обитания обмен веществ и процессы, обеспечивающие его осуществление в животном организме, протекают в сложной и динамичной обстановке и находятся под влиянием многих факторов. Поддержание устойчивого обмена в постоянно меняющихся условиях невозможно без специальных адаптаций, позволяющих отдельному организму приспособиться к воздействию факторов среды. При этом адаптивные механизмы складываются как интегрированный результат поведения и физиологических реакций отдельных особей данного вида на основе непрерывного потока информации о состоянии внешней среды [Шилов, 1985].

Одним из биохимических показателей адаптации к окружающей среде является содержание витаминов в тканях животных, которое, по всей вероятности, в значительной степени зависит от экологической специализации вида. Существующее видовое многообразие животных обусловливает неоднородное участие витами-

нов в различных звеньях клеточного обмена в организме, представляющих биохимическую основу их влияния на физиологические процессы [Чаговец, Лахно, 1968]. Так, адаптация к различным факторам среды сопровождается повышением антиокислительной активности липидов, которая зависит от состава и содержания в них основного природного антиоксиданта – витамина Е, входящего в группу так называемых пищевых антиоксидантов, потребность в которых удовлетворяется поступлением с пищей. Растительноядные животные являются первичными потребителями продуцентов витаминов, а плотоядные получают витамины, синтезированные растениями, поедая других животных.

В живых тканях витамин Е выполняет роль биологического антиоксиданта, препятствующего развитию нерегулируемых, цепных свободнорадикальных процессов перекисного окисления ненасыщенных тканевых липидов (ПОЛ). В то же время активные формы кислорода можно отнести к естественным стресс-агентам окружающей среды, поэтому существующее в клетке оптимальное соотношение между продукцией супероксида и его улавливанием в процессах метаболизма рассматривается как отражение эволюционно сложившейся потребности организма. Известная двойственность анти- и прооксидантного действия токоферола позволяет рассматривать его не только как антиоксидант, но и как соединение, поддерживающее процессы ПОЛ на определенном стационарном уровне, способствующее тем самым сохранению динамического равновесия антиоксидантного статуса организма [Халмурадов и др., 1980; Надиров, 1991; Меньщикова и др., 2006].

У млекопитающих характер распределения витамина Е в организме, где основной его формой в тканях является α-токоферол, может иметь существенные различия.

Эндогенный фон витамина Е характеризует особенности обмена в зависимости от физиологических процессов и биологических функций органов и тканей, видовой принадлежности, экологических особенностей животных и целого ряда других факторов. Среди многочисленных исследований содержания витамина Е в тканях человека, лабораторных или одомашненных животных работы, посвященные изучению уровня токоферола у диких млекопитающих, встречаются достаточно редко. Нами представлены результаты исследования содержания α-токоферола в органах и тканях видов животных как сравнительно недавно введенных в зоокультуру и не утративших черт своих диких предков, так и обитающих в природных условиях млекопитающих различных таксономических групп.

Материалы и методы

Объектами исследования были 23 вида млекопитающих: американская норка (*Mustela vison* Briss.), соболь (*Martes zibellina* L.), песец (*Alopex lagopus* L.), обыкновенная лисица (*Vulpes vulpes* L.), енотовидная собака (*Nycterous procionoides* Gray), нутрия (*Myocastor coypus* Molina), кролик (*Leporidae* Fischer), шиншилла (*Chinchilla* Bennett), разводимые в зоокультуре; американская норка, куница (*Martes martes* L.), ласка (*Mustela nivalis* L.), волк (*Canis lupus* L.), енотовидная собака, бурый медведь (*Ursus arctos* L.), канадский (*Castor Canadensis* Kuhl) и европейский (*C. fiber* L.) бобры, ондатра (*Ondatra zibethica* L.), заяц-беляк (*Lepus timidus* L.), водяная кутора (*Neomys fodiens* Penn.), бурозубка средняя (*Sorex caecuties* Laxm.*)*, крот (*Talpa europaea* L.), усатая ночница (*Myotis mystacinus* Kuhl), северный кожанок (*Vespertillio nilssoni* Kyserling et Blasius), бурый ушан (*Plecotus auritus* L.), добытые в природе.

Исследовалось содержание витамина Е в печени, почках, сердце и скелетной мышце. Взятые образцы тканей замораживали и хранили при температуре – 25° С до проведения анализа. Концентрацию α-токоферола в тканях определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [Скурихин, Двинская, 1989]. Хроматографическое разделение осуществляли на микроколоночном хроматографе с ультрафиолетовым детектором. Элюентом служила смесь гексана с изопропанолом. Для построения калибровочных кривых использовали стандартные растворы α-токоферола (Sigma, США). Результаты обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики [Ивантер, Коросов, 2003].

Результаты и обсуждение

Выявлены видовые различия в распределении витамина Е в тканях млекопитающих различных систематических групп, связанные, как правило, с экологическими особенностями вида.

Низкий уровень α-токоферола обнаружен в печени насекомоядных (кутора, средняя бурозубка, крот, летучие мыши), а в некоторых тканях у этих животных витамин Е не детектировался. Не выявлено существенных различий в содержании токоферола в печени наземной средней бурозубки и куторы, полуводного млекопитающего, способного к нырянию [Гуреев, 1963; Галанцев, 1977]. У крота содержание витамина Е в печени, являющейся депонирующим органом, было самым низким (табл.).

Концентрация α-токоферола в органах и тканях млекопитающих, мкг/г

№	Вид	n	Органы и ткани			
			печень	почки	сердце	мышца
1	Бурозубка средняя	1	5,5			
2	Кутора	1	5,4	0		
3	Крот	4	2,83 ± 0,59	0	0	4,25 ± 2,15
4	Усатая ночница	3	9,71 ± 4,12	4,35**		4,7**
5	Северный кожанок	5	12,30 ± 8,02	15,58 ± 8,84	13,68 ±1,63	5,99 ± 0,03
6	Бурый ушан	2	7,59 ± 3,54	4,91 ± 2,69	11,74**	3,20 ± 0,70
7	Заяц-беляк	2	12,1 ± 5,1	9,5 ± 3	4,7 ± 1,1	4,55 ± 0,95
8	Кролик	3	22,83 ± 15,05	12,33 ± 8,03	10,85 ± 2,55	7,8 ± 2
9	Бобр европ.	4	12,475 ± 3,60	15,425 ± 6,05	12,3 ± 3,76	0
10	Бобр канад.	4	8,425 ± 2,68	8,8 ± 0,64	7,85 ± 1,63	2,2 ± 1,74
11	Нутрия	4	23,65 ± 2,03	24,65 ± 2,24	28,38 ± 1,85	26,65 ± 1,93
12	Шиншилла	4	32,6 ± 2,64	31,7 ± 4,11	33 ± 2,44	31,3 ± 2,48
13	Ондатра	2	8,39 ± 0,37	19,12 ± 7,21 11, 91 – 26,33*	9,95 ± 3,96	20,74 ± 12,72 8,02 – 33,45*
14	Куница	2	30,8 ± 3,82	15,2 ± 2,55	7,25 ± 1,03	5,85± 2,51
15	Норка амер. (клеточная)	5	41,18 ± 5,59	55,4 ± 15,49	31,68 ± 4,60	24,76 ± 4,30
16	Норка амер. (дикая)	3	56 ± 11,90	94,9 ± 7,58	53,13 ± 8,69	33,83 ± 9,69
17	Соболь	10	29,45 ± 3,24	51,76 ± 4,09	28,61 ± 1,43	5,91 ± 0,59
18	Ласка	1	7,25	34,83	17,04	7,17
19	Волк	2	9,93 – 139,6*	0 – 19,66*	6,59 ± 2,62	0,29**
20	Лисица	5	38,1 ± 2,71	77,78 ± 10,59	27,31 ± 2,27	27,6 ± 2,67
21	Песец	5	38,58 ± 3,84	138,76±15,08	34,6 ± 6,77	35,4 ± 6,84
22	Енотовидная собака (дикая)	1	93,2	40,5	27,5	29,4
23	Енотовидная собака (клеточная)	6	16,02 ± 2,4	66,23 ± 23,07	11,73 ± 0,78	17,09 ± 2,25
24	Медведь	4	49,27 ± 19,22 17,4 – 97,2*	11,28 ± 4,54 2,9 – 23,8*	18,29 ± 10,94 4,7 – 50,6*	13,9 ± 10,94 4,3 – 27,0*
25	Лось	8	6,35 ± 5,56	11,21 ±12,54 3,3 – 43,5 *	5,64 ± 2,98	8,48 ± 11,41 0 – 37,7*

* Минимальное и максимальное значения.
** Исследован один образец.

Следует учесть, что насекомоядные, с одной стороны, используют корма, при потреблении которых накопление токоферола в тканях ограничено, а с другой – имеют чрезвычайно высокий уровень метаболизма, связанный с активным образом жизни и высокой подвижностью, при котором потребление кислорода примерно в 4 раза выше, чем у мелких грызунов сравнимого размера [Ивантер и др., 1985]. В результате такого интенсивного кислородного метаболизма у землероек, самых мелких млекопитающих, реакции окисления в тканях идут очень быстро – токоферол присоединяет активные формы кислорода, тем самым препятствуя влиянию гидроперекисей [Надиров, 1991]. Можно предположить, что включение токоферола в обменные процессы, в частности участие его в подавлении продукции активированных кислородных метаболитов, является у насекомоядных как одних из древнейших млекопитающих [Гуреев, 1963] наиболее ранним в хронологическом отношении и следует, вероятно, рассматривать в качестве биохимической адаптации, возникшей уже на начальной стадии эволюции высших позвоночных.

Одной из особенностей изучаемых нами животных является сезонность их жизненного цикла, включающая четкую приуроченность периода размножения к определенному времени года и связанные с этим изменения в ряде физиологических систем. Так, содержание токоферола у летучих мышей, единственных из млекопитающих, способных к активному полету, исследовалось в состоянии гибернации в ранний весенний период. Концентрация α-токоферола в тканях была близка к значениям у представителей насекомоядных. В период гибернации у зимоспящих рукокрылых наблюдается снижение уровня метаболизма, когда основным источником энергии являются жиры, где содержание токоферола достаточно велико. У гибернирующих животных интенсивность липолиза поддерживается на уровне, необходимом для постоянного, хотя и пониженного снабжения тканей энергией. Процессы обмена веществ при гибернации замедляются вследствие комплекса физиологических и биохимических перестроек, направленных на экономию энергозатрат. На протяжении зимней спячки происходит постепенная подготовка организма, и в первую очередь половой системы животных к размножению. Существует взаимосвязь между состоянием системы размножения и временем выхода животных из спячки [Ануфриев, 2008]. При дефиците токоферола в организме возникают нарушения функции размножения, поэтому сохранение определенного уровня витамина Е необходимо для готовящих-

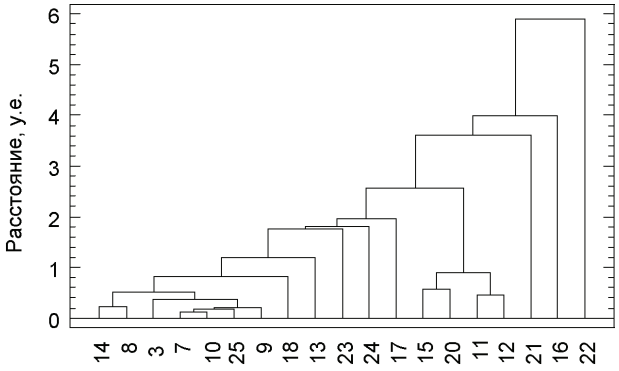
ся к размножению животных. Можно предположить, что установленное в тканях содержание токоферола демонстрирует адекватную обеспеченность витамином организма животных в конце зимовки. В то же время анализ индивидуальных данных показал, что концентрация токоферола у самки усатой ночницы была в 2–4 раза выше, чем у самцов. Увеличение содержания токоферола в весенний период было обнаружено и у млекопитающих, не впадающих в спячку [Теплый, 1979; Ильина и др., 2007].

У зайца-беляка, типичного наземного представителя млекопитающих, максимальная концентрация α-токоферола выявлена в печени, затем по убыванию в почках, сердечной и скелетной мышцах. Такое же распределение витамина Е, характерное для многих животных [Надиров, 1991; Меньщикова и др., 2006; Ильина и др., 2008], было обнаружено и у другого представителя отряда Зайцеобразные – кролика.

Грызуны являются самым многочисленным и широкораспространенным отрядом млекопитающих, представители которого занимают самые разнообразные экологические ниши. Нами исследовано содержание витамина Е в тканях пяти представителей этого отряда – европейского и канадского бобров, ондатры, нутрии и шиншиллы.

Содержание токоферола в тканях могут изменять различные внешние воздействия, в том числе и гипоксические состояния, являющиеся частым событием в жизни ныряющих млекопитающих. У относящихся к амфибионтам бобров и ондатры, значительно отличающихся по образу жизни от сухопутных млекопитающих, более высокое содержание α-токоферола установлено в почках, что характерно для полуводных животных [Туманов, 2003]. В то же время при сравнительном анализе содержания α-токоферола у европейского и канадского бобров отмечена разница между этими родственными видами (рис.). Исследования показали, что содержание витамина Е во всех изученных органах было выше у европейского бобра. В сердечной мышце уровень витамина Е был высоким у бобров обоих видов, в то время как в скелетной токоферол обнаружен только у канадского бобра. Такое распределение α-токоферола отражает, очевидно, интенсивность окислительных процессов в тканях, обусловленных адаптацией к вынужденной гипоксии-реоксигенации при нырянии, когда потребление миокардом кислорода снижается с последующим за этим увеличением, сопровождающимся генерацией эндогенных кислородных радикалов и повышением потребности в антиоксидантах [Ikeda et al., 2004].

Ранее отмечалось, что запасы кислорода в мышцах ныряльщиков превышают его запасы в крови, но под водой они быстро истощаются, в результате чего мышцы начинают покрывать энергетические затраты гликолитическим путем [Галанцев, 1977; Хочачка, Сомеро, 1977]. Состояние гипоксии-реоксигенации вызывает усиленную утилизацию антиоксиданта, интенсивность которой в тканях различна, что объясняет удовлетворение потребности сердечной ткани в токофероле в первую очередь. Очевидно, что сердце обладает не только высоким уровнем окислительного метаболизма, но и совершенной антиоксидантной защитой, обеспечивающей бóльшую защищенность сердечной мышцы по сравнению со скелетной [Архипенко и др., 1987; Илюха и др., 2010]. В то же время у ондатры концентрация токоферола в мышцах была достаточно высокой, но количественно отличалась у двух исследованных особей – у самца содержание витамина в четыре раза превышало этот показатель в мышцах самки. Высокое содержание токоферола обнаружено в тканях разводимых в зоокультуре шиншиллы и нутрии, что, видимо, связано как с экзогенным поступлением, так и с экогенезом этих видов – природной средой обитания шиншиллы является высокогорье, а нутрия, как бобры и ондатра, относится к полуводным видам. Характерно, что на дендрограмме шиншилла и нутрия также оказались в одном кластере (см. рис.). Очевидно, что уровень витамина Е в тканях и органах животных, отличающихся по образу жизни, является отражением экологических особенностей и зависит от уровня обменных процессов, которые связаны с процессом адаптации к условиям вынужденной гипоксии, подразумевающей комплекс морфологических и биохимических изменений организма [Галанцев, 1977; Ikeda et al., 2004].



Дендрограмма сходства изученных видов (цифры на дендрограмме соответствуют нумерации животных в табл.)

Значительные межвидовые различия обнаружены в распределении токоферола в органах представителей семейства Куньи (куница, американская норка, соболь, ласка), животных,

близких по массе тела, но различных по экогенезу: норку относят к околоводным видам, куница, ласка и соболь – типичные сухопутные представители хищных млекопитающих. Следует отметить, что у дикой норки содержание токоферола в тканях было выше, чем у разводимой в неволе, но общий характер распределения α-токоферола в органах диких и введенных в зоокультуру норок, несмотря на длительное их разведение в искусственных условиях, был практически одинаков. Содержание α-токоферола в тканях куницы было значительно ниже, чем у норки. Существенные межвидовые различия наблюдались и в характере его распределения – если у куницы максимальная концентрация токоферола обнаружена в печени, то у норки, как дикой, так и разводимой в неволе, более высокий уровень витамина Е был в почках. Среди близких по размеру хищников у амфибионтов относительная масса почек больше, что связано с их усиленной функциональной деятельностью, в том числе и с потреблением кормов, содержащих высокий процент воды [Туманов, 2003]. Интересно отметить, что высокое содержание токоферола также обнаружено в почках ласки и соболя. Особый интерес вызывает установленная нами более высокая концентрация токоферола в тканях дикой норки по сравнению с клеточной. Возможно, в данном случае способ регуляции антиоксидантного потенциала обеспечивается в первую очередь с помощью эндогенных систем, где роль токоферола весьма значительна как наиболее биологически оправданного защитного механизма [Чаговец, Лахно, 1968; Закарян и др., 2002].

Существенные различия в распределении витамина Е в тканях обнаружены у представителей семейства Собачьи. Максимальная концентрация токоферола выявлена в печени волка. Интересно, что у этой же особи в почках, где обычно у собачьих наблюдается высокий уровень витамина Е [Schweigert, Thomann, 1995], его обнаружено не было, в то время как у другой особи содержание токоферола в почках превышало уровень витамина в печени. Такое перераспределение токоферола у волка связано, вероятно, с очень активным образом жизни этих животных и интенсивным расходованием энергии на добывание пищи при наличии большого защитного эффекта на уровне основных органов. У песца и лисицы наиболее высокая концентрация α-токоферола обнаружена в почках, имеющих существенное значение в регуляции обмена токоферола [Никифорова и др., 1993], причем у песца она была максимальной по сравнению с другими животными. Уровень токоферола у лисицы был ниже не только в почках, но и в сердечной и скелетной мышцах. Причины существующих тканевых различий в накоплении токоферола у разных видов могут заключаться в разном притоке липидов плазмы к тканям для удовлетворения их энергетических потребностей [Надиров, 1991]. У песцов энергетические затраты на работу почек более значительны, чем у животных бореального климата, что, очевидно, связано с особенностями функционирования этого органа у аборигенов Арктики [Наточин, 1982]. Здесь имеет место повышение у этих видов теплопродукции в скелетной мускулатуре и висцеральных органах, из которых печень и почки занимают ведущее место. При сравнении морфологического строения скелетной мускулатуры песца с другими видами обнаруживается высокая плотность митохондрий на единицу площади [Kayar et al., 1994], являющаяся, очевидно, структурной базой для осуществления химической терморегуляции в случае такой необходимости. Ранее различия между песцом и лисицей также установлены в активности антиоксидантных ферментов в органах [Илюха, 2001].

Высокая концентрация токоферола отмечена в тканях енотовидной собаки, причем содержание витамина Е у дикого представителя вида в печени, сердечной и скелетной мышцах было значительно выше, чем у разводимых в зоокультуре. Подобный факт наблюдался при сравнении дикой и клеточной норки. Вероятно, этим объясняется и близкое расположение диких представителей двух видов на дендрограмме (см. рис.). В природе енотовидная собака всеядна, питается растительной и животной пищей, к тому же является единственным представителем собачьих, для которого характерен зимний сон. Летом енотовидные собаки откармливаются, и к зиме их вес увеличивается за счет жира, запасы которого определяют выживание зимой и эффективность репродукции в весенний период. У диких животных изменение массы тела является естественной частью их циркадных ритмов, регулируемых таким фактором, как фотопериод, с этим же связаны и сезонные изменения основного обмена [Mustonen et al., 2007; Ильина и др., 2007]. Исследованная дикая енотовидная собака была добыта в конце сентября в период увеличения запасов жира, отличающегося высоким содержанием витамина Е, накопление которого в организме служит одной из существенных причин, вызывающих спячку [Слоним, 1979; Калабухов, 1985].

У другого спящего зимой хищника – медведя – наиболее высокая концентрация витамина Е обнаружена в печени и сердце. Медведи, в систематическом отношении представляющие примитивную форму среди хищников по ряду

признаков (эврифагийность, зимняя спячка) [Слоним, 1952; Новиков, 1963], по характеру двигательной активности также значительно отличаются от собачьих и куньих, которые активны в течение всего года и обладают более высокими показателями обменных процессов [Калабухов, 1985; Туманов, 2003]. У медведя во время гибернации обмен веществ снижается до 25% от базовых значений, что позволяет ему переживать от 5 до 7 месяцев не только без пищи и воды, но и без мочеиспускания и дефекации [Tøien et al., 2011]. Чем больше подвижность и выше уровень метаболизма, тем быстрее идут реакции окисления и накопления продуктов распада в функционирующих органах, которые инициируют активацию антиоксидантной системы. Этим, вероятно, обусловлено более высокое содержание α-токоферола в органах собачьих. Различия между собачьими и медвежьими по уровню витамина Е установлены и в сыворотке крови [Crissey et al., 2001].

У многих хищных млекопитающих концентрация α-токоферола в сердечной мышце превышает содержание в скелетной. Такая закономерность отражает интенсивность аэробного обмена в миокарде, где его уровень значительно выше по сравнению со скелетной мышцей. Сердце как непрерывно функционирующий орган обладает не только высоким уровнем окислительного метаболизма, но и эффективной антиоксидантной защитой [Архипенко и др., 1987], что обусловливает более высокий уровень токоферола в этом органе. Вместе с тем у медведя концентрация α-токоферола в сердце превышала его содержание не только в скелетной мышце, но и в почках, отличающихся высоким содержанием токоферола у многих видов млекопитающих. Очевидно, это связано с физиологическими особенностями функционирования миокарда у этих крупных хищников. Так, во время спячки скорость сердечных сокращений медведя падает с 55 до 9 ударов в минуту, сопровождается значительной дыхательной аритмией сердечного ритма и на выдохе пауза между сердечными сокращениями может составлять до 20 с [Tøien et al., 2011]. Состояние гипоксии для медведя в период гибернации является естественным, что обусловливает в том числе и характер распределения токоферола в организме.

Единственным исследованным видом из отряда Парнокопытные был лось – самый крупный представитель семейства Оленьи. В осенне-зимний период было исследовано 6 взрослых особей (3 самца, 3 самки) и 2 самца-сеголетка. У взрослых лосей обнаружена более высокая концентрация витамина Е в почках по сравнению с печенью, а у молодых животных содержание токоферола в печени превышало его концентрацию в других органах. Концентрация токоферола в скелетной мышце у самок и молодых самцов была практически такой же, как в сердечной, а у взрослых самцов значительно превышала этот уровень. Такой характер распределения свидетельствует об интенсивном аэробном обмене в обеих мышечных тканях у животных с высоким уровнем метаболизма, сочетающимся с надежным функционированием антиоксидантной системы, составной частью которой является токоферол.

При изучении диких млекопитающих сложно создать условия, при которых группа исследуемых животных была бы достаточно многочисленна и однородна, и в ряде случаев получена достаточно высокая вариабельность концентрации токоферола, поэтому иной раз для маленьких выборок более информативными являются минимальные и максимальные значения показателя (см. табл.). Существующие внутривидовые колебания связаны с целым рядом факторов, к которым в первую очередь можно отнести различия в уровне питания отдельных особей, обитающих в природных условиях, а также их физиологическое состояние, возраст, сезон года и ряд других показателей.

Результаты исследований показывают, что содержание витамина Е в органах и тканях млекопитающих варьирует в весьма широких пределах. В распределении α-токоферола в тканях и органах типичных сухопутных млекопитающих и амфибионтов установлены значительные различия, которые являются, очевидно, отражением экологических особенностей, связанных у полуводных с процессом пребывания и выживания животных под водой [Галанцев, 1977]. Наиболее высокая концентрация α-токоферола обнаружена в тканях хищников, у грызунов, зайцеобразных и насекомоядных она значительно ниже, что определяет близкое положение видов на дендрограмме (см. рис.). Частная гетеротрофность млекопитающих разных таксономических групп определяет у них, очевидно, различный уровень специального α-токоферолпереносящего белка, механизмы регуляции содержания которого в клетках, как предполагается, связаны с развитием окислительного стресса [Меньщикова и др., 2006]. Это подтверждается имеющимися в литературе данными, указывающими на неодинаковую активность процессов ПОЛ в органах разных видов млекопитающих, что связывают с различиями в уровне компонентов антиоксидантной защиты, в том числе витамина Е [Никифорова и др., 1993; Закарян и др., 2002; Ильина и др., 2008]. Основным фактором, определяющим потребность в токофероле, является содержание полиненасыщенных жирных кислот в тка-

нях организма, которые по своему составу существенно отличаются у разных видов животных [Калабухов, 1985; Надиров, 1991]. Потребление кислорода организмом зависит от уменьшения содержания этих кислот, так как он расходуется на образование пероксида в фосфолипидах – функционально активной структуры мембран. Токоферол, являясь составным компонентом субклеточных мембран, также расходуется в процессе окисления, причем его способность раньше других антиоксидантов расходоваться в окислительных реакциях, протекающих в липидах, определяет его высокую биологическую активность [Халмурадов и др., 1980; Надиров, 1991; Меньщикова и др., 2006]. Существует положительная корреляция между продолжительностью жизни животных и концентрацией в тканях антиоксидантов, в том числе α-токоферола [Cutler, 1991].

Таким образом, установленный в тканях и органах исследованных млекопитающих уровень витамина Е следует, вероятно, рассматривать как отражение эволюционно сложившейся потребности организма, при котором обеспечивается высокая эффективность функционирования метаболических систем, направленная на поддержание оптимального энергетического баланса в условиях среды обитания, характерной для данного вида. Концентрация витамина Е в тканях млекопитающих в значительной степени зависит от экологической специализации и эволюционной организации вида, являясь одним из биохимических показателей адаптации животных к окружающей среде.

Работа поддержана грантами: РФФИ № 10-04-000913, Президиума РАН «Биологическое разнообразие» № г.р. 01200955235, 01200955236, ОБН РАН № г.р. 01200955939, ФЦП ГК № 02.740.11.0700.

Литература

Ануфриев А. И. Механизмы зимней спячки мелких млекопитающих Якутии / Ред. Н. Г. Соломонов. Новосибирск: изд-во СО РАН, 2008. 158 с.

Архипенко Ю. В., Джапаридзе Л. М., Гуткин Д. В. и др. Сравнительная оценка влияния недостаточности витамина Е на перекисное окисление липидов и транспорт Ca^{2+} в сердечной и скелетной мышцах // Вопр. мед. хим. 1987. № 1. С. 122–126.

Галанцев В. П. Эволюция адаптаций ныряющих животных. Эколого- и морфофизиологические аспекты. Л., 1977. С. 1–191.

Гуреев А.А. Отряд Insectivora – Насекомоядные // Млекопитающие фауны СССР / Ред. Е. Н. Павловский. М.; Л., 1963. С. 54–122.

Закарян Н. Е., Айвазян Н. М., Карагезян К. Г. Сравнительный анализ активности супероксидисмутазы в тканях высших позвоночных // Докл. Академии наук. 2002. Т. 382, № 2. С. 264–266.

Ивантер Э. В., Ивантер Т. В., Туманов И. Л. Адаптивные особенности мелких млекопитающих. Эколого-морфологические и физиологические аспекты. Л., 1985. 318 с.

Ивантер Э. В., Коросов А. В. Введение в количественную биологию. Петрозаводск, 2003. 303 с.

Илюха В. А. Супероксидисмутаза и каталаза в органах млекопитающих различного экогенеза // Журн. эвол. биохимии и физиологии. 2001. Т. 37, № 3. С. 183–186.

Илюха В. А., Калинина С. Н., Ильина Т. Н. и др. Участие антиоксидантной системы в адаптациях млекопитающих к различному уровню кислорода: ныряние, спячка и высокогорное происхождение // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: мат-лы III Междунар. конф. (Петрозаводск, 22–26 июня 2010 г.) Петрозаводск, 2010. С. 65–66.

Ильина Т. Н., Илюха В. А., Калинина С. Н. и др. Влияние генотипа на сезонные изменения антиоксидантной системы и изоферментного спектра лактатдегидрогеназы американских норок (*Mustela vison* Schreber, 1977) // Вестник ВОГиС. 2007. Т. 11, № 1. С. 145–154.

Ильина Т. Н., Руоколайнен Т. Р., Белкин В. В. Содержание токоферола в тканях млекопитающих различного экогенеза // Журн. эвол. биохимии и физиологии. 2008. Т. 44, № 6. С. 577–581.

Калабухов Н. И. Спячка млекопитающих. М., 1985. С. 194–225.

Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К. и др. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. 556 с.

Надиров Н. К.. Токоферолы и их использование в медицине и сельском хозяйстве. М., 1991. 336 с.

Наточин Ю. В. Водно-солевой гомеостаз: эволюция и экология: Препринт науч. доклада на VI Всесоюз. конф. по экол. физиологии. Сыктывкар, 1982. С. 1–48.

Никифорова Н. В., Кирпатовский В. И., Севрюков Е. А. Содержание витамина Е в корковом и мозговом слоях почек млекопитающих // Бюл. экспер. биол. и медицины. 1993. № 3. С. 245–246.

Новиков Г.А. Отряд Carnivora – Хищные // Млекопитающие фауны СССР / Ред. Е.Н. Павловский. М.; Л., 1963. С. 740–895.

Скурихин В. Н., Двинская Л. М. Определение α-токоферола и ретинола в плазме крови сельскохозяйственных животных методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии // С.-х. биология. 1989. № 4. С. 127–129.

Слоним А. Д. Животная теплота и ее регуляция в организме млекопитающих. М.; Л., 1952. 327 с.

Слоним А. Д. Факторы, вызывающие спячку, засыпание и пробуждение // Экологическая физиология животных. Л.: Наука, 1979. Ч. I. С. 183–187.

Теплый Д. Л. Влияние витамина Е на проницаемость гемато-энцефалического барьера // Физиол. журнал СССР. 1979. Т. 65, № 10. С. 1506–1512.

Туманов И. Л. Биологические особенности хищных млекопитающих России. СПб: Наука, 2003. 448 с.

Халмурадов А. Г., Тоцкий В. Н., Чаговец Р. В. Транспорт жирорастворимых витаминов. Киев, 1980. 216 с.

Хочачка П., Сомеро Д. Стратегия биохимической адаптации. М., 1977. 398 с.

Чаговец Р. В., Лахно Е. В. Происхождение экзогенности витаминов и ее биологическое значение // Вопр. питания. 1968. № 1. С. 3–9.

Шилов И. А. Физиологическая экология животных. М.: Высшая школа,1985. 328 с.

Crissey S., Ange K., Slifka K. et al. Serum concentrations of vitamin D metabolites, vitamins A and E, and carotenoids in six canid and four ursid species at four zoos // Comp. Biochem. Physiol. & Mol. Integr. Physiol. 2001. Vol. 128, N 1. P. 155–165.

Cutler R. G. Antioxidant and aging // Am. J. Clin. Nutr. 1991. 53. P. 373–379.

Ikeda M., Nakabayashi K., Shinkai M. et al. Supplemention of antioxidant prevents oxidative stress during a deep saturation dive // Tohoku J. Exp. Med. 2004. 203. P. 353–357.

Kayar S. R., Hoppeler H., Jones J.H. et al. Capillary blood transit time in muscles in relation to body size and aerobic capacity // J. Exp. Biol. 1994. Vol. 194, N 1. P. 69–81.

Mustonen A.-M., Kakela R., Kakela A. et al. Lipid Metabolism in the Adipose Tissues of a Carnivore, the Raccoon Dog, During Prolonged Fasting // Exp. Biol. Med. 2007. Vol. 232. P. 58–69.

Schweigert F. J., Thomann E.. Organ distribution of vitamins A and E in carnivores. // Scientifur. 1995. Vol. 19, N 4. P. 309.

Tøien Ø., Blake J., Edgar D. M. et al. Hibernation in Black Bears: Independence of Metabolic Suppression from Body Temperature // Science. 2011. Vol. 331, N 6019. P. 906–909.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Ильина Татьяна Николаевна
старший научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: ilyina@bio.krc.karelia.ru
тел. (8142) 573107

Руоколайнен Татьяна Рудольфовна
ведущий научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: truok@krc.karelia.ru
тел. (8142) 571879

Белкин Владимир Васильевич
ведущий научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: ffyodor@krc.karelia.ru
тел. (8142) 573140

Баишникова Ирина Валерьевна
ведущий биолог
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
тел. (8142) 573107

Ilyina, Tatiana
Institute of Biology, Karelian Research Center, Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: ilyina@bio.krc.karelia.ru
tel. (8142) 573107

Ruokolaynen, Tatiana
Institute of Biology, Karelian Research Center, Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: truok@krc.karelia.ru
tel. (8142) 571879

Belkin, Vladimir
Institute of Biology, Karelian Research Center, Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: ffyodor@krc.karelia.ru
tel. (8142) 573140

Baishnikova, Irina
Institute of Biology, Karelian Research Center, Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
tel. (8142) 573107

Труды Карельского научного центра РАН
№ 3. 2011. С. 57–61.

УДК 581.11:633.16:546.48

ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ НА ВОДНЫЙ ОБМЕН РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ

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

Институт биологии Карельского научного центра РАН

В лабораторных условиях изучали влияние ионов кадмия на некоторые показатели водного обмена растений ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) с. Зазерский 85. Опыты показали, что 4-суточная экспозиция на питательном растворе с добавлением металла (100 мкМ) вызывает у растений торможение роста корня, уменьшение числа и размеров устьиц в листьях, частичное закрытие устьичной щели и снижение устьичной проводимости. Указанные изменения приводили к замедлению транспирации растений, хотя нарушений в оводненности тканей органов при этом не происходило. Последнее, очевидно, связано прежде всего с уменьшением скорости транспирации, а также, возможно, с преимущественно симпластическим транспортом воды в клетках, характерным для растений этого вида.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare* L., кадмий, водный обмен, оводненность тканей, устьичный аппарат, интенсивность транспирации.

N. M. Kaznina, A. F. Titov, G. F. Laidinen, J. V. Batova. EFFECT OF CADMIUM ON WATER RELATIONS IN BARLEY PLANTS

The effect of cadmium on some parameters of water relations in barley plants (*Hordeum vulgare* L.) was studied under laboratory conditions. The experiments showed that four-day exposure on nutritious solution containing the metal (100 μM) inhibited root growth, caused a reduction in the number and size of stomata, partial closing of the stomatal aperture and decrease in stomatal conductance. These changes inhibited transpiration although there was no significant change in the water content in tissues. The latter fact is obviously connected first of all with reduction in the rate of transpiration, and probably also with the mainly symplastic water transport in cells, characteristic of this species.

Key words: *Hordeum vulgare* L., cadmium, water relations, water content in tissues, stomatal apparatus, transpiration.

Введение

Водный обмен – одна из наиболее важных составляющих жизнедеятельности растений. Поддержание в клетках и тканях определенного уровня водного баланса является обязательным условием не только нормального роста и развития растений, но и их устойчивости к факторам внешней среды. Тем не менее почти любые изменения в окружающей среде тем или иным образом отражаются на водном обмене растений [Кудоярова и др., 2001]. Например, действие высоких температур [Rodrigez, Davies, 1982; Кудоярова и др., 2007], почвенной засухи [Шматько и др., 1989], засоления [Sohan et al., 1999; Ахиярова и др., 2006] и закисления почв [Barceló, Poschenrieder, 1990] приводит к значительным его нарушениям. Известно также и о негативном влиянии на водообмен тяжелых металлов [Kastori et al., 1992; Vassilev et al., 1998; Perfus-Barbeoch et al., 2002], хотя экс-

периментальных данных по этому вопросу сравнительно немного.

Кадмий является одним из наиболее токсичных тяжелых металлов для всех живых организмов [Prasad, 1995]. Его высокие концентрации в почве вызывают у растений нарушение многих физиологических процессов, прежде всего таких как рост [Серегин, Иванов, 2001; Титов и др., 2002] и фотосинтез [Sheoran et al., 1990; Siedleska, Krupa, 1996; Караваев и др., 2001]. Гораздо меньше изучено действие кадмия на водный обмен растений, хотя предполагают, что нарушение водного баланса под влиянием этого металла – одна из главных причин его сильной фитотоксичности [Vassilev et al., 1998].

Исходя из вышеизложенного, целью данной работы явилось изучение влияния кадмия на некоторые показатели водного обмена растений ячменя.

Материалы и методы

Исследовались проростки ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) с. Зазерский 85. С этой целью семена проращивали в сосудах с песком при температуре воздуха 20–22°С, освещенности 10 клк, фотопериоде 14 ч. На 3-и сут после посева при появлении шильца 1-го листа проростки переносили в сосуды объемом 2 л на половинный питательный раствор Кнопа (контроль). В опытном варианте к питательному раствору добавляли 100 мкМ кадмия в форме сульфата.

После 4-суточной экспозиции на растворе с металлом у контрольных и опытных растений измеряли длину главного корня и высоту побега, определяли подземную и надземную биомассу. Влияние кадмия на водный режим оценивали по изменению (по отношению к контролю) оводненности тканей органов, интенсивности транспирации, устьичной проводимости, а также по состоянию устьичного аппарата. Оводненность тканей рассчитывали по общепринятой формуле. Интенсивность транспирации и устьичную проводимость измеряли с помощью установки для исследования CO_2-газообмена и водяных паров НСМ-1000 (Walz, Германия). Подсчет числа устьиц на нижнем эпидермисе листа, измерение размеров замыкающих клеток и устьичной щели осуществляли методом отпечатков с использованием светового микроскопа Микмед 2 (ЛОМО, Россия) и окуляр-микрометра [Жолкевич, Пильщикова, 1989].

Повторность в пределах одного варианта опыта составляла 10 растений, опыт повторяли трижды. В таблицах представлены средние значения по трем независимым опытам и их стандартные ошибки. Достоверность различий оценивали с помощью критерия Стьюдента при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что кадмий в концентрации 100 мкМ тормозит рост как подземных, так и надземных органов растений ячменя. Так, через 4 сут экспозиции на растворе с металлом отмечено заметное отставание опытных растений по сравнению с контрольными по таким показателям, как длина главного корня и высота побега, а также их биомасса, однако оводненность тканей при этом практически не изменялась (табл. 1). Очевидно, поддержание высокого уровня оводненности клеток можно в данном случае объяснить тем, что у ячменя, в отличие от большинства других видов сосудистых растений, основную роль в транспорте воды к сосудам ксилемы играет симпластический путь, позволяющий в неблагоприятных условиях среды более эффективно (по сравнению с апопластическим) осуществлять контроль за поступлением воды в клетки, усиливая водопоглотительную способность корней [Steudle, Jeschke, 1983; Физиология растений, 2005; Веселов и др., 2007]. Некоторые авторы указывают также на усиление притока воды в клетки за счет увеличения размеров подземных органов и/или уменьшения транспирации листьев [Barceló, Poschenrieder, 1990]. Поскольку в наших экспериментах рост корня при наличии кадмия в питательном растворе тормозился (на 20 % по сравнению с контролем), сохранение оводненности тканей у опытных растений на уровне контроля, очевидно, связано с заметным снижением (на 24 %) интенсивности транспирации (табл. 2).

Нами также обнаружено, что под действием кадмия у растений ячменя на нижнем эпидермисе листа, сформированного за время экспозиции на растворе с металлом, оказалось меньше (на 21 % по сравнению с контролем) устьиц и уменьшалась длина замыкающих клеток устьиц (на 17 %). Аналогичный эффект выявлен также у *Brassica juncea* L. Czern, выращенных на субстрате с добавлением кадмия в концентрации 20 мкМ [Zhu et al., 2005], у сахарной свеклы при действии металла в концентрации 10 мкМ [Greger, Johansson, 2006] и у *Urtica pilulifera* L. при применении кадмия в концентрации 100 и 200 мкМ [Özyigit, Akinci, 2009]. Однако следует подчеркнуть, что конкретный механизм влияния кадмия на формирование устьичного аппарата к настоящему времени практически не изучен. Высказано лишь предположение о его воздействии на деление протодермальных клеток-предшественниц на две замыкающие клетки [Bergmann, 2004].

Таблица 1. Влияние кадмия (100 мкМ) на линейные размеры, биомассу и оводненность тканей корня и побега у растений ячменя

Варианты опыта	Корень		Побег		Оводненность тканей, %	
	длина, см	сырая биомасса, мг	высота, см	сырая биомасса, мг	корень	побег
Контроль	8,3 ± 0,6	81,6 ± 3,3	12,1 ± 0,2	122,0 ± 4,2	91,2 ± 0,1	92,7 ± 0,2
Cd	6,6 ± 0,3*	73,7 ± 3,9*	10,5 ± 0,3*	103,5 ± 1,1*	90,9 ± 0,2	90,7 ± 0,1

* Здесь и в табл. 2 различия по отношению к контролю достоверны при $P < 0,05$.

Таблица 2. Влияние кадмия (100 мкМ) на показатели водного обмена растений ячменя

Показатели	Контроль	Cd	% от контроля
Интенсивность транспирации (мМ/м^2·с)	1,44 ± 0,10	1,07 ± 0,07	76*
Количество устьиц (шт./мм^2)	278,0 ± 4,6	219,6 ± 4,9	79*
Длина замыкающих клеток устьиц (мкм)	50,38 ± 0,79	41,88 ± 0,79	83*
Длина устьичной щели (мкм)	25,20 ± 0,28	20,83 ± 0,32	83*
Ширина устьичной щели (мкм)	11,31 ± 0,17	7,03 ± 0,18	62*
Устьичная проводимость (мМ/м^2·с)	98,30 ± 7,61	72,02 ± 1,63	61*

Помимо уменьшения числа и размеров устьиц, у опытных растений обнаружено также и уменьшение длины (на 17% по сравнению с контролем) и ширины (на 38%) устьичной щели, что в итоге приводило к значительному снижению (на 39%) устьичной проводимости. Ранее полное или частичное закрытие устьиц под влиянием кадмия наблюдали у растений кукурузы и подсолнечника [Bazzaz et al., 1974], бобов [Barceló et al., 1988], рапса [Baryla et al., 2001] и гороха [Sandalio et al., 2001]. Предположительно, оно может быть связано с утечкой ионов калия из замыкающих клеток вследствие увеличения проницаемости мембран [Poschenrieder et al., 1989; Neill et al., 2008].

Выводы

Таким образом, выявленные нами изменения в устьичном аппарате растений ячменя при действии кадмия, а также уменьшение устьичной проводимости явились, очевидно, основными причинами замедления скорости транспирации. Однако нельзя исключить, что снижение скорости этого процесса может быть также связано и с уменьшением под влиянием металла размеров корневой системы [Hardiman, Jacoby, 1984; Prasad, 1995] и/или снижением количества и диаметра сосудов ксилемы [Barceló, Poschenrieder, 1990; Kahle, 1993].

В целом наши исследования показали, что кадмий в концентрации 100 мкМ оказывает отрицательное влияние на водный обмен растений ячменя. Уменьшение размеров корня при воздействии металла, снижение числа и размеров устьиц, частичное закрытие устьичной щели и, как следствие, существенное уменьшение устьичной проводимости приводили к замедлению транспирации растений. Вместе с тем снижение скорости этого процесса, а также преимущественно симпластический транспорт воды в клетках, характерный для ячменя, очевидно, позволяют растениям этого вида сохранять высокий уровень оводненности тканей корня и побега в присутствии кадмия, что необходимо для поддержания их жизнедеятельности в этих условиях.

Литература

Ахиярова Г. Р., Фрике В., Веселов Д. С. и др. Накопление и распределение АБК в тканях листа и устьичная проводимость при водном стрессе, индуцированном засолением // Цитология. 2006. Т. 48, № 1. С. 918–923.

Веселов Д. С., Шарипова Г. В., Кудоярова Г. Р. Сравнительное изучение реакции растений ячменя (*Hordeum vulgare*) и пшеницы (*Triticum durum*) на кратковременное и длительное действие натрийхлоридного засоления // Агрохимия. 2007. № 7. С. 41–48.

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

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.

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

Кудоярова Г. Р., Веселов Д. С., Фаизов Р. Г. и др. Реакция устьиц на изменение температуры и влажности воздуха у растений разных сортов пшеницы, районированных в контрастных климатических условиях // Физиология растений. 2007. Т. 54, № 1. С. 54–58.

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., Лайдинен Г. Ф., Казнина Н. М. Влияние высоких концентраций кадмия на рост и разви-

тие ячменя и овса на ранних этапах онтогенеза // Агрохимия. 2002. № 9. С. 61–65.

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

Физиология растений: уч. для студ. вузов / Ред. И. П. Ермаков. М.: изд. центр Академия, 2005. 640 с.

Шматько И. Г., Григорюк И. А., Шведова О. Е. Устойчивость растений к водному и температурному стрессам. Киев: Наукова думка, 1985. 221 с.

Barceló J., Vázquez M. D., Poshenrieder C. Cadmium-induced structural and ultrastructural changes in the vascular system of bush bean stem // Bot. Acta. 1988. Vol. 101. P. 254–261.

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

Baryla A., Carrier P., Coulomb C., Havaux M. Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus)* grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth // Planta. 2001. Vol. 212. P. 296–709.

Bazzaz F. A., Rolfe G. L., Carlson R. W. Effect of Cd^{+2} on photosynthesis and transpiration of excised leaves of corn and sunflower // Physiol. Plant. 1974. Vol. 32. P. 373–377.

Bergmann D. C. Integrating signals in stomatal development // Plant Biol. 2004. Vol. 6. P. 26–32.

Greger M., Johansson M. Cadmium effects on leaf transpiration of sugar beet (*Beta vulgaris*) // Physiol. Plant. 2006. Vol. 86. P. 465–473.

Hardiman R., Jacoby B. Absorption and translocation of cadmium in bush bean *Phaseolus vulgaris* // Physiol. Plant. 1984. Vol. 61. P. 670–674.

Kahle H. Response of roots of trees to heavy metals // Env. Exp. Bot. 1993. Vol. 33. P. 99–119.

Kastori R., Petrovi M., Petrovi N. Effect of excess lead, cadmium, copper and zinc on water relations in sunflower // J. Plant Nutr. 1992. Vol. 15. P. 2427–2439.

Neill S., Barros R., Bright J., Desikan R. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress // J. Exp. Bot. 2008. Vol. 59. P. 165–176.

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

Perfus-Barbeoch L., Leonhardt N., Vavasseur A., Forestier C. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status // Plant J. 2002. Vol. 32. P. 539–548.

Poshenrieder C., Gunse B., Barceló J. Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance and abscisic content in expanding bean leaves // Plant Physiol. 1989. Vol. 90. P. 1365–1371.

Prasad M. N. V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants // Env. Exp. Bot. 1995. Vol. 35. P. 525–545.

Rodrigez J. L., Davies W. J. The effects of temperature and ABA on stomata of *Zea mays* L. // J. Exp. Bot. 1982. Vol. 33. P. 977–987.

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

Sheoran I. S., Singal H. R., Singh R. Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and enzymes of photosynthetic carbon reduction cycle in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) // Photosynth. Res. 1990. Vol. 23. P. 345–351.

Siedlecka A., Krupa Z. Interaction between cadmium and iron and effects on photosynthetic capacity of primary leaves of *Phaseolus vulgaris* // Plant Physiol. Biochem. 1996. Vol. 35. P. 951–957.

Sohan D., Jasoni R., Zajicek J. Plant-water relations of Na-Cl and calcium-treated sunflower plants // J. Exp. Bot. 1999. Vol. 42. P. 105–111.

Steudle E., Jeschke W. D. Water transport in barley roots // Planta. 1983. Vol. 158. P. 237–248.

Vassilev A., Berova M., Zlatev Z. Influence of Cd^{2+} on growth, chlorophyll content, and water relations in young barley plants // Biol. Plant. 1998. Vol. 41. P. 601–606.

Zhu R., Macfie S. M., Ding Z. Cadmium-induced plant stress investigated by scanning electrochemical microscopy // J. Exp. Bot. 2005. Vol. 56. P. 2831–2838.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Казнина Наталья Мстиславовна
старший научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: kaznina@krc.karelia.ru
тел. (8142) 762706

Титов Александр Федорович
Председатель КарНЦ РАН, д.б.н., проф., чл.-корр. РАН,
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: titov@krc.karelia.ru

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

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

Лайдинен Галина Федоровна
старший научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: laidinen@krc.karelia.ru
тел. (8142) 762706

Батова Юлия Валерьевна
младший научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: batova@krc.karelia.ru
тел. (8142) 762706

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

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

Труды Карельского научного центра РАН
№ 3. 2011. С. 62–68.

УДК 576.385: 591.111.1: 636.934

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДЕФЕКТА ЛЕЙКОЦИТОВ В ДОМЕСТИЦИРУЕМЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ПУШНЫХ ЗВЕРЕЙ

А. Г. Кижина[1], Л. Б. Узенбаева[1], В. А. Илюха[1], Н. Н. Тютюнник[1], О. В. Трапезов[2], Н. Н. Шумилина[3], Е. Е. Ларина[3]

[1] *Институт биологии Карельского научного центра РАН*
[2] *Институт цитологии и генетики СО РАН*
[3] *Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К. И. Скрябина*

Исследованы морфоцитохимические особенности лейкоцитов у норок и лисиц различных генотипов из доместицируемых популяций. У норок с геном алеутского окраса (*a/a*) и сапфировых лисиц (*b/b p/p s/s*) обнаружен дефект гранул лейкоцитов. Показано, что норки и лисицы, а также норки различных генотипов имеют неодинаковую степень дефекта лейкоцитов.

Ключевые слова: лейкоциты, пушные звери, норка, лисица, генотип.

A. G. Kizhina, L. B. Uzenbaeva, V. A. Ilyukha, N. N. Tyutyunnik, O. V. Trapezov, N. N. Shumilina, E. E. Larina. MORPHOLOGICAL AND CYTOCHEMICAL ASPECTS OF LEUKOCYTE DEFECT IN DOMESTICATED POPULATIONS OF FUR ANIMALS

The morpho-cytochemical features of leukocytes were investigated in domesticated minks and silver foxes of different genotypes. A defect of leukocyte granules was found in minks with the Aleutian gene (*a/a*) and in sapphire foxes (*b/b p/p s/s*). The degree of the defect differs between minks and foxes, as well as between minks of different genotypes.

Key words: leucocytes, fur animals, mink, silver fox, genotype.

Введение

В настоящее время, несмотря на значительные успехи, роль лейкоцитов как фактора устойчивости организма у различных видов животных остается недостаточно изученной. Мутации, возникшие у некоторых видов хищных пушных зверей и растительноядных животных в результате доместикационных преобразований в ходе промышленного разведения, привели к созданию множества форм, отличающихся от исходного типа по окрасу и ряду морфофизиологических признаков – размерам, метаболизму, гормональному статусу, репродуктивной функции и устойчивости к заболеваниям.

Среди мутантных и созданных на их основе комбинативных окрасочных форм норок, лисиц и песцов обнаружены животные с дефектом гранул лейкоцитов, сходным с синдромом Чедиак-Хигаши (СЧХ) человека [Chediak, 1952; Higashi, 1954]. Аналогичное нарушение выявлено у бежевых мышей и крыс, герефордской и

черной японской пород крупного рогатого скота, лисиц жемчужная Мансфилда и сапфировая, песцов арктик блу, персидских кошек и дельфинов-косаток [Beautiful Fur Animals.., 1988; Introne et al., 1999; Huizing et al., 2008; Голубева и др., 2010; Узенбаева и др., 2011].

При этой наследственной патологии наблюдается повышение чувствительности к бактериальным и вирусным инфекциям, ослабление пигментации, склонность к лимфоидной пролиферации, кровоизлияниям в слизистые оболочки, а также анемия и высокая смертность в раннем возрасте. В качестве моделей животных для изучения этого редкого заболевания были предложены бежевые мыши и разводимые на фермах алеутские норки, являющиеся одной из мутаций дикой американской норки (*Mustela vison* Schreber, 1777) [McVey Ward et al., 2000].

В настоящей работе представлены сравнительные данные по морфологии, цитохимии и составу лейкоцитов крови и костного мозга у норок и лисиц различных окрасов, отличающихся от исходного типа характером пигментации волосяного покрова, жизнеспособностью и репродуктивными качествами.

Материалы и методы

Работа выполнена на норках, разводимых на экспериментальной звероферме Института цитологии и генетики СО РАН (14 генотипов) и в звероводческих хозяйствах Республики Карелия (3 генотипа), а также на лисицах из племзаводов «Пушкинский» и «Салтыковский» (4 генотипа) и из звероводческих хозяйств «Вятка» (2 генотипа) и «Пряжинское» (1 генотип). В исследовании использовано по 10 стандартных темно-коричневых (+/+), серебристо-голубых (*p/p*), сапфировых (*a/a p/p*) норок и серебристо-черных лисиц (*b/b*) и по 1–5 особей норок и лисиц редких генотипов.

На окрашенных по Паппенгейму мазках периферической крови и костного мозга из эпифизов трубчатых костей на светомикроскопическом уровне определяли состав лейкоцитарной формулы и относительное количество лейкоцитов с аномальными гранулами. Цитохимическими методами в лейкоцитах крови выявляли активность щелочной фосфатазы, пероксидазы, альфа-нафтилацетат эстеразы, нафтол-AS-D-хлорацетат эстеразы, а также содержание катионных белков и гликогена с помощью PAS-реакции (periodic acid-shiff reaction). В исследованиях использовали рекомендации, представленные в монографиях и руководствах по цитохимии [Берстон; 1965; Буйкис, Руденс, 1972; Кисляк, Ленская, 1978; Шубич, Нагоев, 1980; Хейхоу, Кваглино, 1983; Обозная, Панков, 1989]. Микрофотографии лейкоцитов крови сапфировых норок получали в световом микроскопе Axioscop 40 (Carl Zeiss) с цветной цифровой видеокамерой (Pixera 150ES) и программным обеспечением «Видеотест» для анализа изображений. Цифровой материал обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики.

Работа выполнена с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным.

Результаты и обсуждение

На первом этапе сравнивали морфологию лейкоцитов у темно-коричневых (+/+), монорецессивных серебристо-голубых (*p/p*) и дирецессивных сапфировых (*a/a p/p*) норок (рис. 1). У сапфировых норок наблюдался дефект, заключающийся в образовании в лейкоцитах аномально больших гранул. На процесс формирования видоизмененных цитоплазматических структур влияет мутация в локусе (*a/a*), поскольку ни у темно-коричневых, близких к исходному дикому типу, ни у мутантных серебристо-голубых норок нарушений не выявлено. Наши результаты и данные литературы свидетельствуют о том, что нарушение внутриклеточной структуры лейкоцитов у норок имеет сходство с СЧХ человека и аналогичным заболеванием, обнаруженным у ряда животных [Chediak, 1952; Higashi, 1954; Introne et al., 1999; Huizing et al., 2008].

Лейкоциты с «гигантскими» гранулами постоянно наблюдаются в крови сапфировых норок разного возраста, однако в раннем постнатальном онтогенезе в эозинофилах крови выявлены некоторые отличия в степени выраженности дефекта по сравнению с животными старшего возраста. На микрофотографиях (см. рис. 1) видно, что разные типы гранулоцитов крови сапфировых норок – нейтрофилы, эозинофилы и базофилы – имеют нарушение субклеточной организации. В частности, примерно 20 % нейтрофилов содержат аномальные гранулы, величина, а иногда форма и внутренняя структура которых широко варьируют (рис. 2). Особенно наглядны и демонстративны изменения в эозинофилах, в них количество гранул уменьшается от многочисленных, характерных для нормальной клетки, до 1–2 при патологии.

Наличие дефекта в лейкоцитах у норок сапфирового окраса подтверждается цитохимическими исследованиями. Между сапфировыми и исходным типом – темно-коричневыми и мутантными серебристо-голубыми норками выявлены существенные различия во внутриклеточном распределении цитохимических

компонентов. В лейкоцитах сапфировых норок активность пероксидазы, неспецифических эстераз и катионный протеин обнаружены в дефектных гранулах. Щелочная фосфатаза и PAS-положительный материал сосредоточены вне этих гранул. По цитохимическим признакам, в частности присутствию лизосомальных ферментов и пероксидазы, аномальные структуры, наблюдаемые у сапфировых норок, соответствуют азурофильным или так называемым первичным гранулам, формирующимся в нейтрофилах на более ранних стадиях клеточного созревания, чем вторичные. Темно-коричневые и серебристо-голубые норки имеют нормальную локализацию исследуемых соединений.

Влияние генов, контролирующих окраску меха у норок, в некоторых случаях проявляется и в изменении лейкоцитарной формулы (табл. 1). У норок большинства исследованных генотипов относительное содержание лимфоцитов колеблется в пределах от 28,0 до 54,7 %. Исключение составляют норки белая-хедлунд (*h/h)* и Шéдоу-сапфир (S^H/+ *a/a p/p*). У них уровень лимфоцитов выше, чем у остальных генотипов, и достигает 58 и 61% и, наоборот, снижено количество нейтрофилов до 35 и 25 % соответственно. Кроме того, у доминантно-рецессивной формы Шéдоу-сапфир (S^H/+ *a/a p/p*) по сравнению с другими окрасами наблюдается увеличение доли лимфоцитов с «гигантскими» гранулами. Более высокое содержание эозинофилов установлено у дирецессивных норок: жемчужной (*k/k p/p*), финский топаз (t^S/t^S *b/b*) и у полудоминантных – Черный хрусталь (C_R /+). Возможно, что распределение отдельных типов лейкоцитов, в частности соотношение нейтрофилов и лимфоцитов, в определенной степени зависит от генетических особенностей функционирования гипофизарно-адреналовой и стресс-лимитирующих систем.

Данные, полученные на норках различных генотипов, свидетельствуют о том, что системное поражение клеточных органелл возникает именно из-за аллеля *a/a.* Дефект лейкоцитов обнаружен у монорецессивных алеутских (*a/a*) норок, дирецессивных сапфировых (*a/a p/p)* и лавандо-

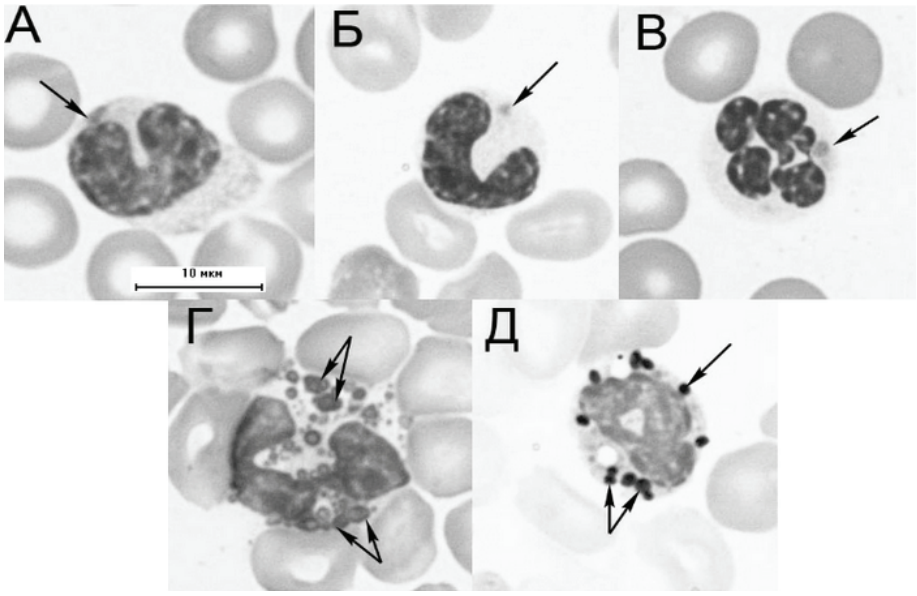


Рис. 1. Аномальные гранулы в лейкоцитах крови 10-дневной сапфировой норки (отмечены стрелками)

А – юный, Б – палочкоядерный, В – сегментоядерный нейтрофилы, Г – эозинофил, Д – базофил. Здесь и на рис. 3 окраска по Паппенгейму, масляная иммерсия, масштаб 10 мкм

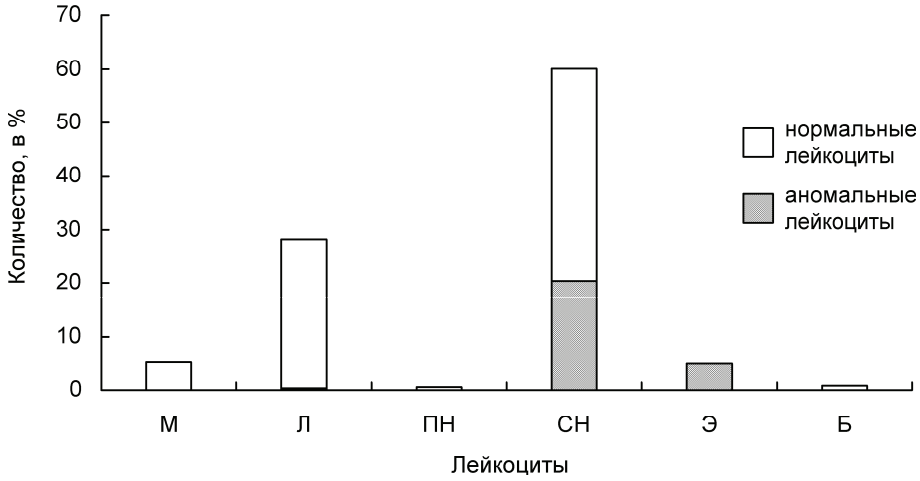


Рис. 2. Лейкоцитарная формула крови норок сапфирового окраса

Л – лимфоциты, М – моноциты, П – палочкоядерные и СН – сегментоядерные нейтрофилы, Э – эозинофилы, Б – базофилы

Таблица 1. Состав лейкоцитарной формулы и относительное содержание аномальных лейкоцитов у норок различных генотипов

Фенотип	Генотип	Л	М	Нейтрофилы			Б	Э	Комментарии
				Ю	П	С			
Алеутская	*a/a*	35/3	2	0	0	58/12	0	5/5	Аномальные гранулы в Э, отдельных С и Л
Сапфировая	*a/a p/p*	28/0,3	5,1	0	0,5	60/22,9	0,8/0,8.8	5,5/5,5	Аномальные гранулы в Э и Б, отдельных С и Л
Лавандовая	*m/m a/a*	36	2	0	2/2	54/4	0	6/6	Аномальные гранулы в Э, отдельных С и П
Виолет	*m/m a/a p/p*	33/3	3	0	0	62/30	0	2/2	Аномальные гранулы в Э, примерно в половине С и отдельных Л
Крестовка сапфир	*S/+ a/a p/p*	37	4	0	0	58/3	0	1/1	Аномальные гранулы в Э, единичных С
Сапфировый леопард	S^K/+ *a/a p/p*	49/4	11	0	0	33/9	1/1	6/6	Аномальные гранулы в Э и Б, единичных С и Л
Шéдоу-сапфир	S^H/+ *a/a p/p*	61/16	7/1	0	1	25/4	1/1	5/5	Аномальные гранулы в Э и Б, единичных С и примерно в четвертой части Л
Стандартная темно-коричневая	+/+	54,7	6,5	0	0,6	36,8	1,3	0	Дефект не обнаружен
Серебристо-голубая	*p/p*	42,4	6,1	0	0,8	44,5	0,1	6,1	»
Белая-хедлунд	*h/h*	58	5	0	0	35	0	2	»
Жемчужная	*k/k p/p*	41	4	0	0	44	1	10	»
Финский топаз	t^S/t^S *b/b*	41	3	0	0	46	1	9	»
Стандартный леопард	S^K/+	50	5	0	0	38	1	6	»
Куйтежская пестрая	S^K/+ *b/b*	36	6	0	2	55	0	1	»
Королевская серебристая	S^R/+	46	6	0	6	40	0	2	»
Черный хрусталь	C_R/+	33	2	0	0	54	0	11	»
Снежный топаз	C_R/+ t^S/t^S *b/b*	42	1	0	0	56	0	1	»

Примечания. В числителе относительное содержание нормальных, в знаменателе – аномальных лейкоцитов. Здесь и в табл. 2: Л – лимфоциты, М – моноциты, Ю – юные нейтрофилы (метамиелоциты), П – палочкоядерные и С – сегментоядерные нейтрофилы, Э – эозинофилы, Б – базофилы.

вых (*m/m a/a*), трирецессивных виолет (*m/m a/a p/p*), доминантно-рецессивных Крестовка сапфир (*S/+ a/a p/p*), Сапфировый леопард (S^K/+ *a/a p/p*) и Шéдоу-сапфир (S^H/+ *a/a p/p*). Нарушений в структуре лейкоцитов не имеют норки остальных исследованных окрасов, у которых в генотипе отсутствует аллель *a/a* – стандартные (+/+), монорецессивные – серебристо-голубые (*p/p*), белые-хедлунд (*h/h*), дирецессивные – жемчужные (*k/k p/p*), финский топаз (t^S/t^S *b/b*), полудоминантные – королевские серебристые (S^R /+), Стандартный леопард (S^K/+), Черный хрусталь (C_R/+), доминантно-рецессивные – Снежный топаз (C_R /+ t^S/t^S *b/b*) и Куйтежская пестрая (S^K/+ *b/b*).

Сложный характер межгенных взаимодействий затрудняет анализ влияния генов окраски на морфофункциональные особенности лейкоцитов у мутантных форм норок. Вместе с тем можно отметить, что хотя деструктивный эффект аллеля *a/a* и модифицируется генетическим окружением, затрагивающим пигментацию, – генами мойл (*m/m)*, серебристо-голубой окраски (*p/p*) и из серии Black cross (*S/+*, S^H/+, S^K/+), все же девиации субклеточной структуры лейкоцитов в той или иной форме аномально крупных гранул имеют место. Высокая степень нарушения в эозинофилах наблюдается у норки Сапфировый леопард (S^K/+ *a/a p/p*), в нейтрофилах – сапфирового окраса (*a/a p/p)* и Крестовка сапфир (*S/+ a/a p/p*), в лимфоцитах – у мутации Сапфировый леопард (S^K/+ *a/a p/p*) и Шéдоу-сапфир (S^H/+ *a/a p/p*). И наоборот, гранулы эозинофилов норок, в генотипе которых в гомозиготном состоянии присутствует ген мойл (*m/m)* – лавандовой (*m/m a/a*) и виолет (*m/m a/a p/p*), по сравнению с мутацией алеутская (*a/a*) и сапфировая (*a/a p/p)* отличаются меньшей величиной и, по-видимому, снижением выраженности дефекта.

Ген алеутского окраса кроме гранулогенеза в лейкоцитах вызывает изменения в морфологии и функции меланосом – клеточных органелл, родственных лизосомам, что находит выражение в характере пигментации. Если в волосе у темно-коричневых и серебристо-голубых норок наблюдаются относительно однородные гранулы пигмента, то у сапфировых обнаружены их увеличение и значительная вариабельность формы и размера [Зверева, Беляев, 1976].

Сходный с норками целлюлярный дефект обнаружен и у некоторых рецессивных мутаций лисиц и песцов [Ness et al., 1985; Beautiful Fur Animals.., 1988]. Состав лейкоцитарной формулы у лисиц различных генотипов – красной (*A/A B/B*), серебристо-черной (*b/b*), бургундской (*b/b g/g*), жемчужной (*b/b p/p*), коликотт (*b/b e/e*), платиновой (*b/b* $W^P/_w$) и сапфировой (/*b/b p/p s/s*) – представлен в табл. 2. Относительное количество лимфоцитов в крови изменяется от максимальных (55,8%) у серебристо-черных ли-

Таблица 2. Состав лейкоцитарной формулы (M±m) у лисиц различных генотипов

Фенотип	Генотип	Л	М	Нейтрофилы			Б	Э
				Ю	П	С		
Серебристо-черная	*b/b*	55,8±2,1	7,4±0,6	0	0,8±0,4	31,1±2,3	0,2±0,2	4,7±0,8
Красная	*A/A B/B*	38,5±1,5	2,0±2,0	0	2,0±0,0	45,0±8,0	0	12,5±4,5
Бургундская	*b/b g/g*	25,3±2,9	9,7±0,3	0	0,3±0,3	53,0±0,6	0	11,7±2,1
Жемчужная	*b/b p/p*	44,2±4,1	7,8±1,2	0	2,4±1,2	40,2±4,1	0	5,4±0,9
Коликотт	*b/b e/e*	33,0±4,0	8,0±5,0	0	0,5±0,5	53,0±0,0	0	5,5±1,5
Платиновая	*b/b* $W^p/_w$	31,7±7,5	4,7±1,2	0	2,7±0,3	38,0±12,7	1,3±1,3	21,7±6,8
Сапфировая	*b/b p/p s/s**	43,5±3,5	6,0±0,0	0	5,0±2,0	42,0±0,0	0	3,5±1,5

* Обозначен генотип сапфировой лисицы, в крови которой обнаружены аномальные лейкоциты.

сиц до минимальных (25,3%) у бургундских. Содержание нейтрофилов колеблется в пределах 31,1 и 53,0% соответственно. Высокое содержание эозинофилов и повышенная частота встречаемости базофилов выявлены у платиновых лисиц.

Нарушение структуры обнаружено только в гранулоцитах у сапфировых лисиц (*b/b p/p s/s*). Светло-серый с голубым оттенком мех у них определяется сочетанием неаллельных генов жемчужной окраски – жемчужной (*b/b p/p*) и жемчужной Мансфилда (*b/b s/s*) [Колдаева и др., 2003]. Признаков дефекта не выявлено у остальных исследованных генотипов – красной, серебристо-черной, бургундской, жемчужной, коликотт и платиновой. Наши результаты согласуются с данными других авторов, по которым характерные для СЧХ черты наблюдаются у лисиц окраски жемчужная Мансфилда и сапфировая [Ness et al., 1985; Beautiful Fur Animals.., 1988]. У лисиц этих окрасов обнаружен тот же комплекс симптомов врожденной патологии, описанный у норок, гомозиготных по гену алеутского окраса. В частности, у жемчужных лисиц Мансфилда в лейкоцитах наблюдаются гранулы «гигантских» размеров, повышение кровоточивости и, так же как и у сапфировых норок, неравномерное распределение пигментных зерен разной величины в волосе. Нарушение свертываемости вследствие неполноценности тромбоцитов является причиной анемии у самок, имеющих большие пометы, и отставания в развитии щенков.

Согласно литературным данным, признаки, свойственные СЧХ, есть также у редкой мутантной формы голубых песцов – мутации арктик блу (*g/g*). Установлено, что жизнеспособность и репродуктивные качества у арктик блу ниже, чем у лисиц, имеющих дефект лейкоцитов, а клиническая картина заболевания тяжелее [Ness et al., 1985; Beautiful Fur Animals.., 1988].

У лисиц нам не удалось провести детальное, как у норок, исследование морфологических изменений структуры лейкоцитов, однако с уверенностью можно констатировать, что норки и лисицы различаются между собой по степени дефекта, то есть по величине, количеству и морфологии гранул, что может обусловливать различия в устойчивости к факторам среды.

У шестимесячных щенков сапфировых норок процесс формирования «гигантских» гранул в лейкоцитах наблюдался в костном мозге [Узенбаева и др., 2010]. Аномальный гранулогенез обнаруживается на всех этапах развития, включая клеточные элементы пролиферирующего пула и в постмитотическом периоде (рис. 3 Д–З). Направленность изменений в эозинофилах и нейтрофилах одинакова, но имеются особенности в формировании аномальных структур, возможно, связанные с продолжительностью отдельных фаз гранулоцитопоэза. Различия, по-видимому, также могут быть обусловлены функциональными особенностями этих типов гранулоцитов, в частности наличием в нейтрофилах мощного потенциала для внутриклеточной деградации и киллинга, а в эозинофилах – факторов антипаразитарной защиты.

У сапфировых норок даже на светооптическом уровне в лейкоцитах можно наблюдать процесс аномального гранулогенеза. На ранних этапах созревания гранулы в эозинофилах у норок сапфирового окраса значительно больше по величине, чем у темно-коричневых, и они достаточно однородны и без признаков слияния (см. рис. 3 Д–З). Возможно, у сапфировых норок по сравнению с другими окрасами изначально образуются более крупные гранулы, которые еще больше увеличиваются по мере созревания и достигают максимальной величины в периферической крови. Объяснить этот факт можно также с точки зрения нарушений в аппарате Гольджи и эндоплазматическом ретикулуме, участвующих в синтезе и сортировке белков. Вместе с тем, согласно электронно-микроскопическим исследованиям, изменений в этих структурах при этом наследственном заболевании не обнаружено. В нейтрофилах, в отличие от эозинофилов, образование единой аномальной структуры, состоящей из мелких гранул и менее плотного светлого матрикса, наблюдается уже на ранней стадии – в миелоцитах (см. рис. 3 А–Г).

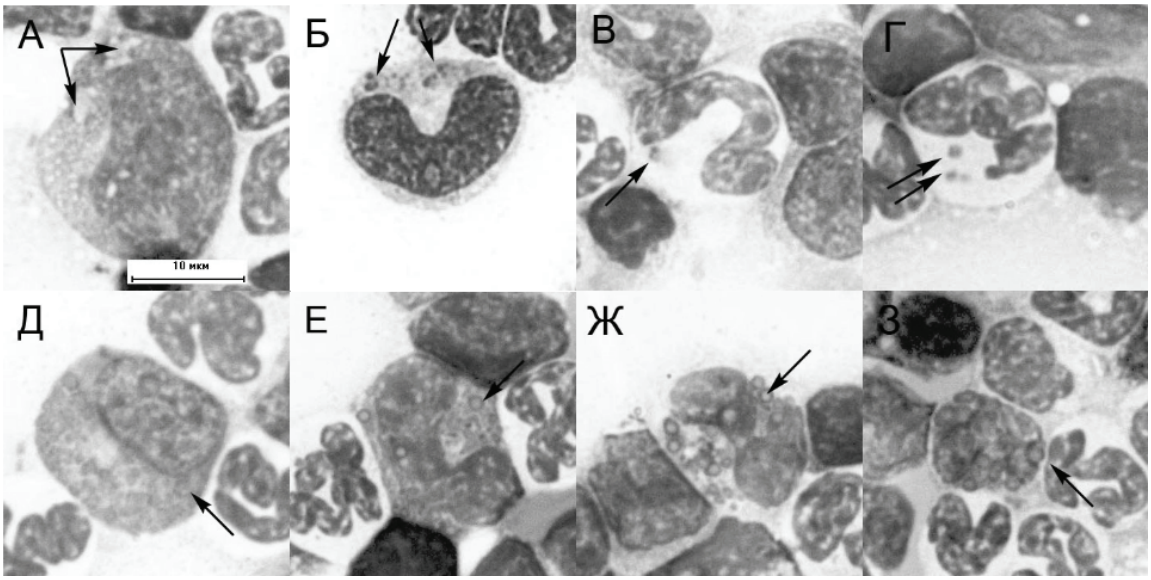


Рис. 3. Костный мозг норки сапфирового окраса

Нейтрофильные миелоцит (А) и метамиелоцит (Б), палочкоядерный (В) и сегментоядерный (Г) нейтрофилы и эозинофильные миелоцит (Д) и метамиелоцит (Е), палочкоядерный (Ж) и сегментоядерный (З) эозинофилы. В цитоплазме видны «гигантские» гранулы (отмечены стрелками)

При сравнительном исследовании гранулогенеза у десятидневных и шестимесячных сапфировых норок было выявлено, что дефект в эозинофилах в раннем постнатальном онтогенезе выражен слабее. В зрелых нейтрофилах и их предшественниках не удалось за некоторыми исключениями установить достоверных отличий в количестве и величине гранул между десятидневными и шестимесячными щенками.

Таким образом, промышленная доместикация пушных зверей привела к образованию различных окрасов, отличающихся между собой по некоторым морфофизиологическим и биохимическим признакам. У норок с геном алеутского (*a/a*) окраса в гомозиготном состоянии и у сапфировых лисиц (*b/b p/p s/s*) наблюдается наследственный дефект лейкоцитов. Формирование аномальных гранул в лейкоцитах происходит на ранних стадиях созревания в костном мозге. Показано, что норки и лисицы, а также норки различных генотипов имеют неодинаковую степень дефекта, который обусловливает дисфункцию лейкоцитов и ослабление защитно-барьерной функции организма.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ НШ–3731.2010.4.

Литература

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 лейкозологии. 1972. Вып. 2. С. 239–255.

Голубева А. Г., Узенбаева Л. Б., Илюха В. А., Тютюнник Н. Н. Дефект лейкоцитов у разводимых в условиях фермы пушных зверей // Кролиководство и звероводство. 2010. № 4. С. 25–27.

Зверева Л. П., Беляев Д. К. Феногенетический анализ пигментации у мутантов американской норки (*Mustela vison* Schr.). Сообщение I. Эффект мутаций стальной голубой, серебристо-голубой и их компаунда на распределение пигмента в волосе // Генетика. 1976. Т. 12, № 2. С. 97–103.

Кисляк Н. С., Ленская Р. В. Клетки крови у детей в норме и при патологии. М.: Медицина, 1978. 256 с.

Колдаева Е. М., Милованов Л. В., Трапезов О. В. Породы пушных зверей и кроликов. М.: Колос, 2003. 240 с.

Обозная Э. И., Панков Е. Я. Цитохимия костного мозга при криоконсервировании. Атлас. Киев: Наукова думка, 1989. 256 с.

Узенбаева Л. Б., Кижина А. Г., Илюха В. А., Тютюнник Н. Н. Мутантные норки как модель в биомедицинских исследованиях // Труды Карельского научного центра РАН. 2010. № 2. С. 52–61.

Узенбаева Л. Б., Трапезов О. В., Кижина А. Г. и др. Влияние мутаций, затрагивающих окраску меха, на структуру лейкоцитов крови у американской норки (*Mustela vison* Schreber, 1777) // Генетика. 2011. Т. 47, № 1. С. 87–94.

Хейхоу Ф. Г., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. М.: Медицина, 1983. 211 с.

Шубич М. Г., Нагоев Б. С. Щелочная фосфатаза лейкоцитов в норме и патологии. М.: Медицина, 1980. 224 с.

Beautiful Fur Animals – and their colour genetics / Ed. G. Jurgensen. Glostpup: Scientifur, 1988. 271 p.

Chediak M. Nouvelle anomalie leucocytaire de caractere constitutionnel et familial // Rev. Hemat. 1952. Vol. 7. P. 362–367.

Higashi O. Congenital gigantism of peroxidase granules. The first case ever reported of qualitative abnormality of peroxidase // Tohoku J. Exp. Med. 1954. Vol. 59. P. 315–332.

Huizing M., Helip-Wooley A., Westbroek W. et al. Disorders of lysosome-related organelle biogenesis: clinical and molecular genetics // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2008. Vol. 9. P. 359–386.

Introne W., Boissy R. E., Gahl W. A. Clinical, molecular, and cell biological aspects of Chediak–Higashi syndrome // Mol. Genet. Metab. 1999. Vol. 68, N 2. P. 283–303.

McVey Ward D., Griffiths G. M., Stinchcombe J. C., Kaplan J. Analysis of lysosomal storage disease Chediak-Higashi syndrome // Traffic. 2000. Vol. 1. P. 816–822.

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 // Scientifur. 1985. Vol. 9, N 3. P. 197–199.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кижина Александра Геннадьевна
главный биолог
ИБ КарНЦ 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.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
тел. (8142) 573107

Илюха Виктор Александрович
зав. лаб. экологической физиологии животных, д.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: ilyukha@krc.karelia.ru
тел. (8142) 573107

Тютюнник Николай Николаевич
главный научный сотрудник, д.с.-х.н., профессор
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: tyutyunnik@krc.karelia.ru
тел. (8142) 573107

Трапезов Олег Васильевич
заведующий сектором генетики куньих, к.б.н.
Институт цитологии и генетики СО РАН
пр. Лаврентьева, 10, Новосибирск, Россия, 630090
эл. почта: trapezov@bionet.nsc.ru
тел. (383) 3333859

Шумилина Наталия Николаевна
д.с.-х.н., профессор
Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К. И. Скрябина
пр. Академика Скрябина, 23, Москва, Россия, 109472
эл. почта: shumilina51@mail.ru
тел. (495) 3776730

Ларина Елена Евгеньевна
аспирант
Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К. И. Скрябина
пр. Академика Скрябина, 23, Москва, Россия, 109472
эл. почта: kfa_zverovod@mgavm.ru
тел. (495) 3776730

Kizhina, Alexandra
Institute of Biology, Karelian Research Center,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: golubewa81@yandex.ru
tel. (8142) 573107

Uzenbaeva, Lyudmila
Institute of Biology, Karelian Research Center,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
tel. (8142) 573107

Ilyukha, Victor
Institute of Biology, Karelian Research Center,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: ilyukha@krc.karelia.ru
tel. (8142) 573107

Tyutyunnik, Nikolay
Institute of Biology, Karelian Research Center,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: tyutyunnik @krc.karelia.ru
tel. (8142) 573107

Trapezov, Oleg
Institute of Cytology and Genetic,
Siberian Branch, Russian Academy of Science
10 Lavrenteva St., 630090
Novosibirsk, Russia
e-mail: trapezov@bionet.nsc.ru
tel. (383) 3333859

Shumilina, Natalya
K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotecnology
23 Academic Skryabin St., 109472
Moskow, Russia
e-mail: shumilina51@mail.ru
tel. (495) 3776730

Larina, Elena
K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotecnology
23 Academic Skryabin St., 109472
Moskow, Russia
e-mail: kfa_zverovod@mgavm.ru
tel. (495) 3776730

Труды Карельского научного центра РАН
№ 3. 2011. С. 69–72.

УДК 577.3:574.152.632

АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ В ОРГАНАХ ЩУК (*ESOX LUCIUS* L.), ОТЛОВЛЕННЫХ ИЗ ОЗЕР С РАЗЛИЧНОЙ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКОЙ

М. Ю. Крупнова, Н. В. Ильмаст, Н. Н. Немова

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Исследована активность основных лизосомальных протеиназ (катепсинов D и B) в органах щук (*Esox lucius* L.) из озер с различной антропогенной нагрузкой. Результаты свидетельствуют об участии катепсинов в реализации защитной функции лизосом у исследованных рыб в ответ на повышенное содержание лития, калия, сопутствующих анионов, сдвиг pH и взмученность в хранилище отходов горнообогатительного комбината.

Ключевые слова: протеиназы, лизосомы, рыбы, экология.

M. Yu. Krupnova, N. V. Ilmast, N. N. Nemova. ACTIVITY OF LYSOSOMAL PROTEINASES IN ORGANS OF PIKE (*ESOX LUCIUS* L.) FROM LAKES WITH DIFFERENT ANTHROPOGENIC PRESSURE

We investigated the activity of basic lysosomal proteinases (cathepsins D & B) in organs of pike (*Esox lucius* L.) from lakes exposed to different degrees of human pressure. The results evidence that cathepsins play a part in enacting the lysosomes' protective function in the fish in response to elevated concentrations of lithium, potassium, accompanying anions, shift in pH, and sediment detachment in the tailings dump of the mining and ore concentration mill.

Key words: proteinases, lysosomes, fish, ecology.

Введение

Действие на организм различных факторов внешней среды, в том числе экологических, сопровождается вовлечением клеточных и молекулярных механизмов регуляции гомеостаза. Среди множества таких механизмов важное место занимает протеолиз, являющийся (в силу своей необратимости) прерогативой выживания организмов [Баррет, Хит, 1980]. Ферментативные превращения и экскреция чужеродных соединений осуществляются с участием протеолитической системы лизосом, включающей более 20 ферментов, из которых почти 90 % связано с активностью катепсинов B и D [Дин, 1981]. Лизосомальные протеиназы (катепсины D и B) являются биохимическими индикаторами изменения протеолитической функции лизосом в развитии биохимических адаптаций у водных организмов в ответ на воздействие неблагоприятных факторов различной природы [Немова, Высоцкая 2004; Высоцкая, Немова, 2008].

Катепсин D относится к группе «аспартильных» протеиназ, так как в активном центре группы кислых протеиназ, аналогичных по своему действию пепсину, принимают участие карбоксильные группы остатков аспарагино-

вой кислоты. Этот фермент гидролизует только белковые субстраты и поэтому определяется главным образом по измерению продуктов деградации белков [Barrett, 1998]. В лизосомном протеолизе катепсин D преимущественно действует синергически с цистеиновыми протеиназами, которые, вероятно, имеют еще большее значение в деградации многих белков и с другими эндопептидазами.

В статье приведены результаты исследования активности лизосомальных протеиназ в органах щук из двух водоемов Республики Карелия – озер Каменное и Костомукшское.

Материал и методы

Озеро Каменное практически не затронуто хозяйственной деятельностью, промысел рыбы в нем отсутствует, о чем свидетельствует большое число старших возрастных групп рыб в ихтиоценозе. Данные исследований состояния ихтиофауны водоема свидетельствуют о крайне незначительном антропогенном воздействии. С рыбохозяйственной точки зрения озеро относится к высшей категории водных объектов, так как в нем обитают такие ценные виды, как лосось, сиг, ряпушка. В целом экосистема оз. Каменное, и в частности ихтиофауна, сохраняет естественное состояние и близка к «ненарушенным природным экосистемам». Озеро Костомукшское – верхний водоем системы р. Кенти (частный водосбор р. Кеми). В результате строительства дамбы озеро преобразовано в технологический водоем Костомукшского горнообогатительного комбината (хвостохранилище). Водоем служит для захоронения отходов производства (хвостов обогащения, которые в виде пульпы поступают в водоем) и оборотного водоснабжения. Общая минерализация воды в период исследования колебалась от 625 (дно 12 м) до 645 мг/л (поверхность), концентрация ионов калия составила 156 мг/л, натрия – 18, кальция – 38, магния – 18, хлоридов – 7, гидрокарбонатных ионов – 122; величина общего азота – 15 мг/л, общего фосфора – 0,0070–0,12 мг/л; pH –7,4–7,5 [Lehto et al., 2010]. Таким образом, по сравнению с показателями, полученными в более ранних (2000 г.) исследованиях, наблюдается значительное увеличение общей минерализации воды и уменьшение водородного показателя. Сдвиг pH воды от щелочной в кислую область может разрушить так называемый геохимический барьер, что приведет к увеличению в воде концентраций тяжелых металлов и нежелательному их накоплению в биоте хвостохранилища и расположенных ниже водоемах. Обедненность видового состава ихтиофауны и ее низкие количественные показатели свидетельствуют об угнетенном состоянии планктонной фауны хвостохранилища. В уловах 2009 г. были отмечены только четыре вида (плотва, щука, сиг, уклейка) рыб. Обращает на себя внимание отсутствие в озере окуневых (окунь, ерш) видов – типичных представителей северных водоемов. Большие концентрации щелочных и щелочно-земельных металлов, а также гидрокарбонатов в воде определили сдвиг pH в щелочную область. Подобные условия представляют собой геохимический барьер для миграции большинства тяжелых металлов. Несмотря на то что хвостохранилище является технологическим водоемом горнообогатительного комбината, куда поступают производственные воды, видимых патологических изменений наружных покровов и внутренних органов у рыб не отмечено, внутреннее состояние органов у щук из исследованных водоемов идентично. При анализе размерно-весовых параметров у щуки из разных водоемов достоверных изменений веса не обнаружено.

Материалом для исследований служили печень, почки, жабры, гонады и мышцы щуки из этих водоемов. Активность основных протеиназ лизосом – катепсинов B и D – определяли в осветленных гомогенатах тканей рыб, которые готовили на 0,25М растворе сахарозы (1:10) с добавлением 0,01% раствора тритона X-100 (1200 об/мин x 60 с). Дифференциальное центрифугирование гомогенатов для получения субклеточных фракций проводили на центрифуге K-24 (Германия) [Покровский, Тутельян, 1976]. Активность катепсинов B и D определяли спектрофотометрически. Активность катепсина B оценивали по гидролизу 0,065М раствора этилового эфира бензоиларгинамида в 0,1М ацетатном буфере pH 5,0 [Алексеенко, 1968], катепсина D – бычьего гемоглобина при pH 3,6 [Алексеенко, 1968] соответственно. Активность ферментов выражали в условных единицах: катепсина D – при 280нм на мг белка, катепсина B – при 525нм на мг белка. Концентрацию белка в пробах определяли по методу Брэдфорд [Braedford, 1976].

Результаты и обсуждение

Результаты изучения активности протеолитических ферментов и содержания белка в органах щук из разных водоемов представлены на рис. 1–3.

Наиболее высокие значения активности катепсина D у щук как из оз. Каменное, так и из оз. Костомукшское отмечены в почках, печени, несколько в меньшей степени – в гонадах самцов и самок, в жабрах и наименьшие – в мышцах (см. рис. 1). Не обнаружено существенных различий в уровне активности протеиназ в зависимости от пола исследуемого объекта. В печени, жабрах и гонадах самок активность данного фермента несколько ниже у щук из оз. Костомукшское по сравнению с данными показателя-

ми у щук из оз.Каменное. Аналогичная тенденция, за исключением активности катепсина D в печени, отмечена и для самцов, где данный показатель в почках, мышцах, жабрах и гонадах снижается приблизительно в 2–3 раза. Снижение уровня активности катепсина D в жабрах (более чем в 2 раза), которые являются основным «фильтром» и в первую очередь подвергаются влиянию какого-либо соединения, подтверждает участие этого фермента в детоксикационных процессах, происходящих в лизосомах [Высоцкая, Немова, 2008; Крупнова и др., 2010].

Активность катепсина B сравнительно низкая в органах щук из обоих водоемов (см. рис. 2). При этом отмечено некоторое повышение активности в печени самок и самцов и жабрах самцов щук, выловленных в оз. Костомукшское. Существенная (более чем в 60 раз) активация данного фермента наблюдается в почках самцов из хвостохранилища. Известно, что в условиях хронической интоксикации активно функционируют органы, осуществляющие процессы захвата, обезвреживания токсикантов и экскреции [Покровский, Тутельян, 1976]. Возможно, в связи с изменениями химического состава минералов хвостов, а именно повышенного содержания солей лития и калия, ведущих к выщелачиванию различных компонентов, а вследствие этого и к изменению гидрохимических показателей воды хвостохранилища, наблюдается столь значительное повышение активности цистеинзависимой протеиназы в почках. Некоторые различия в изменении активности катепсинов B и D связаны, вероятно, с тем, что катепсин B относится к ферментам, в состав активного центра которых входит высокореактивная тиоловая группа цистеина, вступающая в химические взаимодействия с тяжелыми металлами и другими химическими группировками поллютантов. Защелачивание водоема хвостохранилища в результате воздействия отходов ГОКа может оказывать ингибирующее влияние на активность катепсина D, для проявления которой необходимы кислотные группировки аспарагиновой кислоты, входящей в состав активного центра фермента.

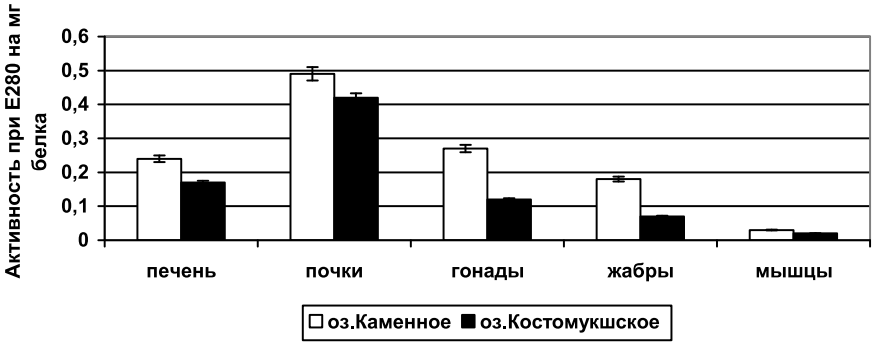


Рис. 1. Активность катепсина D (E_{280} мг белка/1ч) в органах самцов и самок щук из озер Каменное и Костомукшское (хвостохранилище отходов)

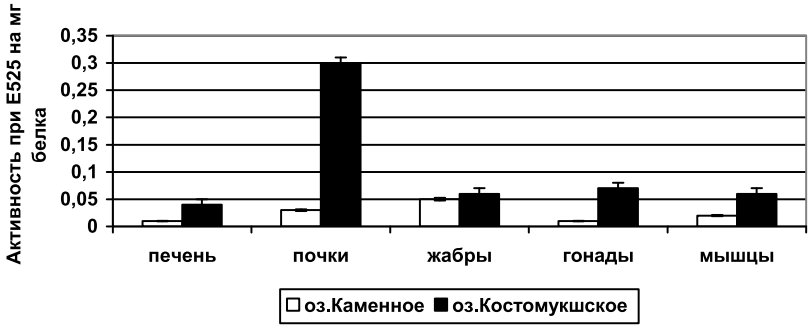


Рис. 2. Активность катепсина B (E_{525} мг белка/30 мин) в органах самцов и самок щук из озер Каменное и Костомукшское (хвостохранилище отходов)

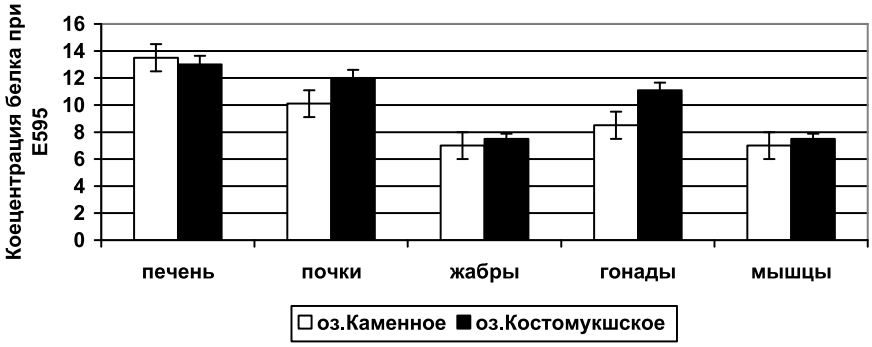


Рис.3. Содержание белка (мг/мл) в органах самцов и самок щук из озер Каменное и Костомукшское (хвостохранилище отходов)

Показатели содержания белка (см. рис. 3) в тканях самцов и самок щук рыб из «контрольного» и «опытного» озер близки или чуть выше в органах рыб из оз. Костомукшское, исключением является уровень белка в гонадах самок из хвостохранилища, что связано, по-видимому, со стадией зрелости.

Следует отметить и тот факт, что, по данным ихтиологических исследований, в опытном водохранилище количество самцов ниже, чем самок, это связывают с их меньшей устойчивостью к неблагоприятным факторам среды.

Полученные результаты свидетельствуют об участии катепсинов в реализации защитной функции лизосом у исследованных рыб в ответ на воздействие антропогенной нагрузки, связанной с деятельностью горнообогатительного комбината (повышенное содержание лития и калия, сопутствующих анионов, сдвиг pH и взмученность). Данные показатели (активность цистеинзависимых и аспартильных протеиназ) могут быть использованы в качестве дополнительных биохимических тестов на загрязнение водоемов вышеназванными факторами.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов программы Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-3731.2010.4, РФФИ № 08-04-01140-а, программы ОБН РАН «Биологические ресурсы».

Литература

Алексеенко Л. П. Определение активности протеиназ по расщеплению белковых субстратов // Современные методы в биохимии. М.: Медицина. 1968. Т. 2. С. 112.

Баррет А. Дж., Хит М. Ф. Лизосомальные ферменты // Лизосомы. Методы исследования. М.: Мир, 1980. С. 25–156.

Высоцкая Р. У., Немова Н. Н. Лизосомы и лизосомальные ферменты рыб // М.: Наука, 2008. 284 с.

Дин Р. Процессы распада в клетке. М.: Мир, 1981. 120 с.

Крупнова М. Ю., Немова Н. Н., Скидченко В. С. Влияние солей меди и кадмия на активность лизосомальных протеиназ мидий *Mytilus edulis* L. // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: Сб. науч. ст. Петрозаводск, 2010. Т. 1. С. 84–88.

Немова Н. Н., Высоцкая Р. У. Биохимическая индикация состояния рыб // М.: Наука, 2004. 214 с.

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

Barrett A. J., Rawlings N. D., Woesner J. F. Handbook of proteolytic enzymes. L.: Academic Press., 1998. 1666 p.

Braedford 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.

Lehto J., Lusa M., Virkanen J. et al. Metal distribution in lakes surrounding the Kostomuksha iron mine and ore dressing mill in Northwestern Russia // Air, Soil and Water Research. 2010. Vol. 3. P. 67–77.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Крупнова Марина Юрьевна
старший научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: mukrupnova@rambler.ru
тел. (8142) 571879

Ильмаст Николай Васильевич
ведущий научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: ilmast@krc.karelia.ru
тел. (8142) 571879

Немова Нина Николаевна
директор ИБ КарНЦ РАН, зав. лаб. экологической физиологии растений, д.б.н., проф., чл.-корр. РАН
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: nemova@krc.karelia.ru
тел. (8142) 783615

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

Ismast, Nikolai
Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: ilmast@krc.karelia.ru
tel. (8142) 571879

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

Труды Карельского научного центра РАН
№ 3. 2011. С. 73–77.

УДК 581.1

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *ci7* В ЛИСТЬЯХ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ДЕЙСТВИИ КРАТКОВРЕМЕННЫХ ЕЖЕСУТОЧНЫХ СНИЖЕНИЙ ТЕМПЕРАТУРЫ

В. В. Лаврова, М. И. Сысоева, Е. Г. Шерудило, Л. В. Топчиева, Е. М. Матвеева

Институт биологии Карельского научного центра РАН

На растениях картофеля (*Solanum tuberosum* L., с. Сударыня и с. Невский) изучено влияние ежесуточных кратковременных и постоянных низкотемпературных воздействий на холодоустойчивость и экспрессию COR гена *ci7*. Показано, что прирост холодоустойчивости у растений, подвергнутых ежесуточным кратковременным снижениям температуры, был в 5–6 раз выше, чем при постоянном действии низкой температуры. При этом уровень экспрессии гена *ci7* в листьях картофеля был одинаковым при разных типах низкотемпературных воздействий. Предполагается, что повышение устойчивости растений картофеля к кратковременному воздействию низких температур опосредовано не только изменением экспрессии COR гена *ci7*, но и иными механизмами.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum* L., температура, устойчивость, COR гены, ген *ci7.*

V. V. Lavrova, M. I. Sysoeva, E. G. Sherudilo, L. V. Topchieva, E. M. Matveeva. EXPRESSION OF *ci7* GENE IN POTATO LEAVES UNDER SHORT-TERM TEMPERATURE DROP

The effects of daily short-term and constant low-temperature treatments on cold resistance and expression of the COR gene *ci7* in potato plants (*Solanum tuberosum* L., cv. Sudarynya & Nevskiy) has been studied. The rise in cold resistance of the plants daily exposed to short-term temperature drop was 5-6 times higher than in the plants constantly exposed to low temperature. The level of *ci7* gene expression in potato leaves was the same at different modes of exposure to cold. It is suggested that the rise in potato plant resistance to short-term low temperature drop is achieved not only by means of change in expression of the COR gene *ci7* but also through other mechanisms.

Key words: *Solanum tuberosum* L., temperature, resistance, COR genes, *ci7 gene.*

Введение

В природе широко распространены кратковременные падения температур в суточном цикле, которые согласно одному из сценариев изменения климата будут значительно усиливаться, особенно в ранневесенний период [Филатов и др., 2003]. Наряду с этим кратковременные снижения температуры широко используются в современном растениеводстве в качестве одного из приемов выращивания компактных растений [Moe, Heins, 2000]. Как

показано ранее, они оказывают влияние на биологическую продуктивность и скорость развития растений, а также способствуют увеличению их холодоустойчивости [Марковская и др., 2008]. Причем механизмы формирования устойчивости при постоянных и кратковременных низкотемпературных воздействиях различны [Марковская и др., 2007].

Известно, что важную роль в механизмах повышения устойчивости растений к действию неблагоприятных температур играют гены холодового шока, в частности COR гены, кодирующие белки, которые могут контролировать в растительном организме биологические и физиологические изменения, необходимые для роста и развития при низких температурах [Колесниченко, Войников, 2003; Трунова, 2007; Thomashow, 1998]. В настоящее время активно изучается экспрессия COR генов при действии постоянной низкой положительной температуры [Kirch et al., 1997; Thomashow, 1998; Wanner, Junttila, 1999]. В то же время информация об экспрессии COR генов при кратковременном периодическом действии низкой закаливающей температуры в доступной нам литературе отсутствует. В связи с этим целью настоящей работы было изучение влияния кратковременных ежесуточных снижений температуры на экспрессию COR гена *ci7* в листьях растений картофеля.

Материалы и методы

Опыты проводили с двумя сортами картофеля (*Solanum tuberosum* L.) Сударыня и Невский, районированными на территории Республики Карелия. Мини-клубни картофеля, полученные в ГНУ «Карельская ГСХОС Россельхозакадемии», проращивали стандартным способом на свету в течение трех недель, высаживали в пластиковые сосуды с песком при поливе питательным раствором Кнопа с добавлением микроэлементов (pH 5,5–5,6) и помещали в камеру искусственного климата при температуре 23°С, фотопериоде (день/ночь) 16/8 ч и освещенности 10 клк. По достижении фазы 3-х листьев часть растений оставляли при 23°С (вариант контроль), а остальные либо подвергали в течение 6 суток ежесуточным снижениям температуры (с 23 до 5°С) на 2 ч в конце ночного периода (вариант ДРОП, от англ. drop – падение), либо выращивали в течение 6 суток при постоянной низкой температуре 5°С (вариант ПНТ). На следующий день после завершения температурных обработок анализировали холодоустойчивость и исследовали экспрессию COR гена у растений всех вариантов.

Холодоустойчивость растений определяли по температуре ($ЛТ_{50}$), вызывающей гибель 50% палисадных клеток паренхимы высечек из листа площадью 0,5 $см^2$ после их 5-минутного тестирующего промораживания в термоэлектрическом термостате ТЖР-02/-20 («Интерм», Россия) в интервале температур от -6 до -10°С с шагом 0,4°С [Дроздов и др., 1976].

Для выделения РНК навеску листьев картофеля (50 мг) растирали в жидком азоте. Тотальную РНК выделяли с помощью набора Yellow Solve («Силекс», Россия). Степень чистоты и концентрацию РНК определяли спектрофотометрически на приборе SmartSpec Plus (Bio-Rad, США). Для удаления остатков ДНК препарат РНК обрабатывали ДНКазой (10 ед./мл) («Силекс», Россия). Уровень экспрессии генов оценивали методом ПЦР в режиме реального времени. В качестве флуорофора для детекции продуктов использовали интеркалирующий краситель SYBR Green. Амплификацию проводили в приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 (Bio-Rad, США), используя набор для амплификации («Синтол», Россия). Смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала 2 мкл (100 нг) тотальной РНК, 5 мкл реакционной смеси, по 0,5 мкл прямого и обратного праймеров, 16 мкл воды, свободной от нуклеаз, 1 мкл $MgCl_2$. Для ПЦР в режиме реального времени использовали праймеры («Синтол», Россия): прямой – 5' CAC AAT CAT AAC ATC CCA AA 3', обратный – 5' GCG GAC ATA AGA AGA CG 3'. Протокол ПЦР: 40 циклов – 10 с при 95°С и 30 с при 55°С. Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР фрагментов: 1 мин при 95°С, 1 мин при 55°С, 10 с при 55°С (80 циклов, в каждом из которых температура повышалась на 0,5°С). Уровень экспрессии гена *ci7* растений, подвергнутых низкотемпературному воздействию, был рассчитан относительно уровня экспрессии этого гена у растений контрольного варианта (не подвергнутых низкотемпературному воздействию).

Средние арифметические значения из двух независимых опытов и их стандартные ошибки представлены на рис. 1, 2. Повторность при оценке холодоустойчивости – 6-кратная, при ПЦР-анализе – 2-кратная. Данные обработаны статистически с использованием пакета программ Statgraphics for Windows 7.0. В статье обсуждаются величины, достоверно различающиеся при $P \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ холодоустойчивости растений картофеля показал, что при кратковременном ежесуточном снижении температуры (вариант ДРОП) прирост холодоустойчивости относительно контроля для с. Сударыня соста-

вил 2,7°С, для с. Невский – 2,9°С (см. рис. 1). В то же время постоянное действие низкой закаливающей температуры (вариант ПНТ) вне зависимости от сорта вызвало значительно меньшее по сравнению с ДРОП увеличение холодоустойчивости, прирост которой достигал только 0,5°С (см. рис. 1). Ранее подобный эффект отмечался и на других видах растений (огурце, петунии, кукурузе, пшенице, капусте белокочанной), что дало возможность высказать предположение о разных механизмах формирования устойчивости в ответ на постоянное и кратковременное действие низкой температуры [Марковская и др., 2007].

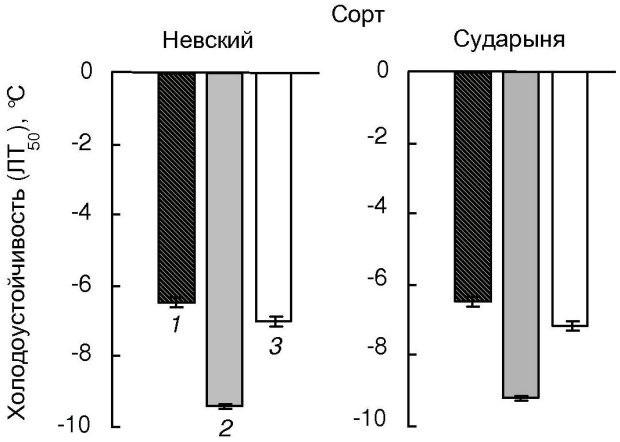


Рис. 1. Холодоустойчивость растений картофеля при кратковременном (ДРОП) и постоянном (ПНТ) действии низкой закаливающей температуры (5°С)

1 – контроль, *2* – ДРОП, *3* – ПНТ

Из литературы известно, что постоянное действие низкой (4°С) температуры индуцировало экспрессию COR гена *ci7* в клубнях и листьях картофеля [Kirch et al., 1997]. Нами также выявлено увеличение экспрессии данного гена в листьях растений, подвергнутых постоянному действию низкой закаливающей температуры (см. рис. 2). Вместе с тем, как показали результаты нашего эксперимента, не только постоянные, но и кратковременные снижения температуры вызвали экспрессию гена *ci7* в листьях картофеля (см. рис. 2), причем у обоих изученных сортов уровень экспрессии был одинаковым при разных типах низкотемпературных воздействий. Интересно, что, если для достижения максимального уровня экспрессии гена *ci7* при ПНТ требовалось 72 ч низкотемпературного воздействия [Berkel et al., 1994; Kirch et al., 1997], то при периодической кратковременной низкотемпературной обработке в нашем эксперименте подобный эффект достигался уже при 12 ч суммарного действия низкой температуры (6 сут по 2 ч).

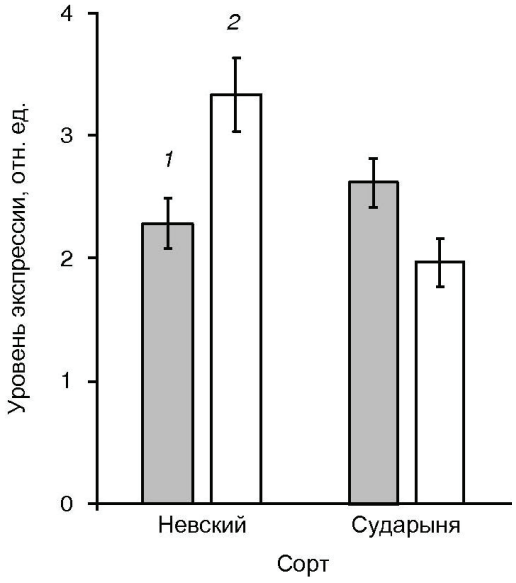


Рис. 2. Изменение уровня экспрессии гена *ci7* при кратковременном (ДРОП) и постоянном (ПНТ) действии низкой закаливающей температуры (5°С) в листьях растений картофеля

1 – ДРОП, *2* – ПНТ. Уровень экспрессии гена у контрольных растений (при 23°С) принят за единицу

Таким образом, как кратковременное низкотемпературное воздействие, так и постоянное действие низкой температуры индуцировали практически одинаковый уровень экспрессии COR гена *ci7* в листьях картофеля, однако величина прироста холодоустойчивости листьев в вариантах ДРОП и ПНТ существенно различалась. Выявленные различия в величине холодоустойчивости при двух видах низкотемпературного воздействия позволяют предположить, что значительно более высокий уровень устойчивости к низкой температуре в варианте ДРОП по сравнению с вариантом ПНТ может быть обусловлен не только экспрессией COR гена *ci7*, но и иными механизмами. Ранее нами было показано, что при периодических низкотемпературных воздействиях растения находятся в функционально активном состоянии, характеризующимся стимуляцией метаболических процессов, увеличением продуктивности, ускорением развития, в то время как постоянное действие низкой температуры вызывает снижение метаболической активности у растений [Марковская и др., 2008]. Было высказано предположение о том, что немаловажную роль в повышении холодоустойчивости растений при кратковременных низкотемпературных воздействиях играют фотоассимиляты [Марковская и др., 2008]. Об этом свидетельствуют, в частности, результаты анализа ком-

понентов водорастворимой фракции углеводов, выявившие существенные различия двух видов низкотемпературного воздействия – ДРОП и ПНТ [Марковская и др., 2010]. Растения варианта ДРОП характеризовались наличием двух пулов сахаров, участвующих как в формировании устойчивости, так и в активации метаболизма, что и обеспечивало нахождение таких растений в состоянии повышенной функциональной активности и высокого уровня холодоустойчивости. Именно это играет большую роль при адаптации растений к условиям нестабильного суточного температурного режима в период активной вегетации, являясь одной из составляющих онтогенеза растений в норме.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 10-04-00097) и проекта ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (№ г.к. П1299).

Литература

Дроздов С. Н., Курец В. К., Будыкина Н. П., Балагурова Н. И. Определение устойчивости растений к заморозкам // Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды. Л.: Колос, 1976. С. 222–228.

Колесниченко А. В., Войников В. К. Белки низкотемпературного стресса растений. Иркутск: Арт-Пресс, 2003. 196 с.

Марковская Е. Ф., Шерудило Е. Г., Галибина Н. А., Сысоева М. И. Роль углеводов в реакции теплолюбивых растений на кратковременные и длительные низкотемпературные воздействия // Физиология растений. 2010. Т. 57, № 5. С. 687–694.

Марковская Е. Ф., Сысоева М. И., Шерудило Е. Г., Топчиева Л. В. Дифференциальная экспрессия генов в растении огурца в ответ на многократные кратковременные низкотемпературные воздействия // Физиология растений. 2007. Т. 54, № 5. С. 686–691.

Марковская Е. Ф., Сысоева М. И., Шерудило Е. Г. Феномен ежесуточного кратковременного влияния низких закаливающих температур на жизнедеятельность растения // Онтогенез. 2008. Т. 39, № 5. С. 323–332.

Трунова Т. И. Растение и низкотемпературный стресс. М.: Наука, 2007. 54 с.

Филатов Н. Н., Назарова Л. Е., Сало Ю. А., Семенов А. В. Динамика и прогноз изменения климата Восточной Фенноскандии // Гидроэкологические проблемы Карелии и использования водных ресурсов. Петрозаводск: изд-во Карельского научного центра РАН, 2003. С. 33–39.

Berkel J., Salamini F., Gebhardt C. Transcripts accumulating during cold storage of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers are sequence related to stress-responsive genes // Plant Physiology. 1994. Vol. 104. P. 445–452.

Kirch H. H., Berkel J., Glaczinski H., Salamini F., Gebhardt C. Structural organization, expression and promoter activity of a cold-stress-inducible gene of potato (*Solanum tuberosum* L.) // Plant Mol. Biol. 1997. Vol. 33. P. 897–909.

Moe R., Heins R. D. Thermo- and photomorphogenesis in plants // Adv. Floriculture Res. Agric. Univ. of Norway. 2000. Rep. N 6. P. 52–64.

Thomashow M. F. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance // Plant Physiol. 1998. Vol. 118. P. 1–7.

Wanner L. A., Junttila O. Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 1999. Vol. 120. P. 391–399.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Лаврова Виктория Витальевна
аспирант
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: vicandra@mail.ru
тел. (8142) 762706

Сысоева Марина Ивановна
главный научный сотрудник, д.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: sysoeva@krc.karelia.ru
тел. (8142) 762706

Шерудило Елена Георгиевна
старший научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: sherudil@krc.karelia.ru
тел. (8142) 762706

Lavrova, Victoria
Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: vicandra@mail.ru
tel. (8142) 762706

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

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

Топчиева Людмила Владимировна
старший научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: topchieva@krc.karelia.ru
тел. (8142) 571879

Матвеева Елизавета Михайловна
старший научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: matveeva@krc.karelia.ru
тел. (8142) 783622

Topchieva, Lyudmila
Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: topchieva@krc.karelia.ru
tel. (8142) 571879

Matveeva, Elizaveta
Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: matveeva@krc.karelia.ru
tel. (8142) 783622

Труды Карельского научного центра РАН
№ 3. 2011. С. 78–87.

УДК 581.154+575.224.46: 582.542.1.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАСТЕНИЙ *FESTUCA PRATENSIS* HUDS. С СУПРЕССИРОВАННОЙ ХЛОРОФИЛЛДЕФЕКТНОСТЬЮ

О. Н. Лебедева, А. Ф. Титов, Т. С. Николаевская, Е. Б. Стафеева

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Представлены результаты исследований физиологических особенностей растений многолетнего перекрестноопыляющегося злака *Festuca pratensis* Huds. с супрессированной хлорофиллдефектностью. Установлено, что генетической основой хлорофиллдефектности растений данного типа является мутация (и) с плейотропным эффектом, затрагивающая пути синтеза зеленых и желтых (каротинов, лютеина и ксантофиллов) пигментов и сопровождающаяся изменением экспрессии морфофизиологических признаков по сравнению с растениями *w-type*.

Ключевые слова: *Festuca pratensis* Huds., супрессированная хлорофиллдефектность, зеленые и желтые пигменты, фотосинтетический аппарат, нетто-фотосинтез.

O. N. Lebedeva, A. F. Titov, T. S. Nikolaevskaya, E. B. Stafeeva. PHYSIOLOGICAL FEATURES OF *FESTUCA PRATENSIS* HUDS. PLANTS WITH SUPRESSED OF CHLOROPHYLL DEFICIENCY

Results of research into the physiological features of the perennial allogamous cereal *Festuca pratensis* Huds. with suppressed chlorophyll deficiency are presented. We found that the genetic basis of chlorophyll deficiencity in plants of this type is the mutation (s) with the pleiotropic effect, wich affects the pathways of synthesis of auxiliary light-absorbing and photoprotective green (*a*-, *b*-chlorophyll) and yellow (carotene, lutein and xantophyll) pigments and isaccompanied by change in the expression of morpho-physiological traits as compared with *w-type* plants.

Key words: *Festuca pratensis* Huds., pigment mutations, green and yellow pigments, suppression of chlorophyll deficiency, photosynthetic apparatus, net-photosynthesis.

Введение

У растений, важнейшей биологической особенностью которых является способность к фотосинтезу, большое значение имеют различного рода нарушения в биосинтезе пигментов, и прежде всего хлорофиллов (хлорофиллдефектность). В связи с этим изучение физиологических особенностей, таких как, например, содержание пигментов, скорость фотосинтетических реакций, фотопротекторные свойства, играет важную роль в понимании механизмов, приводящих к структурно-функциональным изменениям фотосинтетического аппарата у растений с хлорофиллдефектностью.

Исследование этих механизмов связано, как правило, с использованием пигментных мутантов ядерного типа, у которых блокированы отдельные звенья синтеза пигментов и отсутствует способность к его восстановлению

[Найлэн, 1967]. Наш модельный объект – овсяница луговая (*Festuca pratensis* Huds.), как показано ранее, содержит значительный пул естественных хлорофильных мутаций, большая часть которых способна специфически восстанавливаться до дикого фенотипа [Олимпиенко и др., 1976; Титов, Олимпиенко, 1976; Титов и др., 1978], и этот процесс сопровождается определенными структурными изменениями хлоропластов и митохондрий [Венжик и др., 2002].

Цель настоящего исследования – изучение физиологических особенностей растений овсяницы луговой с супрессированной хлорофиллдефектностью и с различными механизмами восстановления пигментации до дикого фенотипа.

Материалы и методы

Работа проводилась на растениях овсяницы луговой с. Онежская, который был создан на основе северных экотипов вида [Винниченко, 1967; Лебедева и др., 1995]. Фенотипическое проявление пигментных нарушений у растений данного сорта происходит при определенных условиях культивирования. С целью их выявления семена проращивали в течение 10 суток на фильтровальной бумаге в фитотроне при непрерывном освещении (96–120·μmol·m^{-2}·s^{-1}), температуре 35^{0}С и влажности 70%. В массиве проростков регистрировали зеленые (*w-type*) и депигментированные растения (десупрессия).

В работе использованы обозначения, общепринятые для хлорофильных мутаций: светло-зеленые (*viridsi,* V), желтые (*xantha,* X), белые (*albian*, A). Комбинированные фенотипы обозначались как зелено-светло-зеленые (NV), светло-зелено-зеленые (VN), светло-зелено-желтые (VX), светло-зелено-белые (VA), желто-зеленые (XN), желто-светло-зеленые (XV), желто-белые (XA), бело-зеленые (AN), бело-светло-зеленые (AV), причем первая буква соответствовала окраске верхней половины листа, а вторая – нижней. Обозначения фенотипов образовывались из начальных латинских букв соответствующего типа депигментации, знака >, и начальных букв соответствующего типа восстановления, например, V>N, V>VX и т.п.

Депигментированные проростки восстанавливали зеленую окраску листа (ресупрессия) с различной скоростью и двумя путями: через реверсию и репопуляцию. Окраска проростка до *w-type* путем реверсии восстанавливалась быстро при культивировании проростков при 25^{0}С в течение последующих 4 суток или медленно – более 4 суток. В других случаях восстановление происходило через репопуляцию клеток базальной части проростка: быстрое наблюдалось уже на 7-е сутки при температуре 35^{0}С, а медленное, так же как и реверсия, – при 25^{0}С. Используя различные сочетания скорости и механизмов восстановления (быстрая реверсия – медленная реверсия и быстрая репопуляция – медленная репопуляция), мы выделили несколько фенотипических групп проростков. Пигментация полностью восстанавливалась к моменту перехода растений в фазу кущения (растения-ревертанты).

В дальнейшем растения-ревертанты (функциональные ревертанты), маркированные по типу депигментации и восстановления в фазе проростков, выращивали в течение 6 лет в полевых условиях в виде клонов, полученных методом вегетативного деления материнских 2-летних особей. Каждый клон состоял из 8 растений, размещенных с расстоянием 60×60 см.

Содержание пигментов определяли у растений третьего года жизни, рассчитывая распределение и соотношение зеленых и желтых пигментов между светособирающими антенными комплексами (ССК) и реакционными центрами (РЦ) фотосистем I и II [Lichtenthaler, 1987]. Содержание и расчет концентрации хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов осуществляли по общепринятым методикам [Шлык, 1968; Методы биохимического анализа растений, 1978]. Для разделения каротиноидов использовали метод адсорбционной тонкослойной хроматографии, основанный на различной адсорбции составных частей смеси на твердом адсорбенте [Березов, Коровкин, 1990]. Извлечение пигментов [Сапожников, 1964], их фракционирование и идентификацию [Методы биохимического анализа растений, 1978; Дараселия и др., 1983; Досон и др., 1991] также проводили по стандартным методикам.

Работу виолоксантинового цикла определяли с помощью критерия эффективности деэпоксидации (КЭД) по формуле КЭД=(A+Z)/(A+Z+V), где A – количество антераксантина, Z – зеаксантина, V – виолаксантина [Elrad et al., 2002].

Эффективность работы фотосинтетического аппарата (ФСА) оценивали в полевом и лабораторном экспериментах с помощью флюориметра MINI-PAM (Walz, Германия) [Hetherington et al., 1998]. При этом использованы основные параметры, характеризующие различные стороны фотосинтетического транспорта электронов: *Fo, Fv и Fm* – основная (фоновая), переменная и максимальная флюоресценция адаптировавшихся к темноте образцов растений; *Fv/Fm* – потенциал фотохимической эффективности (потенциальный квантовый выход фотохимии); *Yield (Y)* – эффективный (фактический) выход фотохимического превращения энергии; *qP* – фотохимическое тушение; *qN* – нефотохимическое тушение; *NPQ* – часть нефотохимического

тушения хлорофилла *a*, рассеянного в виде тепла [Maxwell, Johnson, 2000].

Нетто-фотосинтез изучали с помощью портативного прибора НСМ–1000 [Германия] на растениях, достигших фазы кущения (10–12 вегетативных побегов) и выращенных в лабораторных условиях в вазонах с почвенным субстратом при температуре воздуха 25°С, его относительной влажности 50–60 %, интенсивности света 144 μмоль·м$^{-2}$·с$^{-1}$ ФАР, при фотопериоде 14 ч, температура листа 25°–28°С. Условия изучения газообмена внутри листовой камеры площадью 2,5 см^2: температура воздуха 25°С, его относительная влажность 50–60%, интенсивность света 800, 500, 300, 100 и 0 μмоль·м$^{-2}$·с$^{-1}$ ФАР. По данным эксперимента были построены световые кривые нетто-фотосинтеза [Мокроносов, 1983].

Все результаты обработаны с помощью общепринятых методов вариационной статистики (Зайцев,1984).

Результаты и обсуждение

Анализ зеленых пигментов у растений с супрессированной хлорофиллдефектностью 3-го года жизни, маркированных в ювенильной фазе развития по характеру хлорофильного дефекта, показал, что у большинства фенотипов (V, VN, XN, XV, A) наблюдается повышенное содержание хлорофилла *a* в реакционных центрах (на 20–30 %) и суммарного его количества (на 13–18 %) по отношению к этим показателям у растений *w-type*. Обращает на себя внимание, что три хлорофиллдефектных фенотипа являются ранними ревертантами (VN, XN, XV), то есть восстановление пигментации у них проявляется при 35^0 путем репопуляции (табл. 1).

В отличие от зеленых пигментов количество каротиноидов в растениях оказалось зависимым от характера хлорофильного дефекта. Так, растения с фенотипами *viridis* и *xantha* характеризуются пониженным содержанием каротина (на 30–35 %), лютеина (на 20–25 %), зеа-+ антераксантина (на 13–17 %) и суммы ксантофиллов в целом (на 10 %), а с фенотипом *albina* – повышенным содержанием лютеина (на 35 %), неоксантина (на 30 %) и общего пула ксантофиллов (на 8%) (табл. 2).

Установлено, что состав зеленых пигментов растений с супрессированной хлорофиллдефектностью связан только с определенными механизмами восстановления пигментации при ресупрессии. При восстановлении хлорофильного дефекта путем репопуляции (быстрой и медленной) у растений всех фенотипических групп наблюдается увеличенное содержание хлорофилла *a* на 12–23 % в РЦ и на 22–40 % его суммарного количества. У растений-ревертантов с фенотипами *viridis* и *xantha* и с восстановлением через реверсию (быструю и медленную) отмечено снижение (в среднем на 10 %) количества хлорофилла *b* относительно *w-type* и, как следствие, снижение на 15 % суммы хлорофиллов *a+b* в ССК. Содержание зеленых пигментов (*a, b,* в ССК и в РЦ) у растений, характеризую-

Таблица 1. Содержание пигментов в растениях *Festuca pratensis,* различающихся типом хлорофильного дефекта

Фенотип	Содержание и соотношение пигментов, мг/г сырого веса						
	a	*b*	*a/b*	ССК	РЦ	*c*	*c/a*
w-type	1,14±0,05	0,49±0,01	2,33±0,07	1,13±0,08	0,55±0,04	0,29±0,01	0,25±0,02
V	**1,34±0,07***	0,55±0,05	**2,44±0,03 ***	1,21±0,11	**0,68±0,04***	**0,36±0,02***	0,27±0,01
VN	**1,31±0,05***	0,53±0,03	**2,47±0,06***	1,16±0,06	**0,67±0,02***	**0,24±0,01***	**0,18±0,02***
VX	1,15±0,07	0,47±0,02	2,45±0,05	1,04±0,05	0,59±0,05	0,26±0,02	0,23±0,01
X	1,14±0,03	**0,45±0,01***	**2,53±0,03***	**0,99±0,03***	0,60±0,02	0,31±0,09	0,27±0,01
XN	**1,30±0,01***	0,52±0,01*	**2,50±0,05***	1,15±0,03	**0,67±0,01***	0,31±0,03	0,24±0,01
XV	**1,34±0,09***	0,53±0,08	**2,53±0,05***	1,16±0,17	**0,71±0,11***	0,34±0,11	0,25±0,02
A	**1,29±0,07***	0,49±0,03	**2,63±0,10***	1,08±0,06	**0,69±0,04***	**0,35±0,03***	0,27±0,04

* Здесь и в табл. 2–4 отличия в содержании пигментов у растений с хлорофиллдефектностью от *w-type* значимы при $p<0,05$.

Таблица 2. Содержание желтых пигментов в растениях *Festuca pratensis,* различающихся типом хлорофильного дефекта

Фенотип	Содержание желтых пигментов, мг/г сырого веса						КДЭ
	каротин	лютеин	виолаксантин	зеаксантин+ антераксантин	неоксантин	сумма ксантофиллов	
w-type	0,114±0,012	0,131±0,010	0,040±0,004	0,224±0,015	0,033±0,003	0,297±0,007	0,848±0,010
V	**0,074±0,007***	**0,104±0,009***	0,039±0,003	**0,195±0,011***	0,027±0,003	**0,257±0,004***	0,847±0,007
VN	0,094±0,012	0,131±0,010	0,042±0,004	0,248±0,015	0,033±0,004	**0,323±0,009***	0,849±0,011
X	**0,077±0,007***	**0,099±0,008***	0,041±0,005	**0,185±0,014***	0,035±0,004	**0,261±0,008***	**0,820±0,013***
XN	0,122±0,012	0,126±0,011	0,041±0,003	0,228±0,017	0,035±0,003	0,304±0,011	0,853±0,016
XV	0,095±0,012	0,112±0,013	0,036±0,004	0,199±0,019	0,029±0,004	**0,264±0,013***	0,854±0,018
A	0,099±0,011	**0,177±0,007***	0,046±0,004	0,231±0,017	**0,043±0,004***	**0,320±0,008***	0,834±0,008

щихся быстрым восстановлением пигментации к *w-type* через репопуляцию, выше относительно среднего по группе фенотипов, чем при реверсии. И, напротив, при медленных реверсии и репопуляции эти же показатели оказались одинаковыми. Соотношение зеленых пигментов (*a/b*) у растений отдельных фенотипов, как и средних значений по группе фенотипов, выше, чем у *w-type* при реверсии и репопуляции (быстрой и медленной) (табл. 3).

Содержание желтых пигментов (среднее значение по группе фенотипов с тем или иным типом восстановления) у растений с супрессированной хлорофиллдефектностью было ниже уровня *w-type* или не отличалось от него. Так, количество каротина оказалось на уровне, характерном для *w-type,* только при быстрой репопуляции и было снижено (на 21–38 %) при других типах восстановления: медленная репопуляция, быстрая и медленная реверсия (табл. 4).

Содержание лютеина зависело от скорости восстановления: при быстром оно достигало уровня *w-type,* а при медленном было ниже его на 15–32 %. Выявляется специфика механизмов восстановления: при быстром лютеина больше на 30–40 % (при реверсии и репопуляции соответственно) и КДЭ выше на 10 % по сравнению с медленным. При быстрой репопуляции выше (в 1,5 раза) количество каротина, зеаксантина + антераксантина (в 1,4 раза) и сумма ксантофиллов (в 1,5 раза) по сравнению с медленной репопуляцией (см. табл. 4).

Следует отметить и фенотипические особенности растений с супрессированной хлорофиллдефектностью в содержании отдельных фракций каротиноидов. Так, у растений с фенотипами *viridis* и *xantha*, независимо от скорости и путей фенотипических изменений окраски растений при ресупрессии, снижено количество каротина, лютеина, зеаксантина+антераксантина и суммы ксантофиллов. У ранних ревертантов, восстанавливающихся до нормального фенотипа (VN и XN) путем быстрой репопуляции, напротив, наблюдается количественный рост этих показателей (на 17–45 %). Растения с фенотипом *albina* характеризуются специфическим содержанием отдельных фракций каротиноидов и отличаются по ряду показателей от *viridis*- и *xantha*- фенотипов (см. табл. 4).

Потенциал фотохимической эффективности открытых центров фотосистемы II (*Fv/Fm*) достигал у растений *w-type* 0,74, что указывает на развитость ФСА. *Fv/Fm* при умеренной инсоляции в условиях лабораторного эксперимента у растений с супрессированной хлорофиллдефектностью и медленной реверсией не отличался, а с медленной репопуляцией незначительно был снижен относительно *w-type*. *Yield* и *qP* на 25 % выше при медленной репопуляции, чем у растений *w-type*, величина *NPQ* снижена на 15 % (табл. 5).

Таблица 3. Содержание пигментов в растениях *Festuca pratensis,* различающихся механизмом восстановления пигментации при ресупрессии

Фенотип	Содержание и соотношение пигментов, мг/г сырого веса						
	a	*b*	*a/b*	ССК	РЦ	*c*	*c/a*
w-type	1,14±0,05	0,49±0,01	2,33±0,07	1,13±0,08	0,55±0,04	0,29±0,01	0,25±0,02
Быстрое восстановление (репопуляция) при 35°С							
VN>N, VN>VN	**1,30±0,06***	0,52±0,03	**2,54±0,04***	1,14±0,07	**0,69±0,03***	**0,25±0,02***	**0,19±0,01***
XN>N	**1,30±0,02***	0,52±0,02	**2,53±0,06***	1,14±0,04	**0,68±0,01***	0,29±0,04	0,22±0,02
XV>V, XV>VN	**1,40±0,10***	0,52±0,05	**2,79±0,08***	1,14±0,08	**0,77±0,05***	0,32±0,04	0,23±0,03
Среднее по группе	**1,33±0,06***	0,52±0,03	**2,62±0,06***	1,14±0,06	**0,71±0,003***	0,29±0,03	0,21±0,02
Медленное восстановление (репопуляция) при 25°С							
V>VN	**1,32±0,08***	0,48±0,07	**2,77±0,08***	1,06±0,05	**0,74±0,07**	**0,36±0,01***	0,27±0,03
X>XN	1,20±0,07	0,44±0,06	**2,73±0,09***	**0,97±0,07***	**0,67±0,04***	0,33±0,03	0,28±0,01
A>AV	**1,31±0,09***	0,48±0,04	**2,73±0,07***	1,06±0,08	**0,74±0,06***	0,32±0,02	0,24±0,01
Среднее по группе	**1,28±0,08***	0,47±0,06	**2,74±0,08***	1,03±0,07	**0,72±0,06***	**0,34±0,02***	0,26±0,02
Быстрое восстановление (реверсия) при 25°С							
V>N	1,02±0,09	**0,44±0,03***	2,35±0,14	**0,96±0,06***	0,49±0,08	**0,25±0,02***	0,25±0,03
X>N	1,08±0,05	**0,43±0,02***	**2,57±0,09***	**0,99±0,04***	0,58±0,04	0,32±0,03	0,30±0,01
A>V	1,16±0,06	0,44±0,04	**2,68±0,11***	0,97±0,09	**0,64±0,02***	0,32±0,09	0,28±0,05
Среднее по группе	1,09±0,06	**0,44±0,03***	**2,53±0,11***	**0,97±0,06***	0,57±0,05	0,30±0,05	0,28±0,03
Медленное восстановление (реверсия) при 25°С							
V>V	1,20±0,04	**0,45±0,02***	**2,69±0,10***	**0,99±0,05***	**0,66±0,03***	**0,40±0,04***	**0,33±0,02***
X>X	1,11±0,08	**0,43±0,03***	**2,52±0,07***	**0,96±0,07***	0,58±0,04	0,28±0,03	0,25±0,02
A>A	1,14±0,04	0,46±0,04	2,48±0,09	1,02±0,09	0,58±0,05	0,34±0,04	0,30±0,03
Среднее по группе	1,15±0,05	**0,44±0,03***	**2,56±0,09***	**0,99±0,07***	0,61±0,04	0,34±0,04	0,29±0,02

Таблица 4. Содержание каротиноидов в растениях *Festuca pratensis,* различающихся механизмом восстановления пигментации при ресупрессии

Фенотип	Содержание каротиноидов, мг/г сырого веса						КДЭ
	каротин	лютеин	виолаксантин	зеаксантин+ антераксантин	неоксантин	сумма ксантофиллов	
w-type	0,114±0,012	0,131±0,010	0,040±0,004	0,224±0,015	0,033±0,003	0,297±0,007	0,848±0,010
Быстрое восстановление (репопуляция) при 35°С							
VN>N	**0,065±0,012***	0,109±0,010*	0,038±0,004	**0,174±0,014***	0,028±0,004	**0,240±0,007***	**0,821±0,008***
VN>VN	0,123±0,011	**0,152±0,010***	0,045±0,005	**0,322±0,015***	0,037±0,004	**0,404±0,011***	**0,877±0,014***
XN>N	**0,148±0,012***	0,139±0,010	0,045±0,003	**0,257±0,015***	**0,040±0,002***	**0,342±0,010***	0,851±0,013
XN>VN, XV>V, XV>VN	0,095±0,012	0,112±0,013	0,036±0,004	0,199±0,019	0,029±0,004	**0,264±0,013***	0,854±0,018
Среднее по группе	0,108±0,014	0,128±0,011	0,047±0,004	0,238±0,016	0,038±0,004	0,323±0,010*	0,857±0,013
Медленное восстановление (репопуляция) при 25°С							
V>VN	**0,068±0,005***	**0,094±0,015***	0,033±0,006	**0,176±0,011***	**0,024±0,003***	**0,233±0,006***	0,842±0,015
X>VN, X>XV, X>AV	**0,073±0,005***	**0,085±0,011***	0,040±0,007	**0,160±0,013***	**0,044±0,002***	**0,244±0,007***	**0,805±0,014***
Среднее по группе	**0,071±0,005***	**0,089±0,013***	0,037±0,007	**0,168±0,012***	0,034±0,003	**0,251±0,007***	0,823±0,015
Быстрое восстановление (реверсия) при 25°С							
V>N	**0,086±0,013***	**0,110±0,005***	0,037±0,001	0,212±0,015	0,031±0,005	**0,280±0,004***	0,851±0,003
X>N	**0,077±0,011***	**0,101±0,009***	0,042±0,003	**0,182±0,015***	0,031±0,004	**0,255±0,011***	**0,813±0,015***
A>V	0,103±0,012	0,237±0,012*	0,050±0,004	0,253±0,020	0,028±0,002	**0,331±0,008***	0,835±0,012
Среднее по группе	**0,089±0,012***	0,149±0,009	0,039±0,003	0,215±0,016	0,030±0,004	0,285±0,007	0,845±0,10
Медленное восстановление (реверсия) при 25°С							
V>V	**0,068±0,004***	**0,107±0,006***	0,046±0,003	**0,198±0,007***	**0,027±0,001***	**0,271±0,003***	**0,812±0,004***
X>X	**0,082±0,006***	**0,112±0,006***	0,040±0,005	0,213±0,014	0,030±0,002	0,301±0,006	0,842±0,010
A>A	0,095±0,011	**0,116±0,003***	0,042±0,004	0,208±0,013	**0,058±0,006***	0,308±0,008	0,832±0,004
Среднее по группе	**0,082±0,007***	**0,111±0,005***	0,043±0,004	0,206±0,011	0,038±0,003	0,293±0,006	**0,828±0,006***

Таблица 5. Эффективность работы фотосинтетического аппарата (ФСА) растений *Festuca pratensis,* различающихся механизмом восстановления пигментации при ресупрессии

Фенотип	Показатели эффективности работы ФСА				
	Fv/Fm	*Yield*	*qP*	*qN*	*NPQ*
Лабораторный эксперимент, умеренный уровень инсоляции					
w-type	0,74+0,01	0,34+0,03	1,05+0,05	0,78+0,01	1,46+0,09
Медленная репопуляция	0,72+0,07*	0,42+0,02*	1,32+0,11*	0,78+0,01	1,26+0,07*
Медленная реверсия	0,73+0,06	0,39+0,04	1,06+0,10	0,77+0,05	1,36+0,09
Полевой эксперимент, высокий уровень инсоляции					
w-type	0,73±0,03	0,41±0,050	1,21±0,12	0,79±0,08	1,43±0,23
Медленная репопуляция	0,72±0,03	0,28±0,040*	1,50±0,08*	0,89±0,05	1,72±0,14
Быстрая реверсия	0,75±0,03*	0,34±0,027	1,25±0,09	0,78±0,05	1,53±0,09
Медленная реверсия	0,74±0,03*	0,38±0,051	1,27±0,11	0,83±0,08	1,80±0,09*

Примечание. Отличия показателей эффективности работы фотосинтетического аппарата у растений с хлорофиллдефектностью от *w-type* значимы при $p<0,05$.

Анализ световых кривых нетто-фотосинтеза листьев исследованных групп растений, различающихся механизмами восстановления пигментации при ресупрессии (быстрая и медленная репопуляция, быстрая и медленная реверсия), и у *w-type* показал, что по мере увеличения освещенности (с 100 до 800 мкмоль·м$^{-2}$·с$^{-1}$ ФАР) скорость поглощения CO_2 возрастает у растений всех групп (рис.).

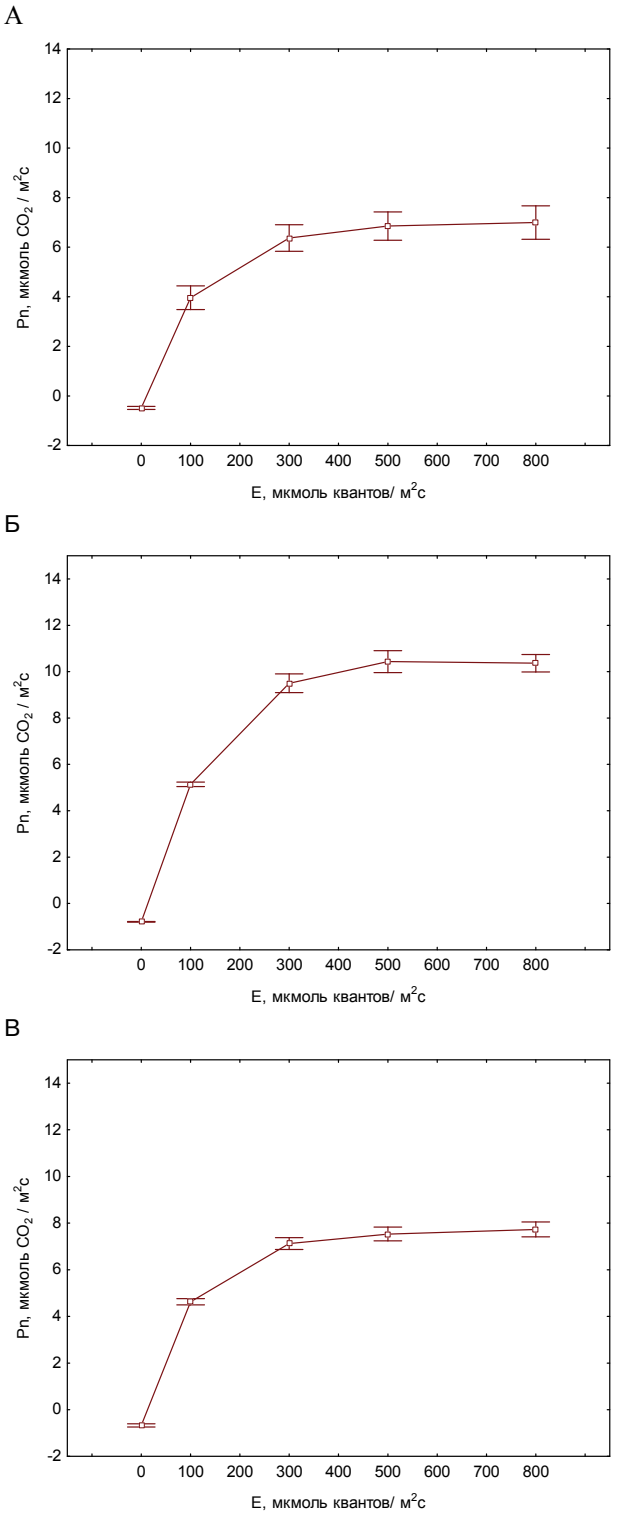
Растения с быстрой репопуляцией и реверсией к зеленому фенотипу характеризовались большим по сравнению с растениями с медленной реверсией и репопуляцией, как и с *w-type*, углом наклона прямолинейного участка световой кривой, отражающим высокую эффективность использования световой энергии в ходе фотосинтеза. Максимальные значения фотосинтеза при насыщающей интенсивности света (500–800 мкмоль·м$^{-2}$·с$^{-1}$ ФАР) на 30 % выше у растений с медленной репопуляцией по сравнению с медленной реверсией и *w-type*.

Таким образом, скорость нетто-фотосинтеза листьев растений с супрессированной хлорофиллдефектностью исследованных групп растений, различающихся механизмами восстановления пигментации, оказалась зависимой от механизма восстановления пигментации проростков при ресупрессии.

Оценка эффективности работы ФСА у растений с супрессированной хлорофиллдефектностью в полевом эксперименте (высокий уровень инсоляции) показала иные результаты (см. табл. 5). При реверсии (быстрой и медленной) незначительно увеличен показатель, характеризующий потенциал фотохимической эффективности открытых центров фотосистемы II (*Fv/Fm*), а также у хлорофиллдефектных фенотипов, восстановление которых при ресупрессии проходило путем медленной репопуляции до фенотипической нормы (X>XN, A>AN). Эффективный выход фотохимического превращения энергии (*Yield*) (среднее значение по группе фенотипов) при медленной репопуляции понижен на 30 %, а для отдельных фенотипов – до 46 %, причем снижение отмечено и для растений с быстрой реверсией (X>N, A>VN). При медленной репопуляции показатель фотохимического тушения (*qP*) флуоресценции хлорофилла *a*, напротив, увеличен от 25 до 53 % как для отдельных фенотипов, так и для среднего значения по группе фенотипов. Величина нефотохимического тушения флюоресценции хлорофилла *a* (*qN*) и нефотохимического тушения в виде тепловой диссипации (*NPQ*), которая на 75 % осуществляется пигментами виолоксантинового цикла, для большинства растений с супрессированной хлорофиллдефектностью не отличается от *w-type* или превышает его уровень (X>XN, X>VX) и с определенными механизмами восстановления при ресупрессии не связана. По показателям электронного транспорта проявляется эффект хлорофиллдефектного фенотипа, выраженный в повышении (X>XN, X>VX, A>VN) или снижении (A>VN, X>N) значений относительно *w-type* (см. табл. 5). Материалы эксперимента, полученные при высокой инсоляции (полевой опыт) и характеризующие эффективность работы ФСА растений с хлорофиллдефектностью, не коррелируют с полученными при умеренной инсоляции (лабораторный опыт).

Наши результаты и имеющиеся в литературе данные по генетическому контролю синтеза зеленых [Suzuki, Bauer, 1995; Reinbothe S., Reinbothe C., 1996; Suzuki et al., 1997; Beale, 1999; Suzuki, Shioi, 1999; Eckhardt et al., 2004] и желтых [Demmig-Adams B. et al., 1990; Pogson et al., 1996; Bugos et al., 1998; Bouvier et al., 2000; Lindgren, 2003; Kato et al., 2004] пигментов позволили сформировать рабочую модель, отражающую особенности синтеза пигментов у растений *F. pratensis* с супрессированной хлорофиллдефектностью.

Как представляется, у части растений *F. pratensis* с супрессированной хлорофиллдефектностью при ресупрессии включается репопуляционное восстановление пигментации проростков (при 35 и 25°С) до *w-type*, которое проявляется в комплексном эпистатическом действии двух генов – мутантного и супрессора. При этом обеспечивается не только повышенный уровень



Световые кривые нетто-фотосинтеза у растений *Festuca pratensis*

А – *w-type*; Б – при медленной репопуляции; В – при медленной реверсии. По оси ординат – Pn, мкмоль CO_2/ м^2·с, по оси абсцисс – E, мкмоль квантов/м^2·с

хлорофилла *a* в реакционных центрах фотосистемы II, но и содержание хлорофилла *b* по сравнению как с растениями *w-type*, так и с растениями с супрессированной хлорофиллдефектностью, восстановление пигментации у которых проходило путем реверсии. Можно предположить, что в этом случае повышена активность фермента *хлорофиллид а оксигеназы* (CAO), контролирующего поздние стадии синтеза хлорофилла *a* и *b* через усиление экспрессии гена и/или через регуляторные механизмы, к числу которых относится и эпистатическое действие мутантного гена и гена-супрессора и обеспечивается синтез зеленых пигментов на уровне «фенотипической нормы» (*w-type*), или повышенный уровень хлорофилла *a*. Репопуляционное восстановление, как показано выше, проявляется при умеренной освещенности прежде всего по эффективности работы ФСА (интенсивности фотосинтеза, эффективному выходу фотохимического превращения энергии и фотохимическому тушению хлорофилла *a*, а также по другим показателям роста и развития растений (табл. 6).

Такая картина свойственна не всем растениям с супрессированной хлорофиллдефектностью. У большей части растений при ресупрессии наблюдается реверсия (восстановление только при 25°С) окраски проростков до фенотипической нормы (зеленая окраска проростка, внешне не отличимая от *w-type*) или до хлорофиллдефектного фенотипа с менее глубоким типом депигментации, например, X>V, A>V. У таких растений содержание хлорофилла *a* сохраняется на уровне «фенотипической нормы» (*w-type*), а хлорофилла *b*, выполняющего функции светособирающего и фотозащитного пигмента [Eggink et al., 2001], понижено и соответственно уменьшен общий уровень зеленых пигментов в ССК фотосистемы II. Можно предположить, что этот уровень хлорофилла *b* связан как со снижением экспрессии генов, контролирующих поздние стадии синтеза хлорофилла *b*, так и/или со взаимным превращением хлорофиллов *a* и *b* в хлорофилловом цикле, в частности с понижением активности фермента CAO (Folly, Engel, 1999; Masuda, et al., 2002; Rudiger, 2002). У некоторых видов высших растений обнаружены мутанты, характеризующиеся низким содержанием хлорофилла *b*, вызванного снижением экспрессии гена, кодирующего CAO [Greene et al., 1988; Knoetzel, Simpson, 1991; Król et al., 1995; Falbel, Staehelin, 1996; Montané et al., 1998; Tanaka et al., 1998; Espineda et al., 1999; Mochizuki et al., 2001; Larkin et al., 2003].

Таблица 6. Зависимость экспрессии физиологических признаков от путей фенотипических изменений окраски проростков при ресупрессии у растений *Festuca pratensis* с супрессированной хлорофиллдефектностью на разных этапах их онтогенеза

Признак	Пути фенотипических изменений окраски проростков при ресупрессии			
	репопуляция		реверсия	
	быстрая	медленная	быстрая	медленная
Показатели физиологического состояния ФСА в генеративную фазу развития растений				
a	>	>	=	=
b	=	=	<↕	<↕
a/b	>	>	>	>
ССК	=	=↕	<	<
РЦ	>	>	=↕	=↕
c	=↕	>↕	=↕	=↕
c/a	=↕	=	=	=↕
Каротин	=↕	<	<↕	<↕
Лютеин	=↕	<	=↕	<↕
Виолаксантин	=	=↕	=	=
Зеаксантин + антераксантин	=↕	<	=↕	=↕
Неоксантин	=↕	=↕	=	=↕
Сумма ксантофиллов	>↕	<	=↕	=↕
КДЭ	=↕	=↕	=↕	<↕
Fv/Fm	–	=↕	>↕	>↕
Yield	–	<	=↕	=
qP	–	>↕	=↕	=
qN	–	=↕	=	=
NPQ	–	=↕	=	>↕
Показатели физиологического состояния ФСА в вегетативную фазу развития растений				
Нетто-фотосинтез (по интенсивности поглощения CO_2)	–	>	–	=
Fv/Fm	–	<	–	=
Yield	–	>	–	=
qP	–	>	–	=
qN	–	=	–	=
NPQ	–	<	–	=

Примечание. Значения признаков у растений с супрессированной хлорофиллдефектностью: = не отличаются, > превышают (при $p<0,05$), < ниже (при $p<0,05$), чем у растений *w-type*, ↕ – выражен эффект хлорофиллдефектного фенотипа.

Мутантный ген, даже под прикрытием гена-супрессора, существенно затрагивает пути превращения каротиноидов. Сниженный уровень каротинов и лютеина почти при всех типах восстановления (при медленной репопуляции, медленной и быстрой реверсии) позволяет предположить, что у растений с супрессированной хлорофиллдефектностью понижена экспрессия генов, контролирующих синтез отдельных или ряда ферментов *Lycopene β-Cyclase* (LCY-b), *Lycopene ε-Cyclase* (LCY-e), *β-Carotene Hydroxylase* (BCH), *ε-Carotene Hydroxylase* (ECH), которые кодируются ядерными генами, а трансляция осуществляется в хлоропластах [Bartley, Scolnlk, 1995].

Эти же ферменты участвуют и в синтезе пигментов ксантофиллового цикла зеаксантина и антераксантина, уровень которых также понижен у растений отдельных фенотипических групп (медленная репопуляция). Действие мутантного гена у растений с супрессированной хлорофиллдефектностью, как представляется, не сказывается на активности *Zeaxanthin Epoxidase* (ZEP) – содержание виолоксантина на уровне растений дикого типа и отсутствует зависимость от хлорофиллдефектного фенотипа, а также незначительно сказывается на активности *Violaxanthin De-epoxidase* (VDE). Нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a* (NPQ) при высокой инсоляции находится на уровне растений дикого типа. Снижена активность и *Neoxanthin Synthase* (NXS) – средние значения ссодержания неоксантина по типам восстановления не отличаются от растений *w-type*, хотя у отдельных фенотипов наблюдаются колебания его уровня (см. табл. 6).

Таким образом, температурозависимая хлорофиллдефектность у растений *F. pratensis* не только сопровождается структурными изменениями хлоропластов и митохондрий [Венжик и др., 2002], но и затрагивает пути синтеза вспомогательных светособирающих и фотозащитных зеленых (хлорофилла *b*) и желтых (каротинов, лютеина и ксантофиллов) пигментов, снижая уровень экспрессии генов, контролирующих их образование. При реверсии (быстрой и медленной) незначительно увеличен показатель, характеризующий потенциал фотохимической эффективности открытых центров фотосистемы II. При медленной репопуляции показатель фотохимического тушения (*qP*) флуоресценции хлорофилла *a* увеличен, а показатели нефотохимического тушения флюоресценции хлорофилла *a* (qN) и нефотохимического тушения в виде тепловой диссипации (*NPQ*) для большинства растений с супрессированной хлорофиллдефектностью не отличаются от *w-type* или превышают его уровень и с определенными механизмами восстановления при ресупрессии не связаны. Эффект хлорофиллдефектного фенотипа, выраженный в повышении или снижении значений относительно *w-type,* проявляется по показателям, характеризующим транспорт электронов в хлоропластах. Ген-супрессор лишь частично подавляет действие мутантного гена, что отражается на уровне приспособленности и ее компонентах – выживаемости и репродуктивной способности растений с супрессированной хлорофиллдефектностью. Механизмы восстановления пигментации при ресупрессии являются важным элементом феноменологии супрессированной хлорофиллдефектности.

Литература

Берёзов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биохимия. М.: Медицина, 1990. 543 с.

Венжик Ю. В., Николаевская Т. С., Олимпиенко Г. С. и др. Особенности структуры клеток мезофилла у хлорофиллдефектных мутантов *Festuca pratensis (*Poaceae*)* // Ботан. журн. 2002. Т. 87, № 12. С. 48–58.

Винниченко Е. Ф. Многолетние травы – основной источник кормов. Петрозаводск, 1967. 151 с.

Дараселия Г. Я. Выделение и идентификация каротиноидных пигментов микобактерий // Методы биохимических исследований растений. Тбилиси, 1983. С. 92–100.

Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. 543 с.

Зайцев Г. Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. М.: Наука. 1984. 424 с.

Лебедева О. Н., Олимпиенко Г. С., Каичева Т. Н., Михайлова Т. Н. Авторское свидетельство на сорт овсяницы луговой «Онежская». Патент № 6675 от 05.05.1995 г.

Методы биохимического анализа растений / Ред. В. В. Полевой и Г. Б. Максимов. Л.: изд-во Ленинградского ун-та, 1978. 192 с.

Мокроносов А. М. Фотосинтетическая функция и целостность растительного организма. М.: Наука, 1983. 64 с.

Найлэн Р. А. Природа индуцированных мутаций у высших растений // Генетика. 1967, № 3. С. 3–21.

Олимпиенко Г. С., Титов А. Ф., Митрофанов Ю. А. Депигментация проростков овсяницы луговой под влиянием температуры // Генетика. 1976. Т. 12, № 1. С. 153–155.

Сапожников Д. И. Пигменты пластид зеленых растений и методика их исследования. М.; Л.: Наука. 1964. 120 с.

Титов А. Ф., Олимпиенко Г. С. Частота хлорофиллдефектных проростков в селекционных потомствах овсяницы луговой *(Festuca pratensis* Huds.*)* // Генетика. 1976. Т. 12, № 2. С. 162–164.

Титов А. Ф., Олимпиенко Г. С., Павлова Н. А. О возможной селективной ценности температурочувствительных хлорофильных мутаций у овсяницы луговой // Журн. общ. биологии. 1978. Т. 39, № 4. С. 628–632.

Шлык А. А. О спектрофотометрическом определении хлорофиллов *a* и *b* // Биохимия. 1968. Т. 33, вып. 2. С. 275–295.

Bartley G. E., Scolnlk P. A. Plant Carotenoids: Pigments for Photoprotection, Visual Attraction, and Human Health // The Plant Cell. 1995. Vol. 7. P. 1027–1038.

Beale S. I. Enzymes of chlorophyll biosynthesis // Photosynth. Res. 1999. Vol. 60. P. 43–73.

Bouvier F., Hugueney P., d`Harlingue A. et al. Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog // Eur J. Biochem. 2000. Vol. 267. P. 6346–6352.

Bugos R. C., Hieber A. D., Yamamoto H. Y. Xanthophyll cycle enzymes are members of the lipocalin family, the first identified from plants // J. Biol Chem. 1998. Vol. 273. P. 15321–15324.

Demmig-Adams B., Gilmore A. M., Adams W. W. Carotenoids: III. *In vivo* function of carotenoids in higher plants // FASEB. 1996. Vol. 10. P. 403–412.

Demmig-Adams B., Adams III W.W., Heber U. et al. Inhibition of zeaxanthin formation and of rapid changes in radiation less energy dissipation by dithiothreitol in spinach leaves and chloroplasts // Plant Physiol. 1990. Vol. 92. P. 293–301.

Eckhardt U., Grimm B., Hőrtensteiner S. Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants // Plant Mol. Biol. 2004. Vol. 56. P. 1–14.

Eggink L. L., Park H., Hoober J. K. The role of chlorophyll *b* in photosynthesis: Hypothesis // BMC Plant Biol. 2001. Vol. 1:2.

Elrad D., Niyogi K. K., Grossman A. R. A major light-harvesting polypeptide of photosystem II functions is thermal dissipation // Plant Cell. 2002. Vol. 14. P. 1801–1816.

Espineda C. E., Linford A. S., Devine D., Brusslan J. A. The at CAO-gene, encoding chlorophyll *a* oxygenase, is required for chlorophyll *b* synthesis in *Arabidopsis thaliana* // Proc Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. P. 10507–10511.

Falbel T. G., Staehelin L. A. Partial blocks in the early steps of the chlorophyll synthesis pathway: a common feature of chlorophyll b-deficient mutants // Plant Physiol. 1996. Vol. 97. P. 311–320.

Folly P., Engel N. Chlorophyll *b* to Chlorophyll a Conversion Precedes Chlorophyll Degradation in *Hordeum vulgare* L. // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274. P. 21811–21816.

Greene B. A., Allred D. R., Morishige D.G., Stacheli L. A. Hierarhial responce of light-harvesting chlorophyll proteins in a light-harvesting chlorophyll-b-deficient mutants maize // Plant Physiol. 1988. Vol. 87. P. 357–364.

Hetherington S. E., Smille R. M., Davies W. J. Photosynthetic activities of vegetative and fruiting tissues of tomato // J. Exp. Botany. 1998. Vol. 49. P. 1173–1181.

Kato M., IkomaY., Matsumoto H. et al. Accumulation of Carotenoids and Expression of Carotenoid Biosynthetic Genes during Maturation in Citrus Fruit1 // Plant Physiol. 2004. Vol. 134. P. 824–837.

Knoetzel J., Simpson D. Expression and organization of antenna proteins in the light- and temperature-sensitive barley mutant chlorina104 // Planta. 1991. Vol. 185. P. 111–123.

Król M., Spangfort M. D., Huner N. P. A. et al. Chlorophyll a/b-binding proteins, pigment conversions, and early light-induced proteins in a chlorophyll b-less barley mutan // Plant Physiol. 1995. Vol. 107. P. 873–883.

Larkin R. M., Alonso J. M., Ecker J. R., Chory J. GUN4, a Regulator of Chlorophyll Synthesis and Intracellular Signaling // Scieice. 2003. Vol. 299. P. 902–906.

Lichtenthaler H. K. Chlorophylls and carotenoids – pigments of photosynthetic biomembranes // Methods in enzymology. San Diego; New York; Berceley; Boston; London–Sydney; Tokyo; Toronto: Acad. Press, 1987. Vol. 148. P. 350–382.

Lindgren O. Carotenoid Biosynthesis in Seed of *Arabidopsis thaliana*: doctoral thesis... Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2003. 33 p.

Masuda T., Tanaka A., Melis A. Chlorophyll antenna size adjustments by irradiance in Dunaliella salina involve coordinate regulation of chlorophyll a oxygenase (CAO) and Lhcb gene expression // Proceedings of the 2002 U.S. DOE Hydrogen Program Review. 2002. P. 1–22.

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

Mochizuki N., Brusslan J. A., Larkin R. et al. Arabidopsis genome uncoupled 5 (gun5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction // Proc Natl. Acad. Sci. USA. 2001. Vol. 98. P. 2053–2058.

Montané M.-H., Tardy F., Kloppstech K., Havaux M. Differential control of xanthophylls and light-induced stress proteins, as opposed to light-harvesting chlorophyll *a/b* proteins, during photosynthetic acclimation of barley leaves to light irradiance // Plant Physiol. 1998. Vol. 118. P. 227–235.

Niyogi K. K. Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches // Annu Rev. Plant Physiol. & Mol. Biol. 1999. Vol. 50. P. 333–359.

Pogson B. J., McDonald K. A., Truong M. et al. Arabidopsis carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants // Plant Cell. 1996. Vol. 8. P. 1627–1639.

Reinbothe S., Reinbothe C. The regulation of enzymes involved in chlorophyll biosynthesis // Eur. J. Biochem. 1996. Vol. 237. P. 323–243.

Rudiger W. Biosynthesis of chlorophyll *b* and the chlorophyll cycle // Photosynth. Res. 2002. Vol. 74. P. 187–193.

Suzuki J. Y., Bauer C. E. Altered monovinyl and divinyl protochlorophyllide pools in bch J mutants of *Rhodobacter capsulatus*. Possible monovinyl substrate discrimination of light-independent protochlorophyllide reductase // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. P. 3732–3740.

Suzuki J. Y., Bollivar D. W., Bauer C. E. Genetic analysis of chlorophyll biosynthesis // Ann. Rev. Genet. 1997. Vol. 31. P. 61–89.

Suzuki J. Y., Shioi Y. Detection of chlorophyll breakdown products in the senescent leaves of higher plants // Plant Cell Physiol. 1999. Vol. 40. P. 909–915.

Suzuki J. Y., Doi M., Shioi Y. Two enzymatic reaction pathways in the formation of pyropheophorbide *a* // Photosynth. Res. 2002. Vol. 74. P. 225–233.

Tanaka A., Ito H., Tanaka R. et al. Chlorophyll *a* oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll *b* formation from chlorophyll *a* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 95. P. 12719–12723.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Лебедева Ольга Николаевна
зам. директора по научной работе, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: lebedeva@krc.karelia.ru
тел. (8142) 774682

Титов Александр Федорович
Председатель КарНЦ РАН, д.б.н., проф., чл.-корр. РАН
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: titov@krc.karelia.ru

Николаевская Татьяна Сергеевна
старший научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: nicoltn@mail.ru
тел. (8142) 573107

Стафеева Елена Борисовна
младший научный сотрудник
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: stafeevalena@mail.ru
тел. (8142) 573107

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

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

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

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

Труды Карельского научного центра РАН
№ 3. 2011. С. 88–96.

УДК 575.113, 616.1(470.22)

СВЯЗЬ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ 3111T/C И 843T/C ГЕНА *CLOCK* С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ И ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА У ЖИТЕЛЕЙ РЕСПУБЛИКИ КАРЕЛИЯ

И. В. Макеева[1], С. Н. Коломейчук[1], Л. В. Топчиева[1], В. А. Корнева[2], Н. Н. Немова[1]

[1] *Институт биологии Карельского научного центра РАН*
[2] *Петрозаводский государственный университет*

Изучена связь полиморфных маркеров 3111T/C и 843T/C гена *CLOCK* с риском развития эссенциальной артериальной гипертензии (ЭАГ) и ишемической болезни сердца (ИБС) у жителей Республики Карелия. Показано достоверное различие в распределении частот генотипов указанных маркеров у пациентов, страдающих ЭАГ и ИБС, и у людей без клинических проявлений этих заболеваний. Обнаружено, что у мужчин, имеющих генотип CC по данным полиморфным маркерам, достоверно повышен риск развития ЭАГ и ИБС.

Ключевые слова: сердечно-сосудистые заболевания, эссенциальная артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, гены циркадного ритма, полиморфизм.

I. V. Makeeva, S. N. Kolomeichuk, L. V. Topchieva, V. A. Korneva, N. N. Nemova. ASSOCIATION OF 3111T/C AND 843T/C POLYMORPHISMS OF THE *CLOCK* GENE WITH THE RISK OF ESSENTIAL HYPERTENSION AND CORONARY ARTERY DISEASE DEVELOPMENT IN A SAMPLE OF THE RUSSIAN POPULATION (REPUBLIC OF KARELIA)

Allele and genotype frequency distribution of 3111T/C and 843T/C polymorphisms of the *CLOCK* gene was studied among patients with essential hypertension, coronary artery disease and healthy volunteers from Republic of Karelia. It was shown that the distribution of genotype frequencies was different in patients with these cardiovascular diseases and in the control group. The presence of the CC genotype of 3111T/C and 843T/C polymorphisms results in increased risk of essential hypertension and coronary heart disease in the male population of Karelia.

Key words: cardiovascular diseases, essential hypertension, coronary heart disease, circadian genes, polymorphism.

Введение

Сердечно-сосудистые патологии относятся к полигенным заболеваниям со сложным формированием фенотипа. В настоящее время отобрано около 50 генов-кандидатов, которые имеют полиморфные сайты и вносят вклад в кардиоваскулярные расстройства. Например, к

ним относятся гены ренин-ангиотензиновой системы (ангиотензиногена, ангиотензиноген-превращающего фермента и др.), аполипопротеина Е, эндотелиальной NO-синтазы, матриксной металлопротеиназы-3. Вместе с тем в качестве генов-кандидатов, играющих роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, ранее не рассматривались циркадные гены. Тем не менее известно, что практически все физиологические процессы организма, в том числе сердечный ритм, артериальное давление и многие показатели, участвующие в процессах тромбообразования и тромболизиса, подвержены суточным колебаниям [Andrews et al., 1996; Otto et al., 2004]. Обострение сердечно-сосудистых заболеваний, как правило, наблюдается в определенные часы. Например, время начала инфаркта миокарда у людей чаще приходится на период с 6.00 до 12.00, реже – с 3.00 до 6.00 [Cohen et al., 1997]. Это связано с активацией сердечно-сосудистой системы перед пробуждением, в регуляции которой участвуют гены циркадных ритмов.

Суточная периодичность физиологических показателей и процессов сердечно-сосудистой системы обусловлена циркадными изменениями экспрессии многих генов, участвующих в поддержании структурной целостности сосудов и их метаболизма [Rudic et al., 2005]. Суточные колебания экспрессии этих генов регулируются генами циркадных ритмов, поэтому следует ожидать, что мутации в циркадных генах могут вносить определенный вклад в развитие кардиоваскулярных патологий. На данный момент имеются немногочисленные литературные данные, подтверждающие это предположение. Например, на мышах показано, что мутация гена *Clock* вызывает патологическое ремоделирование и повреждение сосудов, а нокаут гена *Bmal1* приводит к накоплению коллагена в сосудах, повышению чувствительности к тромбозу и дисфункции эндотелия (реактивному ответу на действие вазорелаксантов) [Anea et al., 2009]. Вместе с тем роль циркадных генов в развитии сердечно-сосудистых патологий практически не изучена. Также пока неясны и механизмы, через которые они влияют на формирование этих заболеваний.

Ген *CLOCK*, кодирующий позитивный транскрипционный фактор CLOCK, относится к числу основных генов циркадных ритмов. Белок CLOCK вместе с обязательным партнером BMAL1, продуктом гена *BMAL1*, образует трансактивационный димер, действующий на промотор управляемых генов [Von Schantz, 2008].

Ген *CLOCK* содержит множество полиморфных сайтов как в транслируемой, так и в нетранслируемой области. Большое число работ посвящено изучению роли полиморфизма 3111T/C 3'-нетранслируемой области (3'-НТО) гена *CLOCK*. Экспериментально доказана его связь с риском ожирения [Monteleone et al., 2008], психическими заболеваниями [Benedetti et al., 2008; Voinescu, 2009], бессонницей [Serretti et al., 2003; Benedetti et al., 2007] и предпочтением тому или иному режиму снабодрствования [Katzenberg et al., 1998; Mishima et al., 2005; Friedman et al., 2009]. Функциональная роль этого полиморфизма до сих пор не изучена. Вероятно, он также может влиять и на развитие сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). В нашей работе мы исследуем влияние этого полиморфизма, а также полиморфизма в транслируемой части гена *CLOCK* (однонуклеотидная замена в 9 экзоне) на развитие кардиоваскулярных расстройств.

По данным Росстата, в структуре смертности по Республике Карелия в 2009 г. 57% составили заболевания сердечно-сосудистой системы. Заболеваемость артериальной гипертонией по Карелии существенно выше, чем в среднем по России.

Карелия является регионом с неблагоприятным световым режимом и высокой смертностью от ССЗ, поэтому изучение влияния генов циркадного ритма на развитие кардиоваскулярных расстройств у жителей этого региона представляется нам особенно актуальным.

Цель работы – изучение роли полиморфизма 3111T/C 3'-нетранслируемой области гена *CLOCK* и полиморфизма 843T/C в экзоне 9 гена *CLOCK* в развитии эссенциальной артериальной гипертензии (ЭАГ) и ишемической болезни сердца (ИБС) у жителей Республики Карелия.

Материалы и методы

В работе использованы образцы крови 261 донора без клинических проявлений и диагнозов ЭАГ и ИБС (контрольная группа), 233 образца крови больных с диагнозом ЭАГ и 226 образцов крови больных с диагнозом ИБС. Диагнозы ЭАГ и ИБС устанавливали в соответствии и с учетом клинических рекомендаций ВНОК. Средний возраст пациентов с диагнозом ЭАГ составлял 59,4±14,1 года, с диагнозом ИБС – 61,8±13,6 года. Средний возраст людей из контрольной группы – 55±17,4 года. ДНК выделяли из 200 мкл венозной крови пациентов с помощью набора для выделения геномной ДНК AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen, США) согласно инструкциям производителя.

Участок гена *CLOCK*, содержащий маркер 3111T/C, амплифицировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) со следующими

праймерами: прямой 5'-tccagcagtttcatgagatgc-3', обратный 5'-gaggtcatttcatagctgagc-3' («Синтол», Россия) [Desan et al., 2000]. Смесь для амплификации содержала по 10 пМ каждого из праймеров, 2мкл 10□ПЦР буфера, 1 мМ каждого dNTP и 0,5 ед. Taq-полимеразы («Силекс», Россия). ПЦР проводили на приборе Robocycler (Stratagene, США) по программе: 3 мин денатурация при 94°С, а затем 35 повторяющихся циклов в режиме: 94°С – 1 мин, 59°С – 1 мин, 72°С – 1мин. Полученный ПЦР продукт (220 п.н.) подвергали обработке рестриктазой *MhlI* («Сибэнзим», Россия) для идентификации аллелей Т (220 п.н.) и С (125 и 95 п.н.) (рис. 1). Условия проведения ПЦР и рестрикции описаны ранее [Desan et al., 2000].

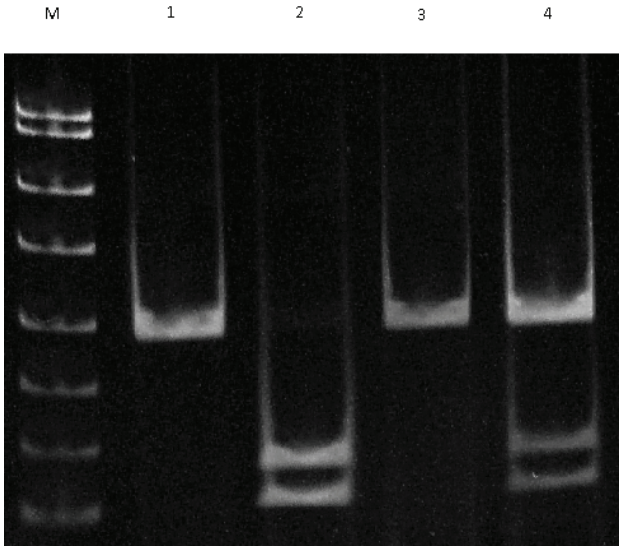


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов рестрикции ПЦР-фрагментов гена *CLOCK*, полиморфного в позиции 3111

Здесь и на рис. 2: М – pUC/MspI; 1, 3 – генотип ТТ, 2 – генотип СС, 4 – генотип ТС

Участок гена *CLOCK*, содержащий маркер 843Т/С, амплифицировали со следующими праймерами: прямой 5'- atttatcaggctttcaaggtca-3', обратный 5'-atgggagtccaggatttatt-3' («Синтол», Россия). Праймеры сконструированы с помощью программы Primer Premier 5. Смесь для амплификации содержала по 10 пМ каждого из праймеров, 2мкл 10□ПЦР буфера, 1 мМ каждого dNTP и 0,5 ед. Taq-полимеразы («Силекс», Россия). ПЦР проводили на приборе Robocycler (Stratagene, США) по программе: 3 мин денатурация при 94°С, а затем 35 повторяющихся циклов в режиме: 94°С – 1 мин, 62°С –1 мин, 72°С – 1мин. Полученный ПЦР продукт (575 п.н.) подвергали обработке рестриктазой *RsaI* («Сибэнзим», Россия) для идентификации аллелей Т (427 и 156 п.н.) и С (295, 132 и 156 п.н.) (рис. 2).

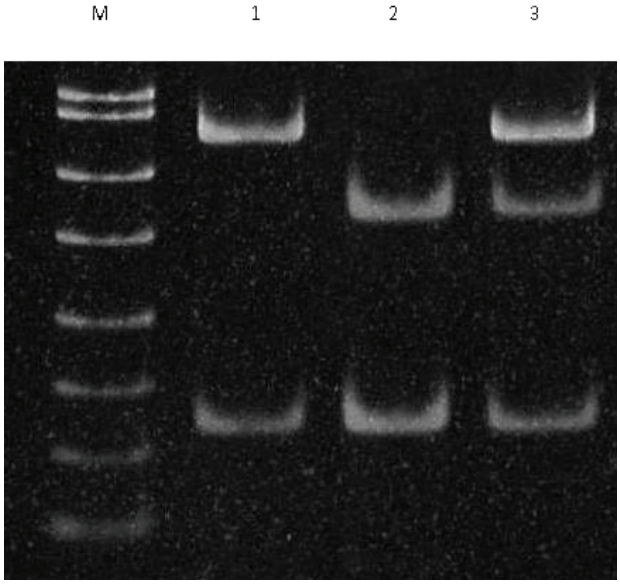


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов рестрикции ПЦР-фрагментов гена *CLOCK*, полиморфного в позиции 843

Продукты рестрикции разделяли в 6%-м полиакриламидном геле, окрашенном бромистым этидием, и визуализировали с помощью системы Kodak EDAS 290 (Kodak, США). Статистический анализ данных осуществляли с помощью пакета программ MS Excel. Достоверность различий частот аллелей и генотипов в группах оценивали с помощью критерия χ^2. Достоверным считали уровень значимости $P < 0,05$. Для оценки риска заболевания рассчитывали соотношение шансов OR.

Результаты и обсуждение

Впервые получены результаты по частоте однонуклеотидного полиморфизма 3'-нетранслируемой области гена *CLOCK* у жителей Республики Карелия. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера 3111Т/С гена *CLOCK* у жителей Республики Карелия близко к распределению, характерному для европейского населения [Robilliard et al., 2002].

В настоящей работе обнаружены достоверные различия в распределении частот генотипов полиморфного маркера 3111Т/С гена *CLOCK* в группах больных эссенциальной артериальной гипертензией, ишемической болезнью сердца и контрольной группе (табл. 1, 2). У пациентов с диагнозами ЭАГ и ИБС значительно ниже частота генотипа ТТ и выше – генотипа ТС. Встречаемость генотипа СС во всех группах практически одина-

ковая, однако анализ распределения полиморфного маркера 3111T/C гена *CLOCK* в зависимости от пола показал, что среди мужчин, страдающих ЭАГ и ИБС, достоверно больше носителей генотипа CC, чем среди мужчин контрольной группы. У женщин, напротив, частота генотипа CC оказалась значительно выше в контрольной группе, чем в группе больных ЭАГ и ИБС.

Таблица 1. Распределение аллелей и генотипов по полиморфному маркеру 3111T/C гена *CLOCK* у здоровых и больных ЭАГ людей

		Контрольная выборка n=224	Больные ЭАГ n=233
Аллели	T	0,70	0,65
	C	0,30	0,35
Критерий χ^2=1,46 (P > 0,05)			
Генотипы	TT	0,51	0,37
	TC	0,38	0,55
	CC	0,11	0,08
Критерий χ^2= 13,98 (P < 0,05)			
		Женщины, контрольная выборка n=126	Женщины, больные ЭАГ n=117
Аллели	T	0,68	0,71
	C	0,32	0,29
Критерий χ^2=0,35 (P > 0,05)			
Генотипы	TT	0,49	0,46
	TC	0,37	0,50
	CC	0,13	0,04
Критерий χ^2= 7,93 (P < 0,05)			
		Мужчины, контрольная выборка n=98	Мужчины, больные ЭАГ n=116
Аллели	T	0,73	0,59
	C	0,27	0,41
Критерий χ^2= 5,18 (P < 0,05)			
Генотипы	TT	0,54	0,28
	TC	0,38	0,60
	CC	0,08	0,11
Критерий χ^2= 14,61 (P < 0,05)			

Таблица 2. Распределение аллелей и генотипов по полиморфному маркеру 3111T/C гена *CLOCK* у здоровых и больных ИБС людей

		Контрольная выборка n=224	Больные ИБС n=226
Аллели	T	0,71	0,64
	C	0,29	0,36
Критерий χ^2=2,35 (P > 0,05)			
Генотипы	TT	0,48	0,36
	TC	0,42	0,56
	CC	0,10	0,08
Критерий χ^2= 8,61 (P < 0,05)			
		Женщины, контрольная выборка n=128	Женщины, больные ИБС n=112
Аллели	T	0,69	0,69
	C	0,31	0,31
Критерий χ^2=0,001 (P > 0,05)			
Генотипы	TT	0,43	0,42
	TC	0,45	0,54
	CC	0,12	0,04
Критерий χ^2= 6,19 (P < 0,05)			
		Мужчины, контрольная выборка n=98	Мужчины, больные ИБС n=114
Аллели	T	0,73	0,59
	C	0,27	0,41
Критерий χ^2=4,76 (P < 0,05)			
Генотипы	TT	0,55	0,31
	TC	0,37	0,57
	CC	0,08	0,12
Критерий χ^2= 12,89 (P < 0,05)			

Таким образом, нами обнаружена взаимосвязь между развитием ЭАГ и ИБС и полиморфным маркером 3111T/C 3'-НТО гена *CLOCK* у населения Карелии. У мужчин, имеющих генотип CC, достоверно повышен риск возникновения ЭАГ (OR = 1,49) и ИБС (OR = 1,57). В группе женщин, страдающих данными сердечно-сосудистыми заболеваниями, частота этого генотипа, напротив, значительно ниже, чем в контрольной группе.

Подобные результаты были получены в исследовании взаимосвязи аффективного расстройства и полиморфизма 3111T/C гена *CLOCK* [Bailer et al., 2005]. При сравнении частот и генотипов у мужчин и женщин, страдающих аффективным расстройством, авторами выявлена тенденция повышения частоты встречаемости аллеля C и генотипа CC у больных мужчин.

Для ряда генов, участвующих в развитии ССЗ, показано, что патологический аллель может проявляться либо у мужчин, либо у женщин. Например, наличие в генотипе аллеля ε4 гена аполипопротеина E может способствовать развитию гиперлипопротеинемии и атеросклероза, причем у женщин в большей степени, чем у мужчин [Heng et al., 1995].

Роль 3111T/C 3'-НТО полиморфного маркера гена *CLOCK* в развитии кардиоваскулярных расстройств до сих пор не изучена. Более вероятным результатом изменения нуклеотидной последовательности в регуляторной части гена представляется не нарушение структуры и функций кодируемых белков, а изменение уровня транскрипции и трансляции мРНК. Это предположение можно подтвердить данными по влиянию изменения структуры 3'-НТО некоторых генов на уровень их экспрессии [Tiret et al., 2005], на стабильность мРНК [Woo et al., 2009]. В экспериментах на линейных мышах показано, что стабильность мРНК циркадных генов *Per2* и *Per3* зависит от наличия в 3'-НТО гена сайтов взаимодействия с РНК-связывающим белком PTB, который регулирует деградацию данной мРНК [Woo et al., 2009]. Также имеются данные о том, что регуляторные элементы 3'-НТО играют важную роль в локализации мРНК и посттрансляционных изменениях, например, при синтезе селенопротеина [Hesketh, 2004].

В настоящей работе впервые получены результаты по частоте однонуклеотидного полиморфизма 843T/C в экзоне 9 гена *CLOCK* у жителей Республики Карелия. В группах больных эссенциальной артериальной гипертензией, ишемической болезнью сердца и контрольной группе обнаружены достоверные различия в распределении частот генотипов полиморфного маркера 843T/C гена *CLOCK* при практически равных частотах аллелей (табл. 3, 4). У людей контрольной группы значительно выше частота гетерозигот, в то время как в группах пациентов с диагнозами ЭАГ и ИБС повышена встречаемость генотипов TT и CC.

Таблица 3. Распределение аллелей и генотипов по полиморфному маркеру 843T/C гена *CLOCK* у здоровых и больных ЭАГ людей

		Контрольная выборка n=174	Больные ЭАГ n=173
Аллели	T	0,38	0,36
	C	0,62	0,64
Критерий χ^2=0,21 (P > 0,05)			
Генотипы	TT	0,10	0,16
	TC	0,56	0,39
	CC	0,34	0,45
Критерий χ^2= 11,15 (P < 0,05)			
		Женщины, контрольная выборка n=88	Женщины, больные ЭАГ n=89
Аллели	T	0,33	0,35
	C	0,67	0,65
Критерий χ^2=0,07 (P > 0,05)			
Генотипы	TT	0,07	0,15
	TC	0,52	0,40
	CC	0,41	0,45
Критерий χ^2= 4,00 (P > 0,05)			
		Мужчины, контрольная выборка n=86	Мужчины, больные ЭАГ n=84
Аллели	T	0,43	0,36
	C	0,57	0,64
Критерий χ^2= 0,87 (P > 0,05)			
Генотипы	TT	0,13	0,18
	TC	0,60	0,37
	CC	0,27	0,45
Критерий χ^2= 9,60 (P < 0,05)			

Таблица 4. Распределение аллелей и генотипов по полиморфному маркеру 843T/C гена *CLOCK* у здоровых и больных ИБС людей

		Контрольная выборка n=174	Больные ИБС n=164
Аллели	T	0,38	0,39
	C	0,62	0,61
Критерий χ^2=0,04 (P > 0,05)			
Генотипы	TT	0,10	0,18
	TC	0,56	0,41
	CC	0,34	0,40
Критерий χ^2= 9,12 (P < 0,05)			
		Женщины, контрольная выборка n=88	Женщины, больные ИБС n=78
Аллели	T	0,33	0,40
	C	0,67	0,60
Критерий χ^2=0,99 (P > 0,05)			
Генотипы	TT	0,07	0,17
	TC	0,52	0,47
	CC	0,41	0,36
Критерий χ^2= 3,97 (P > 0,05)			
		Мужчины, контрольная выборка n=86	Мужчины, больные ИБС n=86
Аллели	T	0,43	0,38
	C	0,57	0,62
Критерий χ^2=0,49 (P > 0,05)			
Генотипы	TT	0,13	0,20
	TC	0,60	0,36
	CC	0,27	0,44
Критерий χ^2= 10,29 (P < 0,05)			

Анализ распределения полиморфного маркера 843T/C гена *CLOCK* в зависимости от пола показал, что среди мужчин контрольной группы частота встречаемости генотипа TC достоверно выше, чем в группах мужчин, страдающих ЭАГ и ИБС. У мужчин, имеющих генотип CC, достоверно повышен риск возникновения ЭАГ (OR = 2,26) и ИБС (OR = 2,17). У женщин с диагнозами ЭАГ и ИБС частота генотипа TT оказалась почти в 2,5 раза выше, чем у женщин контрольной группы. Однако эти различия не достоверны по критерию χ^2.

Однонуклеотидная замена тимина на цитозин в положении 843 гена *CLOCK* представляет собой миссенс-мутацию, которая обусловливает замену аминокислоты в определенном месте цепи полипептида. Миссенс-мутации, как известно, часто приводят к изменению физиологической роли белка [Северин, 2003]. Можно предполагать, что возможное изменение функционирования белка CLOCK вследствие замены аминокислоты может привести к нарушению механизмов циркадной регуляции, которой подвержены многие физиологические показатели и процессы сердечно-сосудистой системы. Важно отметить, что белок CLOCK является одним из основных регуляторов циркадной периодичности, он представляет собой транскрипционный фактор, а также обладает активностью ацетилтрансферазы гистонов [Doi et al., 2006]. Регулирование на уровне хроматина является важным механизмом в изменении генной экспрессии сердечной ткани, эти процессы лежат в основе роста, восстановления и ремоделирования [Backs, Olson, 2006].

Нами обнаружена взаимосвязь между полиморфизмами 3111T/C и 843T/C и развитием эссенциальной артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца. В случае одного и другого полиморфизма у мужчин, имеющих генотип CC, достоверно повышен риск возникновения ЭАГ и ИБС. Известно, что ген *CLOCK* расположен на хромосоме 4, и более вероятно, что изучаемый признак не сцеплен с полом. Различие в распределении генотипов по изучаемым полиморфным маркерам у мужчин и женщин в группах больных с диагнозами ЭАГ и ИБС и контрольной группе можно объяснить различным влиянием половых гормонов на проявление этих аллелей. Вместе с тем полиморфные варианты гена *CLOCK* могут по-разному влиять на содержание эстрогенов и андрогенов. Считается, что эстрогены обладают выраженной протективной способностью при кардиоваскулярных патологиях [Swedberg et al., 1990]. Возможным механизмом их защитного действия на сердечно-сосудистую систему является подавление экспрессии некоторых генов, ответственных за регуляцию кровяного давления, а именно гена рецептора ангиотензина AT1 и ангиотензинпревращающего фермента [Swedberg et al., 1990; Reckelhoff, 2005].

Наши результаты указывают на взаимосвязь между развитием ЭАГ и ИБС и изучаемыми полиморфными маркерами у населения Карелии. Одним из возможных механизмов, посредством которых мутации в циркадных генах влияют на формирование сердечно-сосудистых патологий, является участие этих генов в патологическом ремоделировании и повреждении сосудов. Например, на мышах показано, что мутация гена *Clock* вызывает патологическое изменение структуры сосудов, а нокаут гена *Bmal1* приводит к накоплению коллагена в сосудах, повышению чувствительности к тромбозу и дисфункции эндотелия (реактивному ответу на действие вазорелаксантов) [Anea et al., 2009].

Изменения в структуре генов циркадных ритмов могут влиять на уровень экспрессии генов, белковые продукты которых вовлечены в регуляцию артериального давления и водно-солевого обмена. Известно, что белковый димер CLOCK:BMAL [Maemura et al., 2000] и белок PERIOD2 [Oishi et al., 2009] участвуют в регуляции циркадных колебаний экспрессии гена ингибитора активатора плазминогена PAI-1 в сердечно-сосудистых тканях. PAI-1 – первичный регулятор фибринолитического каскада, его активность и концентрация мРНК изменяются по циркадному типу с пиком в утренние часы [Angleton et al., 1989; Hoekstra et al., 2002], который совпадает со временем наибольшего риска развития инфаркта миокарда [Cohen et al., 1997]. Ритмичность экспрессии гена PAI-1 ослаблена в сердце мышей, мутантных по гену *Clock* [Minami et al., 2002]. Нокаут гена *Bmal1* вызывает у мышей повышение агрегации и адгезии тромбоцитов, увеличение концентрации PAI-1 и фактора свертываемости крови Виллебранда [Somanath et al., 2011].

Мутации в циркадных генах вызывают изменения не только в процессах свертывания крови, но и в гомеостазе водно-солевого обмена. Например, показано, что экспрессия гена NHE3 (Na^+/H^+-транспортера почечного эпителия) регулируется непосредственно гетеродимерами CLOCK:BMAL1, которые способны связываться с определенной последовательностью ДНК гена NHE3 [Saifur et al., 2005].

Следует отметить, что механизмы, посредством которых часовые гены могут участвовать в формировании сердечно-сосудистых патологий, до конца не изучены. По упомянутым литературным данным, основным механизмом влияния полиморфных вариантов гена *CLOCK* на развитие сердечно-сосудистых патологий может быть влияние на уровень экспрессии генов, белковые продукты которых вовлечены в регуляцию артериального давления и водно-солевого обмена.

Выводы

1. Обнаружена взаимосвязь между развитием ЭАГ и ИБС и полиморфными маркерами 3111T/C и 843T/C гена *CLOCK* у населения Карелии.
2. У мужчин, носителей генотипа CC по полиморфному маркеру 3111T/C гена *CLOCK*, достоверно повышен риск возникновения ЭАГ (OR = 1,49) и ИБС (OR = 1,57).
3. У мужчин, носителей генотипа CC по полиморфному маркеру 843T/C гена *CLOCK*, достоверно повышен риск возникновения ЭАГ (OR = 2,26) и ИБС (OR = 2,17).

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Фонда содействия отечественной науке «Кандидаты наук РАН», программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» и гранта Президента РФ «Ведущие научные школы РАН» НШ-3731.2010.4.

Литература

Северин Е.С. Биохимия: уч. для вузов. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2003. С. 202–203.

Andrews N. P., Gralnick H. R., Merryman P. et al. Mechanisms underlying the morning increase in platelet aggregation: a flow cytometry study // J. Am. Coll. Cardiol. 1996. Vol. 28. P. 1789–1795.

Anea C. B., Zhang M., Stepp D. W. et al. Vascular disease in mice with a dysfunctional circadian clock // Circulation. 2009. Vol. 119, N 11. P. 1510–1517.

Angleton P., Chandler W. L., Schmer G. Diurnal variation of tissue-type plasminogen activator and its rapid inhibitor (PAI-1) // Circulation. 1989. Vol. 79. P. 101–106.

Backs J., Olson E. N. Control of cardiac growth by histone acetylation/deacetylation // Circ. Res. 2006. Vol. 98. P. 15–24.

Bailer U., Wiesegger G., Leisch F. et al. No association of clock gene T3111C polymorphism and affective disorders // Eur. Neuropsychopharmacol. 2005. Vol. 15. P. 51–55.

Benedetti F., Dallaspezia S., Fulgosi M. C. et al. Actimetric evidence that CLOCK 3111 T/C SNP influences sleep and activity patterns in patients affected by bipolar depression // Am. J. Med. Genet. Part B: Neuropsychiatric Genetics. 2007. Vol. 144B. P. 631–635.

Benedetti F., Radaelli D., Bernasconi A. et al. Clock genes beyond the clock: CLOCK genotype biases neural correlates of moral valence decision in depressed patients // Genes. Brain Behav. 2008. Vol. 7. P. 20–25.

Cohen M. C., Rohtla K. M., Lavery C. E. et al. Metaanalysis of the morning excess of acute myocardial infarction and sudden cardiac death // Am. J. Cardiol. 1997. Vol. 79. P. 1512–1516.

Desan P. H., Oren D. A., Malison R. et al. Genetic polymorphism at the CLOCK gene locus and major depression // Am. J. Med. Genet. 2000. Vol. 96, N 3. P. 418–421.

Doi M., Hirayama J., Sassone-Corsi P. Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase // Cell. 2006. Vol. 125. P. 497–508.

Friedman L., Zeitzer J. M., Kushida C. et al. Scheduled bright light for treatment of insomnia in older adults // J. Am. Geriatr. Soc. 2009. Vol. 57. P. 441–452.

Heng O. K., Saha N., Toy J. S. Lack of association of apolipoprotein E polymorphism with plasma Lp(a) levels in the Chinese // Clin. Genetics. 1995. Vol. 48, N 3. P. 113–119.

Hesketh J. Untranslated regions are important in mRNA localization and translation: lessons from selenium and metallothionein // Biochem. Soc. Trans. 2004. Vol. 32, N 6. P. 990–996.

Hoekstra T., Geleijnse J. M., Schouten E. G., Kluft C. Diurnal variation in PAI-1 activity predominantly confined to the 4G-allele of the PAI-1 gene // Thromb. Haemost. 2002. Vol. 88, N 5. P. 794–798.

Katzenberg D., Young T., Finn L. et al. A CLOCK polymorphism associated with human diurnal preference // Sleep. 1998. Vol. 21. P. 569–576.

Maemura K., de la Monte S. M., Chin M. T. et al. CLIF, a novel cycle-like factor, regulates the circadian oscillation of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275. P. 36847–36851.

Minami Y., Horikawa K., Akiyama M., Shibata S. Restricted feeding induces daily expression of clock genes and Pai-1 mRNA in the heart of Clock mutant mice // FEBS Lett. 2002. Vol. 526. P. 115–118.

Mishima K., Tozawa T., Satoh K. et al. The 3111T/C polymorphism of hClock is associated with evening preference and delayed sleep timing in a Japanese population sample // Am. J. of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics. 2005. Vol. 133B. P. 101–104.

Monteleone P., Tortorella A., Docimo L. et al. Investigation of 3111T/C polymorphism of the CLOCK gene in obese individuals with or without binge eating disorder: association with higher body mass index // Neurosci. Lett. 2008. Vol. 435. P. 30–33.

Oishi K., Miyazaki K., Uchida D. et al. PERIOD2 is a circadian negative regulator of PAI-1 gene expression in mice // J. Mol. Cell. Cardiol. 2009. Vol. 46. P. 545–552.

Otto M. E., Svatikova A., Barretto R. B. et al. Early morning attenuation of endothelial function in healthy humans // Circulation. 2004. Vol. 109. P. 2507–2510.

Reckelhoff J. F. Sex steroids, cardiovascular disease, and hypertension: unanswered questions and some speculations // Hypertension. 2005. Vol. 45. P. 170–174.

Robilliard D. L., Archer S. N., Arendt J. et al. The 3111 Clock gene polymorphism is not associated with sleep and circadian rhythmicity in phenotypically characterized human subjects // J. Sleep. Res. 2002. Vol. 11. P. 305–312.

Rudic R. D., McNamara P., Reilly D. et al. Bioinformatic analysis of circadian gene oscillation in mouse aorta // Circulation. 2005. Vol. 112. P. 2716–2724.

Saifur R. M., Emoto N., Nonaka H. et al. Circadian clock genes directly regulate expression of the Na(+)/H(+) exchanger NHE3 in the kidney // Kidney Int. 2005. Vol. 67, N 4. P. 1410–1419.

Serretti A., Benedetti F., Mandelli L. et al. Genetic dissection of psychopathological symptoms: insomnia in mood disorders and CLOCK gene polymorphism // Am. J. Med. Genet. Part B: Neuropsychiatr. Genet. 2003. Vol. 121B. P. 35–38.

Somanath P. R., Podrez E. A., Chen J. et al. Deficiency in core circadian protein BMFL1 is associated with a prothrombotic and vascular phenotype // J. Cell Physiol. 2011. Vol. 226, N 1. P. 132–140.

Swedberg K., Eneroth P., Kjekshus J., Wilhelmsen L. Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality // Circulation. 1990. Vol. 82. P. 1730–1736.

Tiret L., Godefroy T., Lubos E. et al. Genetic analysis of the interleukin-18 system highlights the role of the interleukin-18 gene in cardiovascular disease // Circulation. 2005. Vol. 112, N 5. P. 643–650.

Voinescu B. I. Clock genes, chronotypes and diseases // HVM Int. J. Bioflux. 2009. Vol. 1, N 1. P. 19–35.

Von Schantz. Phenotypic effects of genetic variability in human clockgeneson circadianand sleep parameters // J. Genetics. 2008. Vol. 87, N 5. P. 513–519.

Woo K. C., Kim T.-D., Lee K.-H. et al. Mouse period 2 mRNA circadian oscillation is modulated by PTB–mediated rhythmic mRNA degradation // Nucleic Acids Research. 2009. Vol. 37, N 1. P. 26–37.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Макеева Ирина Валерьевна
ведущий биолог
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: irina7m@yandex.ru
тел. (8142) 571879

Коломейчук Сергей Николаевич
научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: sergey_kolomeychuk@rambler.ru
тел. (8142) 571879

Makeeva, Irina
Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: irina7m@yandex.ru
tel. (8142) 571879

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

Топчиева Людмила Владимировна
старший научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: topchieva@krc.karelia.ru
тел. (8142) 571879

Topchieva, Lyudmila
Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: topchieva@krc.karelia.ru
tel. (8142) 571879

Корнева Виктория Алексеевна
ассистент кафедры факультетской терапии, к.м.н.
Петрозаводский государственный университет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185000
эл. почта: vikkorneva@mail.ru

Korneva, Victoria
Faculty Therapy Department of Petrozavodsk State University,
33 Lenin St., 185000 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: vikkorneva@mail.ru

Немова Нина Николаевна
директор ИБ КарНЦ РАН, зав. лаб. экологической физиологии растений, д.б.н., проф., чл.-корр. РАН
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: nemova@krc.karelia.ru
тел. (8142) 783615

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

Труды Карельского научного центра РАН
№ 3. 2011. С. 97–104.

УДК 571.1/581.5

СОСТАВ ЛИПИДОВ И ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ЛИСТЬЯХ ПАПОРОТНИКА *MATTEUCCIA STHRUTHIOPTERIS*, ФОРМИРУЮЩИХСЯ ПОД ВЛИЯНИЕМ КАДМИЯ

О. А. Розенцвет[1], Е. С. Богданова[1], С. В. Мурзаева[2]

[1] *Институт экологии Волжского бассейна РАН*
[2] *Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН*

Исследовали влияние нитрата кадмия (100 мкМ) на развитие папоротника *Matteuccia sthruthiopteris* при инкубировании в течение 10 сут на среде Кнопа. При накоплении кадмия растениями до 80 % металла аккумулируется в придаточных корнях, а остальная часть распределяется по стволику корневища и далее в надземных формирующихся листьях. В улитках и взрослых листьях кадмий обнаруживается до 1,2 и 9 мкг/г сухой массы соответственно, при этом стимулируется рост и увеличивается биомасса взрослых листьев. На разных стадиях развития листьев происходят определенные изменения в составе липидов и жирных кислот, среди которых главными являются увеличение содержания гликолипидов, бетаинового липида и разнонаправленные изменения в составе фосфолипидов. Сделан вывод об устойчивости *M. sthruthiopteris* к кадмию за счет адаптационных возможностей, которые реализуются на организменном и клеточном уровнях.

Ключевые слова: *Matteuccia sthruthiopteris*, липиды, жирные кислоты, кадмий.

O. A. Rozentsvet, E. S. Bogdanova, S. V. Murzaeva. COMPOSITION OF LIPIDS AND FATTY ACIDS IN THE FORMING LEAVES OF THE FERN *MATTEUCCIA STHRUTHIOPTERIS* IN THE PRESENCE OF CADMIUM

The effect of cadmium nitrate on the leaf growth and lipid composition in the fern *Matteuccia sthruthiopteris* has been examined. The plants were incubated in Knop's medium in the presence/absence of 100 μM of cadmium nitrate during 10 days. The plants accumulated more than 80 % of cadmium in the roots. Accumulation of cadmium in the fiddleheads and mature fronds was about 1.2 and 9.0 μg/g dry weight, respectively. Cadmium was noted to stimulate growth and increase the biomass of mature fronds. At different stages of the leaf development, certain changes in the composition of lipids and fatty acids were observed, particularly, an increased synthesis of glycolipids and a betaine lipid, as well as multidirectional changes in the composition of phospholipids. It was concluded that *M. sthruthiopteris* is resistant to cadmium owing to adaptive features of the lipid metabolism implemented at the morphological and cellular levels.

Key words: *Matteuccia sthruthiopteris*, cadmium, lipids, fatty acids.

Введение

В последние годы в связи с быстрым развитием промышленности усиливается загрязнение окружающей среды, в том числе и тяжелыми металлами (ТМ), в масштабах, не свойственных природе [Greger, 1999; Küpper, Kroneck, 2005; Титов и др., 2007]. Накопление ТМ в почве и воде

вынуждает живые организмы приспосабливаться к новым условиям среды за счет формирования целого ряда механизмов, в определенной степени связанных с устойчивостью клеточных мембран. Липидам мембран и их жирнокислотному (ЖК) составу отводится ведущая роль в регулировании текучести мембраны как одного из механизмов биохимической адаптации растений к условиям окружающей среды [Ипатова, 2005; Harwood, 1999b].

К наиболее токсичным для растений ТМ относится кадмий [Ильин, 1991; Шевякова и др., 2003]. Данные многих авторов показывают, что действие кадмия приводит к качественным и количественным изменениям в составе липидов, ингибированию путей их биосинтеза, редукции ненасыщенности жирных кислот, связанной с перекисным окислением [Ouariti et al., 1997; Jemal et al., 2000; Nouairi et al., 2006]. Характер изменений в содержании липидов существенно зависит от видовых особенностей организма, типа тканей и органов, а также природы металла, его концентрации и продолжительности воздействия [Tukendorf, 1993; Нестеров и др., 2009]. В ряде работ показано, что существует определенная зависимость в реакции растений на действие кадмия от их возраста [Drazkiewicz et al., 2003; Казнина и др., 2010], однако мало известно об участии липидов в этих процессах.

Среди современных растений папоротники являются одной из древнейших и наиболее жизнеспособных групп. Они представляют огромный интерес в изучении стратегии выживания растительных организмов, поскольку обладают достаточно простыми и эффективными приспособительными реакциями к условиям окружающей среды [Dyer, 1979]. Установлено, что некоторые виды папоротников способны связывать токсичные ТМ в достаточно больших количествах [Chang et al., 2009].

В связи с вышесказанным в настоящей работе исследовали качественный и количественный состав липидов и ЖК в листьях папоротника *Matteuccia sthruthiopteris* (L.) Todaro при их формировании под влиянием кадмия. Следует подчеркнуть, что молодые листья данного вида папоротника у некоторых народов используются в пищу [Намзалова, Шмаков, 2009]. Количественные и качественные модификации липидного спектра, вызванные влиянием ТМ, и их накопление в растительных тканях приводят к изменению пищевой ценности растений. Этот аспект в исследовании липидов не менее значим, чем изучение приспособительных реакций растений.

Материалы и методы

M. sthruthiopteris (страусник обыкновенный) относится к отделу Polypodiophyta, классу Polypodiopsida, порядку Polypodiales, семейству Onocleaceae [Черепанов, 1995]. Это столонообразующий вид папоротника, имеет короткий вертикальный стволик с отходящими корнями, который обычно называют корневищем. На верхушке стволика располагается крупная почка, в ней заложены несколькими кругами зачатки листьев.

Папоротники выкапывали из почвы в мае, когда растения находились еще в состоянии покоя. Для опытов использовали корневища без листьев, которые промывали в проточной воде, обсушивали, взвешивали и помещали в отдельные сосуды на питательную среду Кнопа (соотношение веса корневища к объему среды 1 : 4). После адаптации в течение 1 сут к новым условиям в питательную среду однократно добавляли нитрат кадмия в концентрации 100 мкМ. Растения инкубировали в условиях освещения 400 ± 200 лк при 15-часовом световом дне и температуре 20°С. Ростовые процессы оценивали по приросту биомассы надземных частей и длине сформировавшейся листовой пластины по истечении 10 сут. Для биохимических анализов использовали ткани фотосинтезирующих органов: улитки и сформировавшиеся взрослые листья, разделенные на верхние, срединные и нижние сегменты.

Липиды выделяли по методу [Bligh, Dyer, 1959]. Количественное содержание суммарных липидов (СЛ) определяли гравиметрически. Фосфолипиды (ФЛ) разделяли методом двумерной тонкослойной хроматографии (ТСХ) на стеклянных пластинках 6 х 6 см с закрепленным слоем силикагеля с использованием систем растворителей: первое направление – хлороформ : метанол : бензол : аммиак (130 : 60 : 20 : 12 по объему); второе – хлороформ : метанол : бензол : ацетон : уксусная кислота (140 : 60 : 20 : 10 : 8). Проявляли ФЛ 10%-й H_2SO_4 в метаноле с последующим нагреванием при 180°С в течение 15 мин. Количество ФЛ определяли по содержанию неорганического фосфора [Vaskovsky, Latyshev, 1975].

Гликолипиды (ГЛ) разделяли методом одномерной ТСХ на пластинках 10 х 10 см с использованием системы растворителей – ацетон : бензол : вода (91 : 30 : 8 по объему). Проявляли ГЛ 5%-м раствором $12MoO_3 x H_3PO_4$ в метаноле с последующим нагреванием при температуре 150°С в течение 10 мин. Количество ГЛ определяли денситометрическим способом [Кейтс, 1975].

Содержание бетаинового липида 1,2-диацилглицерил-3-О-4'-(N,N,N-триметил) гомосерина (ДГТС) определяли спектрофотометрически, как описано в работе [Rozentsvet, 2000].

Для анализа ЖК использовали их метиловые эфиры, которые получали путем кипячения в 5%-й HCl в метаноле. Полученные эфиры

анализировали на хроматографе «Хроматэк Кристалл 5000.1» (Россия) с помощью капиллярной колонки длиной 105 м и диаметром 0,25 мм RESTEK (США). Температура колонки 180°С, испарителя и детектора 260°С. Скорость тока газа-носителя (гелий) 20 мл/мин.

Содержание кадмия в тканях определяли после мокрого озоления на атомно-абсорбционном спектрофотометре «МГА-915» (Россия) [Голубкина, 1995].

Данные обрабатывали в программе Excel. В таблицах и на рисунках представлены средние арифметические значения из трех биологических повторностей и их стандартные отклонения от среднего.

Результаты и обсуждение

Листья, или вайя папоротников, в отличие от цветковых и древесных растений, представляют собой нечто промежуточное между листьями в обычном понимании и ветвями побегов [Шмаков, 2007]. Развитие зеленой части растений начинается с появления побега в форме улиткообразного листа. Улитка в начале роста под влиянием гормона ауксина быстро раскручивается, и внутренняя сторона улитки растет быстрее, чем верхняя. Дальнейший рост листостебельной части папоротников происходит делением одной апикальной клетки – инициали, которая делится и в дальнейшем формирует ткани побега [Капранова, 2006].

Различия между листьями возрастных серий объясняются изменениями ритмичности деятельности точки роста на протяжении онтогенеза. Это приводит к созданию одного и того же органа, отдельные части которого отличаются друг от друга в структурном и функциональном отношении [Лодкина, 1983].

В полностью развернувшемся листе можно выделить растущую верхнюю, сформированную срединную и наиболее зрелую нижнюю части. Наличие нитрата кадмия в концентрации 100 мкМ в инкубационной среде в течение 10 сут не приводило к гибели растений, а оказывало стимулирующие действие на рост и развитие фотосинтезирующих органов папоротников. Внесение кадмия в корнеобитаемую среду способствовало увеличению биомассы листьев в 1,6, а их длины – в 1,3 раза (рис. 1А, Б).

По данным атомно-адсорбционного анализа, содержание кадмия в придаточных корнях составляло 51,4 мкг/г сухой массы (табл. 1). В тканях развернувшихся листьев в целом адсорбировалось до 9 мкг кадмия на 1 мг сухой массы. Наибольшее количество кадмия накапливалось в верхней части листьев. Всего в растении, включая корневище и надземную часть, аккумулировалось до 30 % внесенного в питательный раствор металла, из них только 4,6 % транспортировалось в фотосинтезирующие органы. Согласно классификации растений по их способности накапливать ТМ, данный вид папоротников можно отнести к растениям-исключителям, поскольку наибольшая часть поглощенного металла оставалась в корнях [Prasad, 1998].

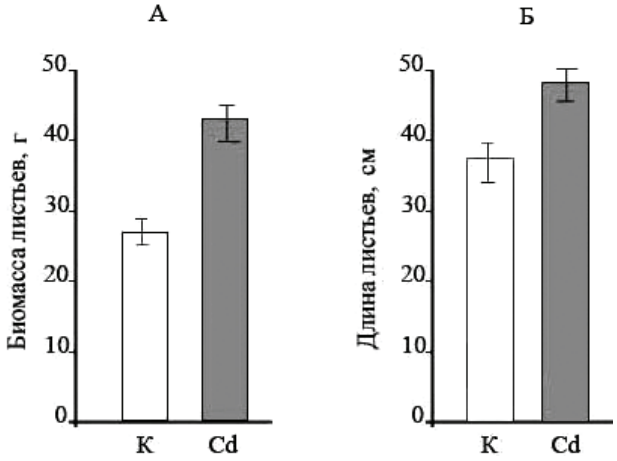


Рис. 1. Влияние кадмия на биомассу (А) и длину листьев (Б) *M. sthruthiopteris*

Здесь и на рис. 2: светлые столбики – контроль; темные – под воздействием кадмия, 100 мкМ

Таблица 1. Содержание кадмия в корневой и надземной частях *M. sthruthiopteris*

Части растений	Cd, мкг/г сухой массы	Поглощенный металл, %
Придаточные корни	51,4±1,9	23,2±2,0
Сердцевина корневища	2,5±0,3	1,1±0,2
Улитки	1,2±0,5	0,5±0,0
Лист:		
верхушечная часть	4,1±0,6	2,0±0,2
срединная часть	3,2±0,9	1,4±0,3
нижняя часть	1,7±0,1	0,7±0,1

Содержание СЛ (рис. 2), выделенных из нативных тканей верхней части листьев контрольных вариантов, было значительно больше, чем в улитках. Под влиянием кадмия количество СЛ в средней и нижней частях листьев увеличивалось на 10–25 % по сравнению с контролем. В верхней части листьев наблюдался обратный эффект, что, возможно, связано с большим концентрированием металла.

Анализ полярных липидов, которые являются структурной основой биологических мембран, показал, что в их состав входят ГЛ, ФЛ и ДГТС (рис. 3). По мере роста листьев в контрольных вариантах менялось соотношение полярных липидов: от наименьшего содержания ГЛ в улитках до максимального в липидах срединной части. Под влиянием кадмия относительное количество ГЛ увеличива-

лось в 1,4–1,8 раза практически во всем листе. Содержание ФЛ уменьшалось в 1,1–1,4 раза, особенно значительно в улитках и верхней части листьев (см. рис. 3). ДГТС в составе полярных липидов контрольных опытов варьировал от 0 до 2,5 % от суммы полярных липидов, причем в улитках он был наибольшим, а в зрелых частях листьев не был обнаружен. Кадмий в корнеобитаемой среде приводил к увеличению содержания ДГТС в улитках, верхней и срединной частях и его новообразованию в нижней части листьев растений.

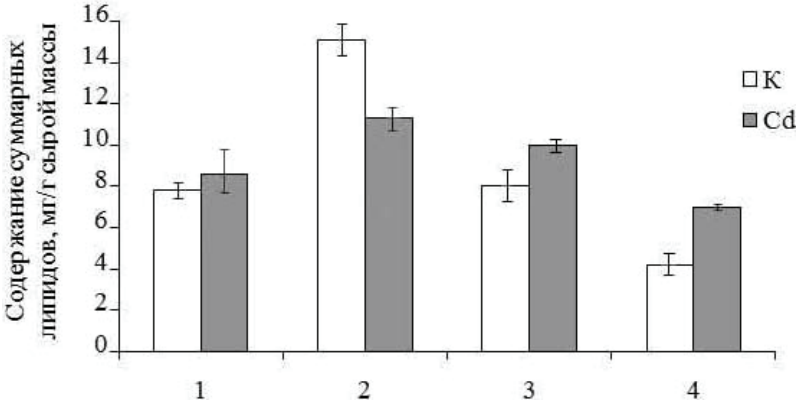


Рис. 2. Влияние кадмия на суммарные липиды (мг/г сырой массы) в формирующихся листьях *M. sthruthiopteris*

Здесь и на рис. 3, 4: 1 – улитки, 2 – верхняя часть листа, 3 – срединная часть листа, 4 – нижняя часть листа

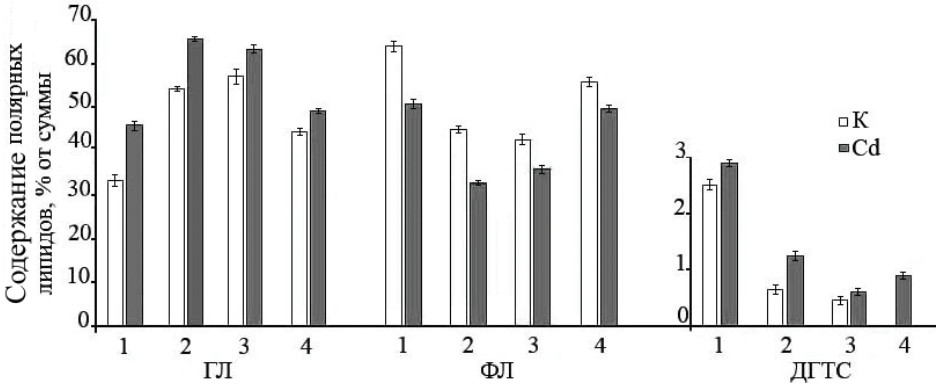


Рис. 3. Влияние кадмия на состав полярных липидов в формирующихся листьях *M. sthruthiopteris*

ГЛ представлены в листьях папоротника традиционным составом: моногалактозилдиацилглицерином (МГДГ), дигалактозилдиацилглицерином (ДГДГ) и сульфохиновозилдиацилглицерином (СХДГ) (табл. 2). Как видно из данных этой таблицы, в условиях наших экспериментов в контрольных вариантах при формировании листьев из улитки до взрослого листа происходило увеличение относительного содержания МГДГ на фоне снижения других ГЛ, особенно СХДГ. Под влиянием кадмия содержание МГДГ снижалось во всех частях развернувшихся листьев, а ДГДГ увеличивалось в большей степени в нижней части листа (в 1,2 раза). Еще большее увеличение было выражено для СХДГ: его содержание в составе ГЛ возрастало в тканях улиток (в 1,3 раза) и листьях (в 2,3–3,7 раза) по сравнению с контролем.

Известно, что МГДГ и ДГДГ содержатся как в оболочке хлоропластов, так и в мембранах тилакоидов и гран [Hőlzl, Dőrman, 2007]. Оба эти липида стабилизируют фотосинтетические мембраны, связанные с функционированием фотосистем (ФС) I и ФС II, но МГДГ играет еще важную роль в стабилизации сильно искривленных участков мембраны тилакоидов и участвует в переносе электронов [Murata, 1983]. СХДГ локализован только в мембранах тилакоидов. Предполагается, что благодаря тому, что СХДГ является отрицательно заряженным, он участвует в процессе формирования гран и обеспечивает оптимальную конфигурацию мембран для активного электронного транспорта в ФС II [Мокроносов, Гавриленко, 1992; Dőrman, Benning, 2002]. Очевидно, увеличение содержания СХДГ в составе липидов можно расценивать как компенсацию избытка катионов, которые привносят ионы кадмия при их проникновении в клетку.

Не менее важным для нормального процесса фотосинтеза является соотношение двух других ГЛ [Krupa, Baszynsky, 1989; Skorzynska et al., 1991; Nouairi et al., 2006]. По литературным данным, соотношение МГДГ/ДГДГ в хлоропластах должно быть не менее 2 [Гудвин, Мерсер, 1986]. Меньшие значения могут указывать на нарушение структуры мембран тилакоидов и деградацию фотосинтетических доменов, содержащих ФС II [Nouairi et al., 2006]. В липидах листьев контрольных вариантов соотношение МГДГ/ДГДГ увеличивалось по мере их разви-

тия от 1,6 до 3,6, причем максимальным оно было в липидах срединной части листа (рис. 4). Наличие кадмия в среде выращивания и его аккумуляция в листьях приводили к увеличению соотношения МГДГ/ДГДГ в липидах улиток до значения, равного 2, однако в нижней части листа соотношение МГДГ/ДГДГ снижалось до 1,6. Накопление кадмия в количестве 4,1 мкг/г сухой массы (см. табл. 1) в верхних частях листьев не влияло на соотношение главных ГЛ, в отличие от сформированных ранее нижних частей, в которых при меньшем (1,7 мкг/г) содержании кадмия наблюдалось изменение их соотношения.

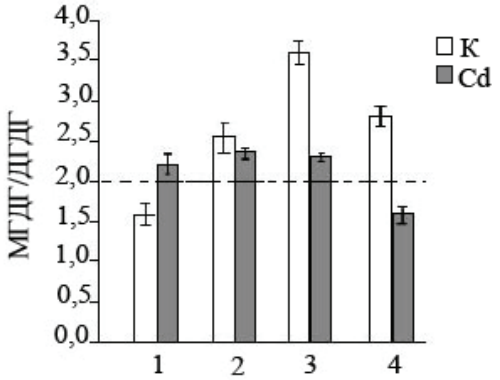


Рис. 4. Влияние кадмия на соотношение МГДГ к ДГДГ в формирующихся листьях *M. sthruthiopteris*

Во фракции ФЛ главными липидами являются фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ), фосфатидилинозит (ФИ) и фосфатидилглицерин (ФГ). Обнаружены также минорные компоненты дифосфатидилиглицерин (ДФГ), фосфатидная кислота (ФК), фосфатидилсерин (ФС) и лизофосфатиды (ЛФ) (см. табл. 2). Внесение кадмия в питательную среду способствовало снижению уровня ФХ в среднем в 1,2 раза практически у всех образцов растений. Относительное содержание ФЭ в составе ФЛ улиток снижалось в 1,8 раза, во взрослых листьях оно увеличивалось и наиболее интенсивно в верхних частях. Количественные изменения в относительном содержании ФГ отмечены только для липидов улиток. Кроме того, менялся уровень ФИ, который, согласно литературным данным, в значительных количествах присутствует в митохондриях. В верхней и нижней частях листа содержание ФИ снижается в 1,8 и 1,4 раза. Отмечены значительные изменения в сторону увеличения в содержании минорных компонентов ФЛ. Например, в тканях улиток увеличивалось количество ФК, а в развитом листе – содержание ДФГ и лизоформ ФЛ (в контроле они отсутствовали). ЛФ – это продукты распада ФЛ при действии фосфолипазы А, они токсичны и разрушают мембраны [Bargmann, Munnik, 2006; Wang et al., 2006]. В то же время ионы кадмия способствовали увеличению лабильного компонента ФС, который метаболически связан с синтезом ФЭ [Hőlzl, Dőrman, 2007]. Эти данные свидетельствуют о разнонаправленных изменениях в липидном обмене в клетках улиток и листьев папоротников, которые происходят под действием кадмия.

Таким образом, в улитках и взрослых листьях под влиянием кадмия меняется состав структурных компонентов фотосинтетических мембран хлоропластов и других мембранных структур клетки, которые в значительной степени были связаны со стадией формирования листьев.

Показателем модификации биологических мембран служат также изменения в составе ЖК липидов. Увеличение количества ненасыщенных ЖК придает мембранам бóльшую текучесть, приобретаются свойства пластичности мембран [Harwood, 1999a]. Под действием ТМ возможно увеличение количества насыщенных ЖК, что приводит снижению их проницаемости, благодаря чему осуществляется защита от воздействия ТМ [Rama Devi, Prasad, 1999]. Вместе с тем увеличение насыщенности ЖК может приводить к снижению активности ФС II за счет увеличения расстояния между светособирающим комплексом и реакционным центром [Мокроносов, Гавриленко, 1992].

Результаты анализа ЖК общей липидной фракции, выделенной из улиток и листьев *M. sthruthiopteris,* представлены в табл. 3. Основную группу ЖК составляют кислоты с длиной цепи 16–18 атомов углерода, но довольно значителен (8,1–15,8 %) вклад длинноцепочечных ЖК (ДЦК). Ненасыщенные (ННК) ЖК представлены мононенасыщенными (С18:1), диеновыми (С18:2, С20:2) и полиненасыщенными ЖК. Среди последних преобладает линоленовая (С18:3) и арахидоновая (С20:4) ЖК. В сумме насыщенные кислоты (НК) (короткоцепочечные и ДЦК) составляли в контроле 32,3–42,5 %, а ННК – 57,6–67,7 %, что типично для этой группы растений [Heigh, 1969; Jamieson, Reid, 1975]. Доминирующей насыщенной ЖК является пальмитиновая кислота (С16:0). Содержание ее в контроле возрастало по мере формирования листьев (от 28,4 до 34 %). Под влиянием кадмия в нижней части листьев возрастало общее количество насыщенных ЖК (С14:0, С16:0, С20:0). Это означало, что пластичность (текучесть) мембран клеток в частях листьев, закончивших рост, уменьшалась. В улитках, срединной и верхней частях листьев соотно-

шение НК/ННК менялось незначительно, но существенно менялся состав ННК. Так, в липидах улиток увеличивалось содержание С18:1, в липидах верхней части – С18:1, С18:3 и С20:4 ЖК. В срединной части наблюдали увеличение содержания кислоты С18:1 и снижение С18:3. Следует подчеркнуть, что в листьях данного папоротника в контроле среди ДЦК большую часть ЖК составляют ненасыщенные кислоты (ДЦННК). Их содержание – 74,7–89,2 %. Под воздействием кадмия отношение насыщенных ЖК (ДЦНК) в этой группе кислот к ненасыщенным менялось неоднозначно: увеличивалось в улитках (с 8,6 до 10,9) и верхних частях листьев (с 3,2 до 5,3), а в срединных и нижних – снижалось. Таким образом, изменения в составе ЖК, так же как и в составе липидов, которые происходили под действием кадмия, зависели от стадии формирования листьев.

Таблица 2. Влияние кадмия на содержание индивидуальных полярных липидов в формирующихся листьях *M. sthruthiopteris* (% от суммы)

Липиды	Улитки		Части листа					
			верхняя		срединная		нижняя	
	K	Cd	K	Cd	K	Cd	K	Cd
Гликолипиды								
МГДГ	51,3±0,9	52,2±0,5	69,9±0,5	63,9±1,3*	73,9±0,1	62,2±1,5*	71,1±1,4	57,2±2,2*
ДГДГ	32,2±2,5	26,0±1,0*	27,3±0,9	27,6±1,1	21,0±1,0	26,0±1,6*	25,6±3,5	31,1±1,6*
СХДГ	16,4±3,5	21,7±0,3*	2,7±0,1	8,3±1,3*	4,9±0,8	11,1±0,9*	3,1±0,6	11,5±1,9*
Фосфолипиды								
ФХ	44,9±1,0	36,4±1,6*	42,7±0,1	37,3±5,8	40,4±0,1	33,0±0,6*	42,5±0,3	34,0±1,3*
ФЭ	31,4±1,7	17,1±3,4*	17,4±0,3	27,9±2,0*	22,6±1,6	24,7±1,5	25,9±0,7	28,1±2,5
ФГ	7,8±0,9	4,9±1,7	13,0±0,2	15,0±3,8	16,8±0,8	16,9±0,4	10,7±2,8	9,4±3,2
ФИ	13,1±0,4	12,9±2,6	20,3±0,1	11,3±1,0*	12,8±0,6	13,7±1,2	15,6±1,1	11,3±1,4*
ФК	2,2±0,8	26,1±4,8*	5,8±0,5	5,6±3,3	6,6±0,8	8,6±0,8*	4,6±0,6	11,5±2,7*
ДФГ	0,2±0,1	1,5±0,3*	0,8±0,1	1,1±0,2	0,8±0,0	1,3±0,1	0,7±0,1	2,0±0,9*
ФС	0,4±0,1	1,1±0,3*	0,0±0,1	0,5±0,6*	0,0±0,0	0,8±0,0*	0,0±0,0	2,6±0,1*
ЛФ	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,1	1,3±0,0*	0,0±0,0	1,0±0,7*	0,0±0,0	1,1±0,1*

Примечания. Здесь и в табл. 3: K – отсутствие кадмия в среде, Cd – концентрация кадмия в среде 100 мкМ; * различия с контролем достоверны при P ≤ 0,05.

Таблица 3. Влияние кадмия на состав жирных кислот общих липидов в формирующихся листьях *M. sthruthiopteris* (% от суммы)

Кислоты	Улитки		Части листа					
			верхняя		срединная		нижняя	
	K	Cd	K	Cd	K	Cd	K	Cd
Насыщенные ЖК								
12:0	0,0±0,3	0,2±0,0	2,1±0,5	0,0±0,0	0,3±0,5	0,2±0,0	0,4±0,3	0,2±0,2
14:0	0,4±0,0	0,5±0,1	1,9±0,6	0,8±0,1	0,9±0,0	0,1±0,0	1,2±±0,3	7,0±0,0
16:0	28,4±1,1	25,8±0,3*	29,7±0,3	32,3±0,5*	32,5±0,9	33,4±1,4	34,0±0,1	30,7±0,5*
18:0	1,8±0,1	2,3±0,3*	2,5±0,2	2,9±0,5	2,9±0,2	3,1±0,5	4,4±0,1	3,0±0,1*
20:0	0,4±0,2	0,4±0,0	0,5±0,1	0,5±0,7	0,5±0,1	0,5±0,4	0,8±0,2	3,6±0,4*
22:0	0,7±0,3	0,8±0,1	0,5±0,1*	0,7±0,1	0,2±0,1	0,3±0,1	1,1±0,0	0,8±0,1
23:0	0,6±0,1	0,1±0,0*	1,1±0,2	0,2±0,1*	0,2±0,2	0,0±0,0*	0,6±0,0	1,4±0,6*
	32,3±2,0	30,1±0,9*	38,3±0,0	37,4±1,8	37,5±1,5	37,6±2,1	42,5±1,4	46,7±1,1
Ненасыщенные ЖК								
16:1	2,7±0,3	3,3±0,2*	5,5±0,3	2,7±0,8*	3,5±0,1	1,2±0,0*	3,1±0,3	2,0±0,5*
18:1	0,5±0,1	0,5±0,1	1,3±0,2	2,2±0,3*	2,4±0,5	2,0±0,5	0,8±0,3	1,2±0,6
18:1	12,1±1,2	14,3±0,8	12,9±1,8	15,9±0,1*	7,1±0,5	19,6±1,1*	8,2±0,8	8,3±1,0
18:2	23,0±0,3	22,0±0,1	14,3±1,5	14,5±0,1*	14,8±0,7	14,3±2,0	15,9±0,4	14,3±2,0
18:3	15,3±0,8	15,6±0,9	16,0±1,1	17,6±0,1	23,4±2,0	19,2±0,0*	21,2±1,2	15,3±0,1*
20:2	0,2±0,0	0,4±0,1	1,3±0,9	0,2±0,4	0,2±0,0	0,2±1,0	1,1±0,3	5,0±0,4*
20:3	2,1±0,9	2,1±0,0	1,1±0,2	1,2±0,9	1,1±0,0	1,0±0,3	0,8±0,5	0,9±0,0
20:4	9,9±0,7	10,4±0,3	2,3±0,7	4,3±1,3*	3,0±0,2	3,7±0,1	3,7±0,2	4,2±0,0*
20:5	1,9±0,7	1,3±0,0	2,1±0,5	1,7±1,1	2,9±0,7	1,3±0,3	1,8±0,4	2,0±0,1
X	0,0±0,0	0,0±0,0	4,9±0,3	2,4±0,4	4,2±0,5	0,0±0,0	1,0±0,8	0,3±0,0
	67,7±2,5	69,9±0,5	61,7±2,1	62,7±4,5	62,6±5,0	62,5±1,8	57,6±2,4	53,5±3,0*
НК/ННК	2,0	2,3	0,8	0,8	1,7	1,7	1,3	1,1
ДЦК	15,8±3,4	15,5±3,7	8,9±0,7	8,8±1,4	8,1±1,2	7,0±1,4	9,9±1,0	17,9±1,7
ДЦННК	14,1±4,3	14,2±4,6	6,8±0,5	7,4±1,7	7,2±1,3	6,2±1,5	7,4±1,3	12,1±2,9
ДЦНК/ДЦННК	8,6	10,9	3,2	5,3	8,0	7,7	3,0	2,1

Известно, что в толерантных растениях основными механизмами, обеспечивающими защиту от ТМ на клеточном уровне, являются: связывание металлов клеточными оболочками, активирование антиоксидантных систем, изменение метаболизма таким образом, чтобы уменьшить токсическое действие металла или ликвидировать его последствия [Sanita di Toppi, Gabbrielli, 1999; Серегин, Иванов, 2001; Hall, 2002]. Как следует из наших данных, корневая система папоротника *M. sthruthiopteris*, так же как и многих других видов растений, способна ограничивать поступление кадмия в надземные органы [Иванов и др., 2003; Казнина и др., 2010]. Вместе с тем, как показали опыты, такая защита не обеспечивает полного задержания кадмия и часть его трансформируется по растению. Присутствие кадмия в корнеобитаемой среде и его накопление в надземных органах вызывали изменения в составе липидов и ЖК, направленных на поддержание целостности и нормальной структурированности клеточных мембран растения. Отметим, что как в накоплении кадмия, так и в реакции липидов на его воздействие отчетливо выражены различия, связанные со стадией развития и формирования листьев. Следует особо обратить внимание на количественное увеличение под влиянием кадмия таких компонентов липидов, как ДГТС, СХДГ и длинноцепочечных ЖК. Не исключено, что это связано со специфическими адаптивными перестройками в липидном обмене, характерными для этой группы растений.

Выводы

Показано, что *M. sthruthiopteris* проявляет устойчивость к нитрату кадмия. Присутствие кадмия при концентрациях 100 мкМ в корнеобитаемой среде стимулировало рост надземной части. Большая часть металла накапливалась в корнях растений. Степень накопления кадмия в надземных органах зависела от стадии формирования листьев. При этом наблюдали изменение состава липидов и углеводородных радикалов ЖК в клеточных мембранах. Детальное исследование состава липидов и ЖК показало, что степень и направленность изменений в составе липидов и ЖК в значительной степени зависели от стадии развития листьев.

Литература

Голубкина Н. А. Флуометрический метод определения селена // Журн. аналит. хим. 1995. Т. 50, № 10. С. 492–497.

Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений. М.: Мир, 1986. Т. 1. В 2-х томах. С. 298–354.

Иванов В. Б., Быстрова Е. И., Серегин И. В. Сравнение влияния тяжелых металлов на рост корня в связи с проблемой специфичности и избирательности их действия // Физиология растений. 2003. Т. 50. С. 445–454.

Ильин В. Б. Тяжелые металлы в системе почва–растение. Н.: Наука, Сибирское отделение, 1991. 148 с.

Ипатова В. И. Адаптация водных растений к стрессовым абиотическим факторам среды. М.:Графикон-принт. 2005. 224 с.

Казнина Н. М., Титов А. Ф., Лайдинен Г. Ф., Батова Ю. В. Влияние кадмия на некоторые физиологические показатели растений ячменя в зависимости от их возраста // Труды Карельского научного центра РАН. 2010. № 2. С. 27–31.

Капранова Н. Н. Удивительные папоротники Земли. Уроки в ботаническом саду. М., 2006. 40 с.

Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975. 323 с.

Лодкина М. М. Черты морфологической эволюции растений, обусловленные спецификой их онтогенеза // Журн. общ. биол. 1983. Т. 44, № 2. С. 239–253.

Мокроносов А. Т., Гавриленко В. Ф. Фотосинтез. Физиолого-экологические и биохимические аспекты. М.: изд-во МГУ. 1992. 320 с.

Намзалова Б. Д.-У., Шмаков А. И. Хозяйственно-ценные папоротники Республики Бурятия // Вестник Алтайского государственного аграрного ун-та. 2009. Т. 54, № 4. С. 26–29.

Нестеров В. Н., Розенцвет О. А., Мурзаева С. В. Изменение состава липидов у пресноводного растения *Hydrilla verticillata* при накоплении и удалении из тканей ионов тяжелых металлов // Физиология растений. 2009. Т. 56, № 1. С. 97–107.

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., Таланова В. В., Казнина Н. М., Лайдинен Г. Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. 172 с.

Черепанов С. К. Сосудистые растения России и сопредельных государств. СПб: Мир и семья, 1995. 989 с.

Шевякова Н. И., Нетронина И. А., Аронова Е. Е., Кузнецов Вл. В. Распределение Cd и Fe в растениях *Mesembryanthemum crystallinum* при адаптации к Cd-стрессу // Физиология растений. 2003. Т. 50, № 5. С. 756–763.

Шмаков А. И. Систематика высших споровых растений. Ч. 1. Барнаул: Азбука, 2007.

Bargmann B. O., Munnik T. The role of phospholipase D in plant stress responses // Curr. Opin. Plant Biol. 2006. Vol. 9. P. 515–522.

Bligh E. G., Dyer W. J. A rapid method of lipid extraction and purification // Canad. J. Biochem. Physiol. 1959. Vol. 37. P. 911–917.

Chang J. S., Yoon I. H., Kim K. W. Heavy metal and arsenic accumulating fern species as potential ecological indicators in As-contaminated abandoned mines // Ecological Indicators. 2009. Vol. 9, N 6. P. 1275–1279.

Dőrman P., Benning C. Galactolipids rule in seeds plant // Trends in Plant Science. 2002. Vol. 7. P. 112–118.

Drazkiewicz M., Tukendorf A., Tadeusz B. Age-dependent response of maize leaf segments to cadmium

treatment: Effect no chlorophyll fluorescence and phytochelatin accumulation // J. Plant Physiol. 2003. Vol. 160. P. 247–254.

Dyer A. F. The experimental biology of ferns. Edinburgh: Academic Press, 1979. 647 p.

Greger M. Metal Availability and Bioconcentration in Plants // Prasad M. N. V., Hagemeyer J. (eds.). Heavy metal stress in plants. From molecules to ecosystems. Berlin: Springer, 1999. P. 1–27.

Hall J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxication and tolerance // J. Exp. Bot. 2002. Vol. 53. P. 1–11.

Harwood J. L. What's so special about plant lipids? // Harwood J.L. (ed.). Plant lipid biosynthesis. Fundamentals and agricultural application. Cambridge: Univ. Press, 1999a. P. 1–28.

Harwood J. L. Environmental Effects on Plant Lipid Biochemistry // Harwood J. L. (ed.). Plant lipid biosynthesis. Fundamentals and agricultural applications. Cambridge: Univ. Press, 1999b. P. 305–363.

Heigh W. Fatty acid composition and biosynthesis in ferns // Biochem. Biophys. Acta. 1969. Vol. 176. P. 647–630.

Hőlzl G., Dőrman P. Structure and function of glycerolipids in plants and bacteria // Prog. Lipid Res. 2007. Vol. 46. P. 225–243.

Jamieson G. R., Reid E. H. The fatty acid composition of fern lipids // Phytochemistry. 1975. Vol. 14. P. 2229–2232.

Jemal F., Zarrouk M., Ghorbal M. H. Effect of cadmium on lipid composition of pepper // Biochem. Soc. Trans. 2000. Vol. 28. P. 907–909.

Krupa Z., Baszynsky T. Acyl lipid composition of thylakoid membranes of cadmium-treated tomato plants // Acta Physiol. Plant. 1989. Vol. 11. P. 111–116.

Küpper H., Kroneck P. M. H. Heavy metal uptake by plants and cyanobacteria // Met. Ions Biol. Syst. 2005. Vol. 44. P. 97–142.

Murata N. Molecular species composition of phosphatidylglycerols from chilling-sensitive and chilling-resistant plants // Plant Cell Physiol. 1983. Vol. 24, N 1. P. 81–86.

Nouairi I., Ben Ammar W., Ben Youssef N. et al. Comparative study of cadmium effects on membrane lipid composition of *Brassica juncea* and *Brassica napus* leaves // Plant Sci. 2006. Vol. 170. P. 511–519.

Ouariti O., Boussama N., Zarrouk M. et al. Cadmium- and copper-induced changes in tomato membrane lipids // Phytochemistry. 1997. Vol. 45, N 7. P. 1343–1350.

Prasad M. N. V. Metal-biomolecule complexes in plants: Occurrence, functions, and applications // Analysis. 1998. Vol. 26, N 6. P. 25–28.

Rama Devi S., Prasad M. N. V. Heavy metal stress in plants. From molecules to ecosystems / Eds. M. N. V. Prassad, J. Hagemeyer. Berlin, 1999. P. 99–117.

Rozentsvet O. A., Saksonov S. V., Dembitsky V. M. Occurence of diacylglyceryl-trimethylhomoserines and major phospholipids in some plants // Phytochemistry. 2000. Vol. 53. P. 1–7.

Sanita di Toppi L., Gabbrielli R. Response to cadmium in higher plants // Envir. and Exp. Bot. 1999. Vol. 41. P. 105–130.

Skorzynska E., Urbanik-Sypniewska T., Russa R., Baszynski T. Galactolipase activity in Cd-treated runner bean plants // J. Plant Physiol. 1991. Vol. 138. P. 454–459.

Tukendorf A. The response of spinach to excess of copper and cadmium // Photosynthetica. 1993. Vol. 28. P. 573–575.

Vaskovsky V. E., Latyshev N. A. Modified Jungnickel's reagent for detecting phospholipids and other phosphorus compounds on thin-layer chromatograms // J. Chromatogr. 1975. Vol. 115. P. 246–249.

Wang X., Devaiah Sh. P., Zhang W., Welti R. Signaling functions of phosphatidic acid // Prog. Lipid Res. 2006. Vol. 45. P. 250–278.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Розенцвет Ольга Анатольевна
д.б.н.
Институт экологии Волжского бассейна РАН
ул. Комзина, 10, Тольятти, Россия, 445003
эл. почта: olgarozen@pochta.ru
тел. (8482) 489609

Богданова Елена Сергеевна
младший научный сотрудник
Институт экологии Волжского бассейна РАН
ул. Комзина, 10, Тольятти, Россия, 445003
эл. почта: cornales@mail.ru
тел. (8482) 489609

Мурзаева Светлана Васильевна
к.б.н.
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
ул. Институтская 3А, Пущино, Россия, 142290
эл. почта: svmurzaeva@rambler.ru
тел. (4967) 739265

Rozentsvet, Olga
Institute of Ecology of the Volga River Basin,
Russian Academy of Sciences
10 Komzin St., 445003 Togliatti, Russia
e-mail: olgarozen@pochta.ru
tel. (8482) 489609

Bogdanova, Elena
Institute of Ecology of the Volga River Basin,
Russian Academy of Sciences
10 Komzin St., 445003 Togliatti, Russia
e-mail: cornales@mail.ru
tel. (8482) 489609

Murzaeva, Svetlana
Institute of Theoretical and Experimental Biophysics,
Russian Academy of Sciences
3A Institutskaya St., 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia
e-mail: svmurzaeva@rambler.ru
tel. (4967) 739265

Труды Карельского научного центра РАН
№ 3. 2011. С. 105–111.

УДК 581.1

ПОТЕРЯ УСТОЙЧИВОСТИ К ОБЕЗВОЖИВАНИЮ У ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЯН *BRASICCA OLERACEAE* L. С РАЗНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ОСТАТОЧНЫХ ХЛОРОФИЛЛОВ

Г. Н. Смоликова

Санкт-Петербургский государственный университет

Приобретение устойчивости к обезвоживанию и деградация хлорофиллов являются важными процессами при созревании «ортодоксальных семян», однако хлорофиллы разрушаются не полностью и присутствуют в остаточных количествах в физиологически зрелых семенах многих видов растений. В работе изучена зависимость между содержанием остаточных хлорофиллов и устойчивостью к обезвоживанию у прорастающих семян капусты белокочанной. Показано, что на этапе прорастания, предшествующем проклевыванию зародышевого корешка, у семян с более высоким содержанием хлорофиллов устойчивость к обезвоживанию снижалась. Это проявлялось в задержке инициации клеточного цикла, снижении скорости прорастания и всхожести. Одной из причин снижения устойчивости может быть то, что присутствующие в семенах хлорофиллы оказывают повреждающее действие путем усиления окислительного стресса.

Ключевые слова: *Brasicca oleraceae* L., семена, деградация хлорофиллов, устойчивость к обезвоживанию, прорастание семян.

G. N. Smolikova. LOSS OF TOLERANCE TO DESICCATION DURING GERMINATION OF *BRASICCA OLERACEAE* L. SEEDS WITH DIFFERENT CONTENT OF RESIDUAL CHLOROPHYLLS

Development of tolerance to desiccation and degradation of chlorophylls are important processes in the maturation of orthodox seeds. However, chlorophylls do not degrade completely and are present in residual quantities in mature seeds of many plant species. We studied the relationship between the content of residual chlorophylls and tolerance to desiccation in germinating cabbage seeds. It was shown that the seeds with higher content of chlorophylls were less tolerant of desiccation at the stage of germination before radical protrusion. The manifestations were delay in cell cycle activation in the seed radicle, lowering of viability and germination rate. One of the presumable reasons for the decrease in seed tolerance is that chlorophylls may damage the cells by intensifying oxidative stress.

Key words: *Brasicca oleraceae* L., seeds, chlorophylls degradation, tolerance of desiccation, seed germination.

Введение

Процесс обезвоживания рассматривается как необходимое событие жизненного цикла у видов, продуцирующих так называемые ортодоксальные семена [Roberts, 1973]. При развитии ортодоксальных семян на материнском растении в них происходит потеря воды, что

совпадает с приобретением зародышами устойчивости к обезвоживанию. Обычно теряется свыше 80% воды, в результате активность метаболических процессов резко снижается, а семена переходят в состояние покоя [Хукстра, Головина, 1999; Golovina et al., 2001]. Очень важен тот факт, что вместе с устойчивостью к обезвоживанию семена приобретают неспецифическую устойчивость и к другим стрессорам окружающей среды.

При благоприятных условиях увлажнения, температуры и освещения метаболические реакции реактивируются и начинается прорастание семян. Эти процессы хорошо описаны в обзоре Н. В. Обручевой [Obroucheva, 2010]. При этом на начальных этапах прорастания семена могут быть обратимо высушены до исходного уровня влагосодержания без потери жизнеспособности.

Наряду с обезвоживанием необходимым условием завершения процесса созревания ортодоксальных семян является деградация хлорофиллов. По мере снижения влагосодержания в созревающих семенах происходят нарушение гранальной структуры хлоропластов, распад фотосистем и хлорофилл-белковых комплексов, в результате чего хлоропласты превращаются в пропластиды [Johnson-Flanagan, Thiagarajan, 1990; Borisjuk et al., 2005]. Есть основание полагать, что оба процесса – снижение содержания хлорофиллов и потеря воды – находятся под контролем одного гормона – абсцизовой кислоты [Ooms et al., 1993].

В этом контексте представляет интерес то, что в семенах многих высших растений хлорофиллы деградируют не полностью. На наличие остаточных хлорофиллов в семенах еще в 1909 г. указывали Н.А. Монтеверде и В.Н. Любименко. Более подробно этот феномен был описан в 1973 г. в монографии М.С. Яковлева и Г.Я. Жуковой «Покрытосеменные растения с зеленым и бесцветным зародышем». Авторы проанализировали семена 1094 видов из 182 семейств покрытосеменных растений и сделали вывод о том, что хлорофилл присутствует у 428 видов из 72 семейств.

Цель данной работы заключалась в выяснении существования зависимости между устойчивостью семян к обезвоживанию и присутствием в них остаточных хлорофиллов.

Материалы и методы

Семена капусты белокочанной (*Brasicca oleraceae* L.) c. Bartolo сортировали по интенсивности флуоресценции хлорофиллов (ИФХ) в семенных оболочках по методу [Jalink et al., 1998] на установке SeedScan I Laser Sorter (Sataka, USA), затем размещали на вращающемся диске с углублениями, облучали светом длиной волны 650 нм и регистрировали флуоресценцию хлорофиллов при 730 нм.

Для оценки устойчивости к обезвоживанию семена капусты инкубировали в воде в течение 24 и 48 ч, затем подсушивали до исходной влажности и после этого проращивали. Через 48 ч начиналось проклевывание семян. Для дальнейшей работы отбирали только непроклюнувшиеся семена, поскольку подсушивание семян с уже проклюнувшимся зародышевым корешком приводило к их гибели. Высушивание проводили в течение 3 суток при 22°С и 32%-ой влажности воздуха.

Для определения *влагосодержания* семян навески по 0,5 г помещали в термостат при 105° на 17 ч. Влагосодержание выражали в граммах воды на грамм сухого вещества (г/г). Для оценки *скорости прорастания и всхожести* семена проращивали на фильтровальной бумаге при 22°С. Количество проросших семян учитывали каждые сутки. Проросшими считали семена, у которых зародышевый корешок проклюнулся сквозь семенную оболочку. *Всхожесть семян* оценивали по количеству нормально развитых проростков, ненормально развитых проростков и непроросших семян через 10 дней прорастания.

Целостность мембран в семенах определяли по содержанию синапина, вышедшего из набухающих семян в инкубационный раствор, по методу [Lee et al., 1997]. Синапин (3,5-диметокси-4-гидроксициннамоилхолин) – холиновый эфир синаповой кислоты. Семена (25 шт.) помещали в 50 мл дистиллированной воды на 18 ч при 25°С. Синапин определяли по оптической плотности раствора при 322 нм на спектрофотометре СФ-46.

Определение содержания хлорофиллов a и b, каротинов и ксантофиллов. Зародыши семян растирали в смеси петролейного эфира и тетрагидрофурана (4:1, по объему). Спектры поглощения полученных экстрактов регистрировали на спектрофотометре Unikon 931 (*Kontron Instr*, Германия). Для расчета содержания пигментов использовали формулы, приведенные в работе О.В. Булда и др. [2008].

Клеточный цикл в зародышевых корешках семян капусты изучали на проточном цитометре *Coulter Epics XL-MCL* (Beckman-Coulter, USA). Растительную ткань измельчали в 1 мл охлажденного буфера, содержащего 137 мМ NaCl; 268 мкМ KCl; 0,5 мкМ KH_2PO_4; 2,0 мкМ Na_2HPO_4 с pH 7,3. После измельчения суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 30 мкм. К раствору, содержащему ядра, добавляли РНКазу (10 мкл/мл) и флуоресцентный краситель (10 мкл/мл) и инку-

бировали 30 мин при 22°С. В качестве флуоресцентного красителя использовали иодистый пропидиум и 7-амино-актиномицин D. Инициацию клеточного цикла оценивали по отношению количества ядер в G_2 фазе клеточного цикла с 4С, 8С и т.д. набором ДНК к количеству ядер в G_1 фазе с 2С набором ДНК (G_2/G_1-отношение).

Результаты и обсуждение

Сортировка семян капусты на установке SeedScan I Laser Sorter позволила получить фракции с низкой и высокой интенсивностью флуоресценции хлорофиллов в семенных оболочках (далее – низкая и высокая ИФХ). Для сортировки использовали физиологически зрелые семена, собранные на стадии технической спелости. Семена полученных фракций не различались по массе (3,5 г) и содержанию воды (0,06 г/г), однако существенно отличались по количеству остаточных хлорофиллов. Зародыши семян с низкой ИФХ содержали в среднем 3 мкг/г Хл *a* и 1 мкг/г Хл *b*, а с высокой ИФХ – 32 мкг/г Хл *a* и 29 мкг/г Хл *b*, то есть наблюдалась разнокачественность семян по скорости деградации хлорофиллов при созревании. Представляло интерес, существуют ли различия по устойчивости к обезвоживанию между фракциями семян капусты с разным содержанием остаточных хлорофиллов.

На первом этапе работы была проанализирована динамика поступления воды при прорастании семян. Влагосодержание воздушно-сухих семян обеих фракций не различалось и составляло 0,06 г/г, однако при прорастании семена с высокой ИФХ набухали быстрее (табл. 1). После 24 ч прорастания влагосодержание семян с низкой ИФХ повышалось до 0,58 г/г, а с высокой ИФХ – до 0,69. Через 48 ч набухания влагосодержание непроросших семян с низкой ИФХ было равно 0,67 г/г, а с высокой ИФХ – 0,77. После прорастания эти различия нивелировались.

Мы полагаем, что различия по скорости набухания семян с разным содержанием остаточных хлорофиллов могут быть связаны с целостностью их мембран и семенных оболочек. Известно, что при набухании клеточные мембраны из гелевой фазы переходят в жидкокристаллическую, в результате чего меняется организация мембранных липидов [Хукстра, Головина, 1999]. Этот переход сопровождается кратковременным увеличением проницаемости мембран для воды и растворенных веществ. Для успешного прорастания семена должны восстановить структурную целостность мембран как можно быстрее. В противном случае слишком быстрое поступление воды будет провоцировать так называемый стресс набуханием.

В данной работе анализ целостности мембран в набухающих семенах капусты осуществляли по выходу в инкубационный раствор холинового эфира синаповой кислоты (синапина) (табл. 2). Семена набухали 18 ч, при этом влагосодержание семян повышалось с 0,06 до 0,7 г/г сух. вещества.

Таблица 1. Изменение влагосодержания (г воды / г сух. в-ва) при прорастании семян капусты, сортированных по ИФХ

Варианты	Низкая ИФХ	Высокая ИФХ
Воздушно-сухие семена	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01
24 ч прорастания	0,58 ± 0,02	0,69 ± 0,03
48 ч прорастания (нпр)	0,67 ± 0,06	0,77 ± 0,05
48 ч прорастания (пр)	0,82 ± 0,04	0,87 ± 0,05

Примечание. нпр – непроклюнувшиеся семена; пр – проклюнувшиеся семена; «±» – стандартная ошибка средней арифметической.

Таблица 2. Выход синапина при прорастании семян капусты, сортированных по ИФХ

Фракции	Оптическая плотность инкубационного раствора при 330 нм	
	Жизнеспособные семена	Нежизнеспособные семена
Низкая ИФХ	0,025±0,004	0,454±0,028
Высокая ИФХ	0,091±0,023	0,714±0,063

Примечание. Нежизнеспособные семена получали автоклавированием (121°С, 30 мин); «±» – стандартная ошибка средней арифметической.

Эндогенное содержание синапина у фракций семян с низкой и высокой ИФХ не различалось и составляло 0,03 ± 0,01 мкг/г абс.сух. в-ва. При этом жизнеспособные семена с высоким ИФХ выделяли в инкубационный раствор в 3,5 раза больше синапина, чем жизнеспособные семена с низким ИФХ. Это свидетельствует о том, что у семян с высоким ИФХ целостность клеточных мембран была ниже, чем у семян с низким ИФХ. Различия по выходу синапина сохранялись и при набухании нежизнеспособных семян, которые получали путем автоклавирования. Поскольку клеточные мембраны после автоклавирования переставали функционировать, то факт присутствия разных количеств синапина в инкубационном растворе может быть связан только с различиями в целостности семенных оболочек.

Как известно, потеря устойчивости к обезвоживанию происходит у семян в процессе прорастания [Dasgupta et al., 1988; Faria et al., 2004]. В наших экспериментах семена капусты инкубировали в воде в течение 24 и 48 ч и далее высушивали до исходного влагосодержа-

ния (см. табл. 1). Хотелось бы обратить внимание на то, что видимое прорастание семян, сопровождающееся проклевыванием зародышевого корешка, начиналось через 48 ч, поэтому семена делили на две партии – непроросшие и проросшие (с визуально определяемым зародышевым корешком). Высушиванию подвергали только непроросшие семена. Устойчивость семян к обезвоживанию оценивали по их способности прорастать и формировать нормально развитые проростки после высушивания (рис. 1, 2).

Семена с низкой ИФХ имели 100%-ю всхожесть и формировали нормально развитые проростки. На 2-й день в этой фракции прорастало 14 % семян, на 3-й – 79, а на 4-й – 98. В случае, когда прорастание семян было прервано высушиванием как через 24 ч, так и через 48 ч, всхожесть и количество нормально развитых проростков не снижались, а скорость прорастания значительно увеличивалась (до 32 и 56 % семян на 2-й день прорастания соответственно). Все это говорит о том, что семена с низкой ИФХ сохраняли устойчивость к обезвоживанию на всех этапах прорастания. Высушивание не только не снижало жизнеспособность семян, но и повышало скорость их прорастания при последующей гидратации. Это связано с тем, что метаболические процессы, инициирующие прорастание, при высушивании задерживаются и при повторном поступлении воды идут дальше. На данном эффекте основаны предпосевные обработки семян методом замачивания–высушивания и осмопрайминга.

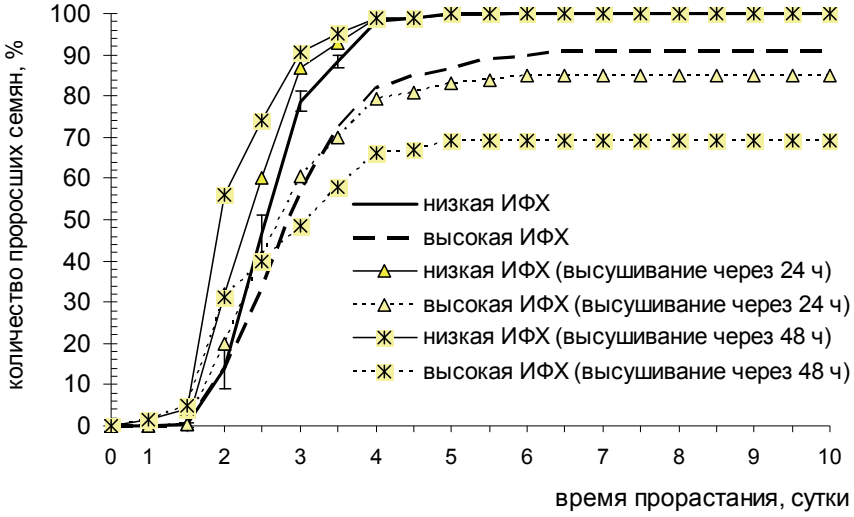


Рис. 1. Динамика прорастания семян капусты, сортированных по ИФХ, в связи с их высушиванием через 24 и 48 ч прорастания

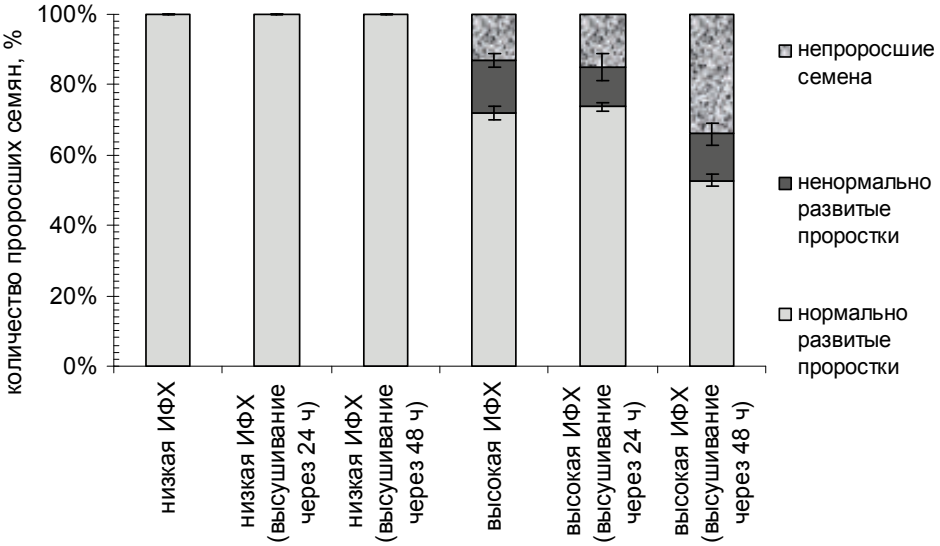


Рис. 2. Развитие проростков капусты, сортированных по ИФХ, в связи с высушиванием семян через 24 и 48 ч прорастания

Семена с высокой ИФХ имели всхожесть 87 %, при этом 15 % проростков развивались с морфологическими нарушениями (см. рис. 2). В случае, когда прорастание семян было прервано высушиванием через 24 ч, всхожесть и количество нормально развитых проростков не снижались, а скорость прорастания увеличивалась (так же как и у семян с низкой ИФХ). Вместе с тем высушивание семян через 48 ч набухания приводило к существенной потере их жизнеспособности: всхожесть семян снижалась до 69 %.

Таким образом, потеря устойчивости к обезвоживанию у семян капусты происходит непосредственно перед или в момент проклевывания зародышевого корешка сквозь семенную оболочку. В этот период прорастания проявлялись различия между семенами с разным содержанием остаточных хлорофиллов, поэтому его можно рассматривать как критический (переходный).

Представляло интерес изучить, как потеря устойчивости к обезвоживанию соотносится с особенностями инициации клеточного цикла в клетках зародышевых корешков семян. Известно, что большинство клеток меристематических тканей в зародышах воздушно-сухих семян находятся на пресинтетической фазе клеточного цикла (G_1) или переходят в фазу покоя (G_0) [De Castro, 1998]. В диплоидных соматических клетках, к которым относятся клетки семян капусты, на фазе G_0/G_1 ядра содержат 2C набор ДНК (C – количество ДНК, содержащееся в гаплоидном наборе хромосом). Такие клетки характеризуются отсутствием сигналов к делению, и индукция клеточного цикла происходит только под действием внешнего стимула, которым при прорастании семян является вода. При набухании клетки зародышей переходят от фазы G_0/G_1 к фазе S/G_2 с удвоенным(4C) набором ДНК в ядрах. Протяженность этого перехода определяется количеством и скоростью репарации имеющихся в ДНК повреждений [Osborne, 1994].

В наших исследованиях, проведенных с использованием проточной цитометрии, было установлено, что около 80 % ядер в клетках зародышевых корешков воздушно-сухих семян капусты содержали 2C набор ДНК и около 20 % ядер «уходили» в покой с 4C набором ДНК. При этом статистически достоверной разницы между воздушно-сухими семенами с разным содержанием остаточного хлорофилла не обнаружено. Для оценки динамики инициации клеточного цикла мы изучали отношение количества ядер в G_2 фазе клеточного цикла к количеству ядер в G_1 фазе (G_2/G_1-отношение) (рис. 3).

Через 24 ч прорастания G_2/G_1-отношение в клетках зародышевых корешков семян с высокой ИФХ не изменялось и составляло 0,11, а у семян с низкой ИФХ повышалось с 0,13 до 0,23. Через 48 ч прорастания непосредственно перед проклевыванием зародышевого корешка в семенах с низкой ИФХ G_2/G_1-отношение повышалось до 0,7, а в семенах с высокой ИФХ – до 0,2. Поскольку инициации клеточного цикла в этот момент еще не наступало, незначительное повышение данного показателя можно объяснить репарацией ДНК. Инициация клеточного цикла в зародышевых корешках семян капусты совпадает с удлинением клеток и видимым проклевыванием зародышевого корешка сквозь семенную оболочку. Она характеризовалась быстрым переходом ядер из G_1 в G_2 фазу клеточного цикла, в результате G_2/G_1-

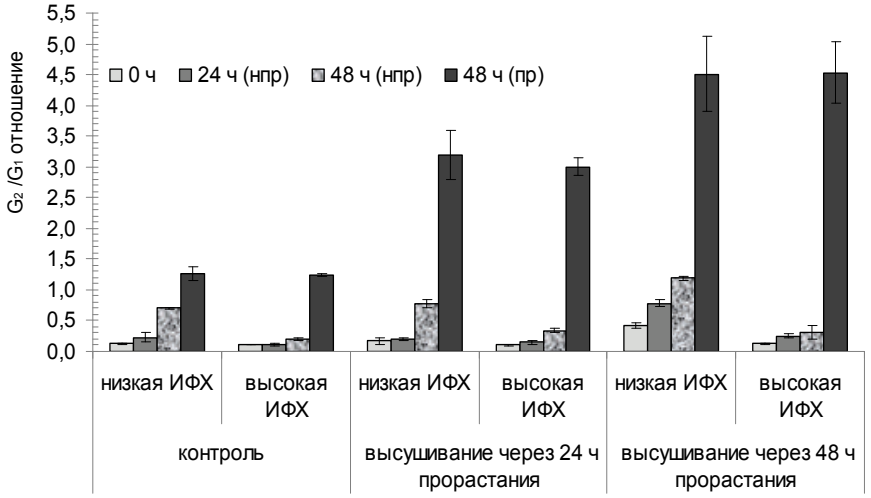


Рис. 3. Динамика отношения количества ядер в G_2 фазе клеточного цикла к количеству ядер в G_1 фазе (G_2/G_1-отношение) в прорастающих зародышевых корешках семян капусты

Высушивание – семена инкубировали в воде 24 и 48 ч и затем высушивали; нпр – непроклюнувшиеся семена; пр – проклюнувшиеся семена

отношение в семенах обеих фракций увеличивалось до 1,2.

Высушивание семян через 24 ч прорастания привело к возвращению G_2/G_1-отношения до 0,17 у семян с низкой ИФХ и до 0,10 у семян с высокой ИФХ. Далее при повторной гидратации G_2/G_1-отношение опять постепенно повышалось до момента проклевывания зародышевого корешка, причем у семян с низкой ИФХ оно было выше, чем у семян с высокой ИФХ. Интересно, что в проклюнувшихся зародышевых корешках G_2/G_1-отношение было выше, чем при прорастании контрольных семян (3,1 по сравнению с 1,2).

Такая же тенденция наблюдалась и у семян, которые высушивали через 48 ч прорастания. Высушенные семена с низкой ИФХ имели G_2/G_1-отношение, равное 0,42, а с высокой ИФХ – 0,13. При прорастании семян с низкой ИФХ G_2/G_1-отношение в клетках повышалось быстрее, и к моменту проклевывания оно составляло 1,19 по сравнению с 0,31 у семян с высокой ИФХ. В проклюнувшихся зародышевых корешках G_2/G_1 отношение увеличивалось до 4,5.

Анализ динамики инициации клеточного цикла в зародышевых корешках прорастающих семян капусты подтверждает эффекты, полученные при оценке скорости прорастания и всхожести семян. Семена с низкой ИФХ при высушивании как через 24 ч, так и через 48 ч прорастания имели более высокое отношение G_2/G_1 по сравнению с семенами с высокой ИФХ. Это говорит о том, что повреждения ДНК при высушивании семян с низкой ИФХ не происходило. В то же время наблюдалось значительное снижение G_2/G_1-отношения в семенах с высокой ИФХ, подвергнутых высушиванию через 48 ч прорастания, что свидетельствует о повреждении ДНК и потере устойчивости к обезвоживанию.

Таким образом, семена капусты с более высоким содержанием остаточных хлорофиллов быстрее теряли устойчивость к обезвоживанию при прорастании. Эти семена характеризовались также более высокой скоростью поступления воды при прорастании и более низкой целостностью мембран и семенных оболочек.

Причина более низкой устойчивости к обезвоживанию у семян с высоким содержанием остаточных хлорофиллов может быть связана с тем, что хлорофиллы оказывают повреждающее действие на семена путем усиления окислительного стресса. Поскольку хлорофиллы в семенах находятся в пропластидах с разрушенной гранальной системой [Johnson-Flanagan, Thiagarajan, 1990; Borisjuk et al., 2005], система акцептирования электронов при возбуждении электронов хлорофиллов не работает подобно тому, как это происходит в хлоропластах. В результате энергия возбуждения будет рассеиваться или в виде флуоресценции, или путем образования синглетного кислорода, вызывая окисление органических соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 11-04-00701а). Автор благодарит доктора С. Грута и Я. Бергервоета (Международный центр по исследованию растений г. Вагенинген, Нидерланды) за предоставление семян и проведение проточно-цитометрических исследований.

Литература

Булда (Борискевич) О. В., Рассадина В. В., Алексейчук (Смоликова) Г. Н., Ламан Н. А. Спектрофотометрический метод определения содержания каротинов, ксантофиллов и хлорофиллов в экстрактах семян растений // Физиология растений. 2008. Т. 55. С. 604–611.

Монтеверде Н. А., Любименко В. Н. О зеленом пигменте внутренней оболочки семян *Cucurbitaceae* и его отношении к хлорофиллу // Изв. Санкт-Петербургского бот. сада. 1909. Т. 9. С. 2–3.

Хукстра Ф. А., Головина Е. А. Поведение мембран при дегидратации и устойчивость ангидробиотических организмов к обезвоживанию // Физиология растений. 1999. Т. 46, № 3. С. 347–361.

Яковлев М. С., Жукова Г. Я. Покрытосеменные растения с зеленым и бесцветным зародышем (хлоро- и лейкоэмбриофиты). Л.: Наука, 1973. 116 с.

Borisjuk L., Nguyen T. H., Neuberger T. et al. Gradients of lipid storage, photosynthesis and plastid differentiation in developing soybean seeds // New Phyt. 2005. Vol. 167. P. 761–776.

Dasgupta J., Bewley J. D., Yeung E. C. Desiccation-tolerant and desiccation-intolerant stages during development and germination of *Phaseolus vulgaris* seeds // J. Exp. Botany. 1988. Vol. 33. P. 1045–1057.

De Castro R. D. A functional analysis of cell cycle events in developing and germinating tomato seeds: PhD thesis. 1998. 110 p.

Faria R., van Lammeren J. M., Hilhorst H. W. M. Desiccation sensitivity and cell cycle aspects in seeds of *Inga vera subsp. Affinis* // Seed Science Research. 2004. Vol. 14. P. 165–179.

Golovina E. A., Hoekstra F. A., van Aelst A. C. The competence to acquire cellular dessication tolerance is dependent of seed morphological development // J. Exp. Bot. 2001. Vol. 52. P. 1015–1027.

Jalink H., van der Schoor R., Frandas A. et al. Chlorophyll fluorescence of *Brassica oleracea* seeds as a non-destructive marker for seed maturity and seed performance // Seed Science Research. 1998. Vol. 8. P. 437–443.

Johnson-Flanagan A. M., Thiagarajan M. R. Degreening in canola (*Brassica napus*, cv. Westar) embryos under optimum conditions // J. Plant Phys. 1990. Vol. 136. P. 180–186.

Lee P. C., Taylor A. G. Sinapine leakage for detection of seed quality in *Brassica* // in Basic and Applied Aspects

of Seed Biology / Ed. R.H. Ellis. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. P. 537–545.

Obroucheva N. V. Distinct regulatory patterns of seed dormancy release and germination commencement // Seed Science and Technology. 2010. Vol. 38. P. 265–279.

Ooms J. J., Leon-Kloosterziel K. M., Bartel D. et al. Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds *of Arabidopsis thaliana*. A comparative study using abscisic acid-insensitive *abi3* mutants // Plant Physiol. 1993. Vol. 102. P. 1185–1191.

Osborne D. J., Boubriak I. I. DNA and desiccation tolerance // Seed Science Research. 1994. Vol. 4. P. 175–185.

Roberts E. H. Predicting the storage life of seeds // Seed Science and Technology. 1973. N 1. P. 499–514.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ:

Смоликова Галина Николаевна
ведущий научный сотрудник, к.б.н.
Санкт-Петербургский государственный университет
биолого-почвенный факультет
кафедра физиологии и биохимии растений
Университетская наб., 7/9
199034, Санкт-Петербург, Россия
эл. почта: galina.smolikova@gmail.com
тел.: (812)3289695

Smolikova, Galina
Plant Physiology and Biochemistry Department
Faculty of Biology and Soil Sciences
Saint-Petersburg State University
Universitetskaya nab., 7/9,
St. Petersburg, 199034, Russia
e-mail: galina.smolikova@gmail.com
tel: (812)3289695

Труды Карельского научного центра РАН
№ 3. 2011. С. 112–116.

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И ИХ ИНГИБИТОРОВ У ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

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

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Изучено влияние кадмия (100 мкМ) на экспрессию генов, кодирующих АТФ-зависимые сериновые протеиназы хлоропластов и митохондрий (*ClpP*, *Lon1*), цистеиновую протеиназу (*Cys*), а также ингибитор цистеиновой протеиназы (*inCys*), в листьях проростков яровой пшеницы (с. Ленинградская 97). Установлено, что в начальный период (5 ч) его действия на растения происходит усиление экспрессии генов протеолитических ферментов *ClpP* и *Lon1*, однако в дальнейшем (3–4 сут) уровень транскриптов этих генов снижается до исходных значений. Содержание транскриптов гена ингибитора протеиназ *inCys* также резко повышалось в первые часы действия кадмия, а затем возвращалось к исходному уровню. В отличие от этого экспрессия гена *Cys* была снижена в течение всего периода действия кадмия. Полученные данные рассматриваются как свидетельство участия протеолитических ферментов и их ингибиторов в неспецифических защитно-приспособительных реакциях растений пшеницы.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., кадмий, экспрессия генов, протеолитические ферменты, ингибитор протеиназ.

V. V. Talanova, A. F. Titov, L. V. Topchieva, N. S. Repkina. EFFECT OF CADMIUM ON GENE EXPRESSION OF PROTEOLYTIC ENZYMES AND THEIR INHIBITORS IN WHEAT SPROUTS

We studied the effect of cadmium (100 μM) on the expression of the genes encoding ATP-dependent serine proteinases of chloroplasts and mitochondria (*ClpP*, *Lon1*), cysteine proteinase (*Cys*), as well as the inhibitor of cysteine proteinase (*inCys*) in the leaves of spring wheat sprouts (Leningradskaya 97 var.). In the early period (5 h) of the exposure the expression of the genes of proteolytic enzymes *ClpP* & *Lon1* is intensified, but the content of the transcripts of these genes decreases further on (3–4 days) to the original values. The content of the proteinase inhibitor gene *inCys* transcripts also dropped sharply in the early period (first hours) of exposure to cadmium, and then returned to the initial level. In contrast, *Cys* gene expressions remained lowered throughout the exposure. The resultant data are regarded as evidence for participation of proteolytic enzymes and their inhibitors in non-specific protective-adaptive responses of wheat plants.

Key words: *Triticum aestivum* L., cadmium, gene expression, proteolytic enzymes, proteinase inhibitor.

Введение

В последние десятилетия в связи с быстрым развитием промышленности во многих регионах мира наблюдается возрастающее загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами. К их числу относится кадмий, который, являясь высокотоксичным металлом, оказывает негативное влияние на многие стороны жизнедеятельности растений [Титов и др., 2007; Dong at al., 2007]. Его токсическое действие прежде всего связано со способностью взаимодействовать с SH-группами белков, что приводит к инактивации ферментов и изменению биологических свойств белков и сопровождается различными нарушениями метаболизма и физиологических процессов [Sanità di Toppi, Gabrielli, 1999].

Как известно, одной из ранних неспецифических реакций растений на действие стресс-факторов разной природы выступает усиление процессов биодеградации, среди которых особое место занимает протеолиз – ферментативный гидролиз белков и пептидов, катализируемый протеолитическими ферментами [Блехман, Шеламова, 1992]. В этом случае протеолитические ферменты и их ингибиторы, контролируя процессы деградации и модификации белков, препятствуют накоплению неактивных ферментов или поврежденных белков и пептидов в клетках растений [Мосолов и др., 2001]. Помимо этого, протеолитические ферменты участвуют в регуляции многих физиолого-биохимических процессов посредством реакций ограниченного протеолиза [Валуева, Мосолов, 2002], что также имеет определенное значение для защитно-приспособительных реакций растений.

Учитывая то, что воздействие тяжелых металлов на растения сопровождается значительными изменениями в активности протеолитических ферментов [Shah, Dubey, 1998; Pena et al., 2006; Домаш и др., 2008], логично ожидать, что в этом случае могут происходить определенные изменения и в экспрессии кодирующих их генов, однако сведения об этом в известной нам литературе практически отсутствуют. Исходя из этого, цель нашей работы – изучение экспрессии генов, кодирующих АТФ-зависимые сериновые протеиназы, цистеиновые протеиназы и их ингибиторы, в условиях действия кадмия на проростки пшеницы.

Материалы и методы

Эксперименты проводили с проростками яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с. Ленинградская 97, выращенными в рулонах фильтровальной бумаги на питательном растворе Кнопа с добавлением микроэлементов (pH 6,2–6,4) в камере искусственного климата при температуре воздуха 22°С, его относительной влажности 60–70%, освещенности 10 клк и фотопериоде 14 ч. По достижении недельного возраста проростки в течение 4 сут подвергали воздействию кадмия (100 мкМ) в форме сульфата, сохраняя прочие условия неизменными.

Тотальную РНК выделяли с помощью набора YellowSolve (Clonogene, Россия). Качество и количество выделенной РНК определяли методом капиллярного электрофореза на микрочипах (Experion, «Био-Рад»). Для удаления остатков ДНК препарат РНК обрабатывали ДНКазой («Силекс»). Уровень экспрессии генов оценивали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Флуорофором для детекции продуктов служил интеркалирующий краситель SYBR Green. Амплификацию проводили в приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 («Био-Рад»), используя наборы для амплификации, совмещенные с обратной транскрипцией. Для ПЦР в режиме реального времени применяли праймеры («Синтол»), представленные в таблице. В качестве референтного гена использовали актин. Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР фрагментов. На рисунке приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

Праймеры для проведения ПЦР в режиме реального времени

Ген	Нуклеотидная последовательность 5' ...3'	
	прямого праймера	обратного праймера
ClpP	GTGGCTAATCTCAGGAA	GCCCGATAATAAGCACATA
Lon1	TCGCCATACTGCCGTTCC	CCTGAATCACTGCCCAC
Cys	CACCCAGACAAGCAACCA	GCGTCCCTGTAGGTCTTCC
inCys	CGTCGTGCCGTTTACTC	AGTCCTTGATGCCTCCC
actin	GGGACCTCACGGATAATCTAATG	AACCTCCACTGAGAACAACATTAC

Результаты и обсуждение

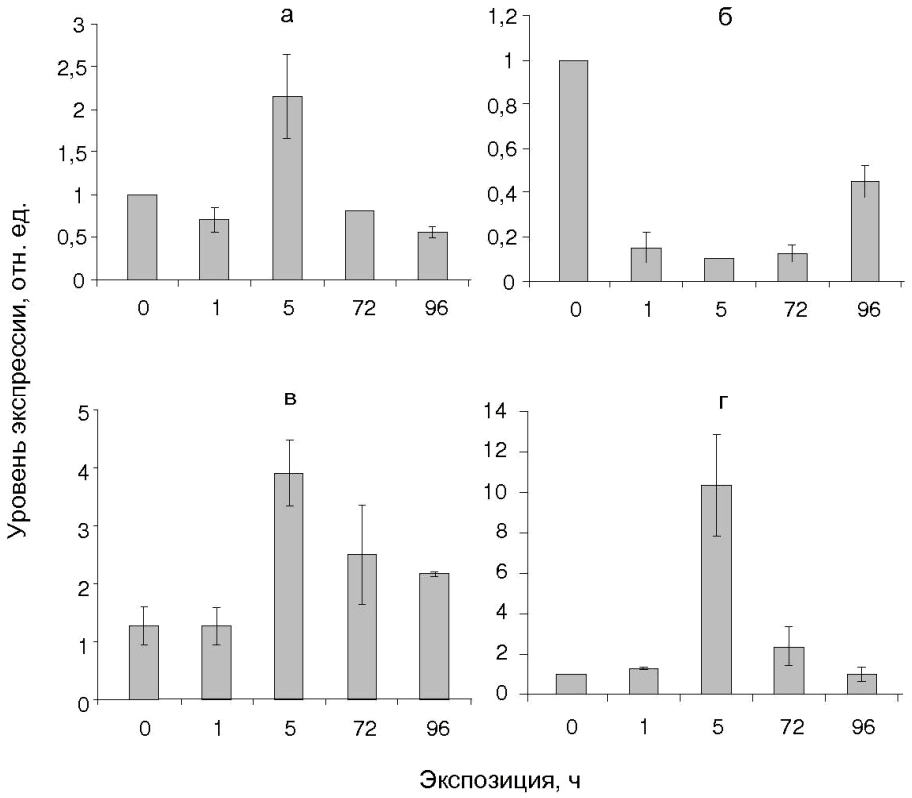
Установлено, что в начальный период (через 1 ч) действия кадмия экспрессия генов *ClpP* и *Lon1*, кодирующих АТФ-зависимые сериновые протеиназы хлоропластов и митохондрий, не изменяется (см. рис.), однако уже через 5 ч отмечено значительное увеличение уровня экспрессии генов *ClpP* и *Lon1* (в 2 и 4 раза соответственно). В последующие 3–4 сут действия кадмия экспрессия гена *ClpP* возвращалась к исходным значениям. Содержание транскриптов гена *Lon1* в клетках листа через 3 сут от начала действия кадмия несколько снижалось по сравнению с максимумом, но даже через 4 сут почти в 2 раза превышало исходный уровень.

В отличие от этого количество транскриптов гена *Cys*, кодирующего цистеиновую протеиназу, резко падало по сравнению с исходным уровнем уже через 1 ч от начала действия кадмия и оставалось пониженным в течение всего периода действия металла (см. рис.). В то же время экспрессия гена *inCys*, кодирующего ингибитор цистеиновой протеиназы, не изменялась в начальный период (1 ч) воздействия кадмия на проростки, резко (в 10 раз) повышалась через 5 ч, а затем снижалась и на 4 сут возвращалась к исходным значениям.

Таким образом, из результатов следует, что экспрессия генов *ClpP*, *Lon1* и *inCys* в условиях действия кадмия носит транзиторный характер: содержание их транскриптов значительно повышается через 5 ч от его начала, а затем снижается до исходных значений. В связи с этим можно предположить, что реакция растений пшеницы в начальный период (первые часы) действия этого металла была связана с активацией экспрессии указанных генов, которая, вероятнее всего, направлена на увеличение активности протеолитических ферментов, участвующих в деградации и модификации поврежденных белков, а также белков, уже не выполняющих свои функции (или выполняющих их не в полном объеме) в изменившихся условиях.

Сопоставление полученных данных с имеющимися в литературе указывает на сходство в изменении экспрессии генов протеиназ у растений при действии на них тяжелых металлов и других стресс-факторов. Так, под влиянием низкой закаливающей температуры отмечено усиление экспрессии генов *Lon1* и *ClpP* в листьях проростков озимой пшеницы [Фролова и др., 2009]. Также усиление экспрессии генов цистеиновых протеиназ обнаружено под влиянием низкой температуры у томата [Schaffer, Fisher, 1988] и пшеницы [Фролова, 2008], в условиях засухи – у арабидопсиса [Koizumi et al., 1993], при засолении – у гороха [Jones et al., 1995], при аноксии – у кукурузы [Subbaiah et al., 2000]. В листьях каштана повышенный уровень транскриптов фитоцистатинов (ингибиторов цистеиновых протеиназ) отмечен при действии низкой и высокой температуры, а также избыточного засоления [Pernas et al., 2000].

Наши результаты показывают, что реакция растений пшеницы на действие кадмия сопровождается быстрой экспрессией гена *Lon1,*



Влияние кадмия (100 мкМ) на экспрессию генов протеолитических ферментов *ClpP* (а), *Cys* (б), *Lon1* (в) и гена ингибитора цистеиновых протеиназ *inCys* (г) в листьях проростков яровой пшеницы (с. Ленинградская 97).

Уровень экспрессии генов у растений контрольного варианта (при 22°С) принят за единицу

кодирующего АТФ-зависимую Lon протеиназу, локализованную в мембранах митохондрий и тилакоидах хлоропластов и участвующую в деградации белков [Sonezaki et al., 1995]. Вместе с тем повышенная продукция этого фермента может вызывать деградацию нормальных белков и в итоге летальна для клетки [Goff, Goldberg, 1987]. Вероятно, отмеченное нами снижение экспрессии этого гена до исходного уровня через 3–4 сут действия кадмия свидетельствует о стабилизации белковых комплексов в органеллах и завершении процесса адаптации растения в целом. Характер изменений экспрессии гена *ClpP*, кодирующего Clp протеиназу хлоропластов, также подтверждает его возможное участие в регуляции протеолиза белков хлоропластов в первые часы воздействия кадмия.

Наши данные об усилении экспрессии гена ингибитора цистеиновых протеиназ указывают на их важную роль в регуляции активности протеолитических ферментов и предотвращении распада вновь синтезированных белков на начальных этапах адаптации пшеницы к действию кадмия. Наряду с этим исследование показало, что изменения в экспрессии генов протеиназ и их ингибиторов с увеличением периода действия кадмия на растения становятся менее выраженными. Отсюда следует, что наиболее важные изменения в экспрессии данной группы генов происходят именно в первые часы действия стрессора и, очевидно, они являются частью тех неспецифических изменений в метаболизме, которые должны обеспечить время, необходимое для разворачивания долговременных специализированных адаптивных программ [Кузнецов, 1992], направленных на повышение устойчивости растений, что в итоге предопределяет возможность их выживания в условиях стресса, обусловленного действием кадмия.

В целом обнаруженное нами быстрое повышение уровня экспрессии генов протеиназ и их ингибиторов под влиянием кадмия делает вероятным предположение об их непосредственном участии в защитно-приспособительных реакциях растений яровой пшеницы, происходящих на первом этапе процесса их адаптации к ионам кадмия и носящих неспецифический характер.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 10-04-00650а).

Литература

Блехман Г. И., Шеламова Н. А. Синтез и распад макромолекул в условиях стресса // Успехи современной биологии. 1992. Т. 112, № 2. С. 281–297.

Валуева Т. А., Мосолов В. В. Роль ингибиторов протеолитических ферментов в защите растений // Успехи биологической химии. 2002. Т. 42. С. 193–216.

Домаш В. И., Шарпио Т. П., Забрейко С. А., Сосновская Т. Ф. Протеолитические ферменты и ингибиторы трипсина высших растений в условиях стресса // Биоорг. химия. 2008. Т. 34, № 3. С. 353–357.

Кузнецов Вл. В. Индуцибельные системы и их роль при адаптации растений к стрессорным факторам: автореф. дис. ... докт. биол. наук. Кишинев, 1992. 74 с.

Мосолов В. В., Григорьева Л. И., Валуева Т. А. Ингибиторы протеиназ из растений как полифункциональные белки (обзор) // Прикладная биохимия и микробиол. 2001. Т. 37, № 6. С. 643–650.

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

Фролова С. А. Влияние низкой температуры на активность протеиназно-ингибиторной системы растений: автореф. дис. ...канд. биол. наук. Петрозаводск, 2008. 28 с.

Фролова С. А., Титов А. Ф., Топчиева Л. В. и др. Экспрессия генов протеолитических ферментов и их ингибиторов при холодовом закаливании пшеницы // Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды: мат-лы Всерос. науч. конф. 24–28 августа 2009 г. Иркутск, 2009. С. 496–499.

Dong J., Mao W. H., Zhang G. P. et al. Root excretion and plant tolerance to cadmium toxicity – a review // Plant Soil Environ. 2007. Vol. 53, N 5. P. 193–200.

Goff S. A., Golgberg A. L. An increased content of protease La, the *lon* gene product, increases protein degradation and block growth in *Escherihia coli* // J. Biol. Chem. 1987. Vol. 262. P. 4508–4515.

Jones J. T., Mullet J. E. A salt- and dehydration-inducible pea gene, Cyp15a, encode a cell-wall protein with sequence similarity to cysteine proteases // Plant Mol. Biol. 1995. Vol. 28. P. 1055–1063.

Koizumi M., Yamaguchi-Shonozaki K., Tsuji H., Shinozaki K. Structure and expression of two genes that encode distinct drough-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana* // Gene. 1993. Vol. 129. P. 175–182.

Pena L. B., Tomaro M. L., Gallego S. M. Effect of different metals on protease activity in sunflower cotyledons // Electronic J. Biotech. 2006. Vol. 9, N 3. P. 258–262.

Pernas M., Sanches-Monge R., Salcedo G. Biotic and abiotic stress induce cystatine expression in chestnut // FEBS Letter. 2000. Vol. 467, N 2–3. P. 206–210.

Sanità di Toppi L., Gabbrielli R. Response to cadmium in higher plants // Environ. Exp. Bot. 1999. Vol. 41. P. 105–130.

Schaffer M. A., Fisher R. L. Analysis of mRNA that accumulate in response to low temperature identifies a thiol protease in tomato // Plant Physiol. 1988. Vol. 87. P. 431–436.

Shah K., Dubey R. S. Cadmium elevates level of protein, amino acid and alters activity of proteolytic enzymes in germinating rice seeds // Acta Physiol. Plant. 1998. Vol. 20, N 2. P. 189–196.

Sonezaki S., Okita K., Oba T. et al. Protein substrates and heat shock reduce the DNA-binding ability of *Esherichia coli* Lon protease // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1995. Vol. 44. P. 484–488.

Subbaiah C. C., Kollipara K. P., Sachs M. M. A Ca^{2+}-dependent cysteine protease is associated with anoxia-induced root tip death in maize // J. Exp. Bot. 2000. Vol. 51, N 345. P. 721–730.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Таланова Вера Викторовна
ведущий научный сотрудник, д.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: talanova@krc.karelia.ru
тел. (8142) 762712

Титов Александр Федорович
Председатель КарНЦ РАН, д.б.н., проф., чл.-корр. РАН
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: titov@krc.karelia.ru

Топчиева Людмила Владимировна
старший научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: topchieva@krc.karelia.ru
тел. (8142) 571879

Репкина Наталья Сергеевна
аспирант
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: ntr9@ya.ru
тел. (8142) 762712

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

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

Topchieva, Lyudmila
Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: topchieva@krc.karelia.ru
tel. (8142) 571879

Repkina, Natalia
Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: ntr9@ya.ru
tel. (8142) 762712

Труды Карельского научного центра РАН
№ 3. 2011. С. 117–120.

УДК 581.1.

ВЛИЯНИЕ ФИТОГОРМОНОВ НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И ИНГИБИТОРОВ ТРИПСИНА ПРИ ХОЛОДОВОЙ АДАПТАЦИИ ПШЕНИЦЫ

А. Ф. Титов, С. А. Фролова, В. В. Таланова, Ю. В. Венжик

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Изучено влияние экзогенных фитогормонов – абсцизовой кислоты (АБК) и цитокинина (в форме его синтетического аналога 6-бензиламинопурина) на динамику активности протеолитических ферментов и ингибиторов трипсина в листьях проростков пшеницы, подвергнутых действию низкой закаливающей температуры (5°С). Показано, что повышение холодоустойчивости растений, индуцированное воздействием АБК и цитокинина, сопряжено с существенными изменениями в активности амидаз и цистеиновых протеиназ, а также ингибиторов трипсина.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., протеолитические ферменты, ингибитор трипсина, абсцизовая кислота, цитокинин.

A. F. Titov, S. A. Frolova, V. V. Talanova, Yu. V. Venzhik. EFFECT OF PLANT HORMONES ON THE ACTIVITY OF PROTEOLYTIC ENZYMES AND TRYPSIN INHIBITORS DURING COLD ADAPTATION OF WHEAT

We studied the effect of exogenous hormones – abscisic acid (ABA) and cytokinin (in the form of its synthetic analog 6-benzylaminopurine), on the activity of proteolytic enzymes and tripsin inhibitor in the leaves of wheat seedlings exposed to low hardening temperature (5°C). The increase in plant cold resistance induced by ABA and cytokinin exposure was closely connected with considerable changes in the activity of amidases and cysteine proteinases, as well as the inhibitor of tripsin.

Key words: *Triticum aestivum* L., proteolytic enzymes, tripsin inhibitor, abscisic acid, cytokinin.

Введение

Активность протеолитических ферментов и их ингибиторов, контролирующих процессы деградации и модификации различных белков и ферментов, может существенно изменяться в период действия на растения неблагоприятных биотических и абиотических факторов среды [Валуева, Мосолов, 2002; Домаш и др., 2008], включая низкие температуры [Фролова, Титов, 2008]. Вместе с тем хорошо известно, что под влиянием низких температур в тканях растений происходят значительные изменения в содержании таких фитогормонов, как абсцизовая кислота (АБК) [Таланова и др., 1991] и цитокинины [Веселов и др., 2002], играющих важную роль в механизмах холодовой адаптации [Титов, Таланова, 2009]. Что касается возможного участия этих гормонов в регуляции активности протеиназ при адаптации растений к низким температурам, то такие сведения отсутствуют. С учетом этого нами изучено влияние экзогенных АБК и цитокинина на динамику активности протеолитических ферментов и их ингибиторов в условиях холодового закаливания проростков пшеницы.

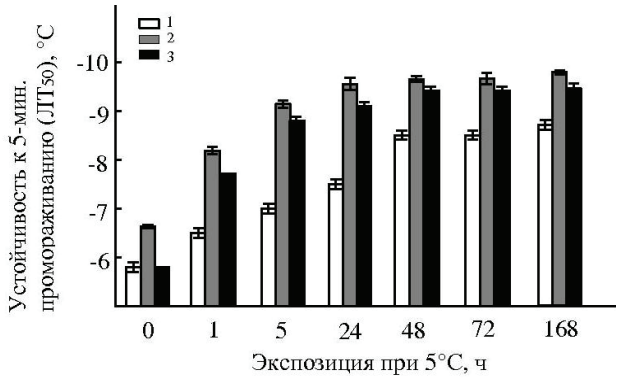


Рис. 1. Влияние АБК и БАП на холодоустойчивость листьев проростков пшеницы при действии температуры 5°С

Здесь и на рис. 2 : 1–5°С, 2–5°С + АБК, 3–5°С + БАП

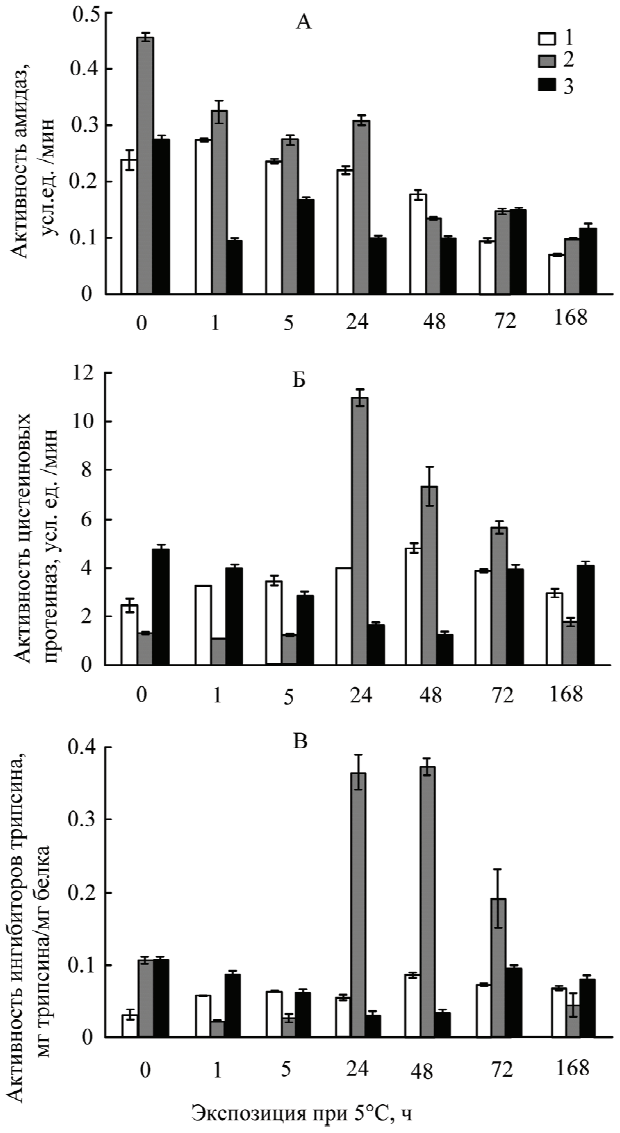


Рис. 2. Влияние АБК и БАП на активность амидаз (А), цистеиновых протеиназ (Б) и ингибиторов трипсина (В) в листьях проростков пшеницы при действии температуры 5°С

Материалы и методы

Опыты проводили на проростках озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с. Московская 39, выращенных в течение 7 сут на питательном растворе Кнопа при температуре воздуха 22°С, его относительной влажности 60–70%, освещенности около 10 клк и фотопериоде 14 ч. В дальнейшем проростки подвергали действию низкой закаливающей температуры (5°С), сохраняя неизменными прочие условия. За сутки до холодового воздействия часть проростков помещали на растворы АБК (0,1 мМ) или синтетического аналога цитокинина 6-бензиламинопурина (БАП) (0, 01 мМ).

О холодоустойчивости проростков судили по реакции клеток листа на 5-минутное тестирующее промораживание в микрохолодильнике, при этом в качестве показателя устойчивости служила температура ($ЛТ_{50}$), вызывающая гибель 50% клеток [Балагурова и др., 1982]. Активность сериновых трипсиноподобных протеиназ (амидаз) в листьях проростков определяли с использованием синтетического субстрата – N_{α}-бензоил-DL-аргинин-4-нитроанилида гидрохлорида (БАПА) [Erlanger et al., 1961], активность цистеиновых протеиназ – по модифицированному методу Кунитца [Sgarbieri et al., 1964], ингибиторную активность – по подавлению активности трипсина [Morichara et al., 1967].

Средние арифметические значения из трех независимых опытов и их стандартные ошибки приведены на рис. 1, 2. Обсуждаются величины, достоверные при $P \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Установлено, что предобработка АБК проростков пшеницы приводит к увеличению их устойчивости еще до начала холодового воздействия (см. рис. 1). При действии температуры 5°С у проростков, обработанных АБК, уже в начальный период (1–5 ч) наблюдался значительный прирост устойчивости, в результате чего она превышала уровень, характерный для проростков, закаливаемых в течение нескольких суток без АБК. В присутствии БАП скорость и величина прироста устойчивости проростков также заметно превышали таковые в варианте «закалка без гормонов».

У проростков, не подвергавшихся обработке экзогенными гормонами, в начальный период действия температуры 5°С (1–24 ч) усиливалась активность амидаз, цистеиновых протеиназ и ингибиторов трипсина (см. рис. 2). В дальнейшем активность амидаз и ингибиторов трипсина снижалась до уровня, характерного для незакаленных растений, в то время как повышенный уровень активности цистеи-

новых протеиназ сохранялся на протяжении всего процесса закаливания.

Обработка АБК проростков приводила к значительному повышению активности амидаз и ингибиторов трипсина и снижению активности цистеиновых протеиназ в листьях еще до начала действия температуры 5°С (см. рис. 2). При последующем воздействии низкой температуры в присутствии АБК на фоне роста холодоустойчивости активность амидаз в течение 7 сут постепенно снижалась, но при этом она заметно превышала таковую в варианте «закалка без гормонов». В первые часы действия низкой температуры активность цистеиновых протеиназ и ингибиторов трипсина под влиянием АБК уменьшалась, но через 1–2 сут резко увеличивалась, а затем постепенно снижалась до исходного уровня (см. рис. 2).

Обработка БАП проростков повышала активность амидаз, цистеиновых протеиназ и ингибиторов трипсина в листьях (см. рис. 2), но уже в первые двое суток воздействия температуры 5°С в присутствии БАП активность амидаз, цистеиновых протеиназ и ингибиторов снижалась в 1,5–2 раза по сравнению с вариантом «закалка без гормонов» и лишь через 3–7 сут возвращалась к уровню, характерному для растений, не подвергавшихся действию гормона (см. рис. 2).

Изменения активности протеиназ и ингибиторов трипсина под воздействием холода на растения, когда, с одной стороны, в их клетках значительно усиливается накопление неактивных и поврежденных белков и пептидов, а с другой – возрастает необходимость в низкомолекулярных соединениях как исходного материала для синтеза стрессовых белков [Тарчевский, 2001], вероятно, направлены на формирование устойчивости растений и/или на поддержание ее повышенного уровня. В связи с этим вполне логично предположить, что АБК и цитокинин, имея несколько «каналов» воздействия на клетки [Gusta et al., 2005; Романов, 2009], могут влиять на устойчивость растений к низкой температуре, в том числе и через изменение активности протеолитических ферментов и их ингибиторов. Важно при этом отметить, что воздействие АБК и цитокинина (являющихся антагонистами в отношении ряда физиологических процессов и действующих однонаправленно на устойчивость растений) на активность протеиназ и ингибиторов трипсина в листьях пшеницы в период холодовой адаптации оказалось разнонаправленным. В частности, обработка проростков АБК приводила к значительному повышению активности протеолитических ферментов (особенно цистеиновых протеиназ) и ингибиторов трипсина, тогда как в присутствии БАП активность протеиназ и ингибиторов трипсина, наоборот, заметно снижалась. Попутно укажем, что сходное действие этих гормонов обнаружено в отделенных стареющих листьях ячменя: экзогенная АБК стимулировала повышение активности хлоропластных эндопептидаз, а кинетин, наоборот, ее ингибировал [Quiles et al., 1995].

Вероятно, увеличение активности амидаз и цистеиновых протеиназ под влиянием АБК как в начальный, так и в более поздний период действия холода усиливает удаление из клеток поврежденных макромолекул и их реутилизацию, что благоприятно для накопления свободных аминокислот, индуцированного синтеза стрессовых белков и последующего повышения холодоустойчивости. В то же время происходящее через 1–3 сут от начала действия холода повышение под влиянием АБК активности ингибиторов трипсина, выступающих в качестве регуляторов активности протеиназ, предотвращает преждевременный распад вновь синтезированных (стрессовых) белков и поддерживает тем самым процесс формирования повышенной устойчивости.

Положительное влияние экзогенного цитокинина на холодоустойчивость растений пшеницы, на наш взгляд, связано с тем, что, вызывая снижение активности амидаз и цистеиновых протеиназ, этот гормон предотвращает избыточную деградацию белков под воздействием холода.

Таким образом, повышение холодоустойчивости растений пшеницы при пониженной температуре, обусловленное влиянием экзогенных АБК или цитокинина, сопряжено с существенными изменениями в активности протеолитических ферментов и их ингибиторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 10-04-00650а).

Литература

Балагурова Н. И., Дроздов С. Н., Хилков Н. И. Метод определения устойчивости растительных тканей к промораживанию. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР, 1982. 6 с.

Валуева Т. А., Мосолов В. В. Роль ингибиторов протеолитических ферментов в защите растений // Успехи биологической химии. 2002. Т. 42. С. 193–216.

Веселов Д. С., Сабиржанова И. Б., Ахиярова Г. Р. и др. Роль гормонов в быстром ответе растений пшеницы на осмотический и холодовой шок // Физиология растений. 2002. Т. 49, № 6. С. 572–576.

Домаш В. И., Шарпио Т. П., Забрейко С. А., Сосновская Т. Ф. Протеолитические ферменты и ингибиторы трипсина высших растений в условиях стресса // Биоорг. химия. 2008. Т. 34, № 3. С. 353–357.

Романов Г. А. Как цитокинины действуют на клетку // Физиология растений. 2009. Т. 56, № 2. С. 295–315.

Таланова В. В., Титов А. Ф., Боева Н. П. Изменение уровня эндогенной абсцизовой кислоты в листьях рас-

тений под влиянием холодовой и тепловой закалки // Физиология растений. 1991. Т. 38, № 5. С. 991–997.

Тарчевский И. А. Метаболизм растений при стрессе. Казань: ФЭН. 2001. 448 с.

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

Фролова С. А., Титов А. Ф. Активность протеолитических ферментов и ингибиторов трипсина в листьях пшеницы в начальный период действия и в последействии низкой закаливающей температуры // Известия РАН. Сер. биол. 2008, № 5. С. 549–552.

Erlanger D. F., Kokowski N., Cohen W. Proteinases Activity in Biological Substrats // Arch. Biochem. Biophys. 1961. Vol. 95. P. 271–278.

Gusta L. V., Trischuk R., Weiser C. J. Plant Cold Acclimation: The Role of Abscisic Acid // J. Plant Growth Regul. 2005. Vol. 24. P. 308–318.

Morichara K., Oka T., Tsuzuki H. Proteases activity // Biochem. Biophys. Acta. 1967. Vol. 139. P. 382–397.

Quiles M. J., Garcia C., Cuello J. Differential Effects of Abscisic Acid and Methyl Jasmoate on Endoproteinases in Senescing Barley Leaves // Plant Growth Regul. 1995. Vol. 16, N 1. 197–204.

Sgarbieri V. C., Gupte S. M., Kramer D. E., Whitaker J. R. Ficus Enzymes. I. Separation of the Proteolytic Enzymes of *Ficus Carica* and *Ficus Glabrata* Latices // J. Biol. Chem. 1964. Vol. 239. P. 2170–2177.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Титов Александр Федорович
Председатель КарНЦ РАН, д.б.н., проф., чл.-корр. РАН
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: titov@krc.karelia.ru

Фролова Светлана Алексеевна
младший научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: frolova@krc.karelia.ru

Таланова Вера Викторовна
ведущий научный сотрудник, д.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: talanova@krc.karelia.ru
тел. (8142) 762712

Венжик Юлия Валерьевна
научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: venzhik@krc.karelia.ru
тел. (8142) 762712

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

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

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

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

Труды Карельского научного центра РАН
№ 3. 2011. С. 121–130.

УДК 594.1: 577.1

БИОХИМИЧЕСКИЕ АДАПТАЦИИ МОРСКИХ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ К АНОКСИИ (ОБЗОР)

Н. Н. Фокина, З. А. Нефедова, Н. Н. Немова

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Обзор включает анализ литературных и собственных данных по проблеме биохимических адаптаций морских двустворчатых моллюсков к воздействию краткосрочной аноксии. Описаны различные механизмы регуляции метаболизма у *Bivalvia* в ответ на действие низких концентраций кислорода в окружающей среде. Показано, что биохимические адаптации являются одним из ключевых способов выживания двустворчатых моллюсков в условиях аноксии.

Ключевые слова: биохимические адаптации, двустворчатые моллюски, аноксия.

N. N. Fokina, Z. A. Nefedova, N. N. Nemova. BIOCHEMICAL ADAPTATIONS OF MARINE BIVALVES TO ANOXIC CONDITIONS (REVIEW)

The review includes investigation of the literature and our own data on biochemical adaptations of marine bivalves exposed to short-term anoxia. Various mechanisms of metabolic regulation in *Bivalvia* in response to low oxygen concentrations in the environment were described. It is shown that biochemical adaptations are a key way of marine bivalves survival under anoxic conditions.

Key words: biochemical adaptations, Bivalves, anoxia.

Способность к длительному выживанию в бескислородных условиях (то есть в условиях аноксии) хорошо развита у многих видов беспозвоночных животных. Морские организмы приспосабливаются к низким концентрациям кислорода (гипоксия или аноксия) в окружающей среде на различных уровнях организации: молекулярном, биохимическом, физиологическом и поведенческом [De Zwaan et al., 1976; Gade, 1983; Brinkhoff et al., 1983; Громосова, Шапиро, 1984; De Zwaan, Putzer, 1985; Хочачка, Сомеро, 1988; Fandrey, 1995; Wu, 2002; David et al., 2005]. Животные, обитающие в прибрежной (литоральной) зоне моря, хорошо адаптированы к воздействиям неблагоприятных факторов окружающей среды и благодаря набору адаптаций способны выживать в условиях недостатка кислорода. В частности: у них развиты дополнительные механизмы потребления кислорода из окружающей среды; они способны поддерживать внутренние энергетические ресурсы организма, переключаясь на анаэробные метаболические пути; они снижают скорость своего общего метаболизма в ответ на действие низких концентраций кислорода в морской воде [Burnett, Strickle, 2001]. Причем третий способ считается основным и одним из важнейших механизмов адаптации к недостатку кислорода для многих видов морских моллюсков [Хочачка, Сомеро, 1988; Larade, Storey, 2002; David et al., 2005]. Во время периодических обсыханий, возникающих в результате приливно-отливных циклов, литоральные двустворчатые моллюски подвергаются воздейст-

вию краткосрочной аноксии и переключают свой метаболизм на анаэробный путь. Вследствие этого они считаются типичными факультативными анаэробными организмами. Известно, что интенсивность обмена у морских *Bivalvia* при аноксии снижается более чем в 18 раз [Громосова, Шапиро, 1984]. Снижая скорость метаболизма, гипоксия/аноксия в значительной степени влияет на ростовые и многие другие физиологические характеристики моллюсков [Suchotin, Portner, 2001]. Вместе с тем способность *Bivalvia* выдерживать длительное (до 16 суток) отсутствие кислорода обеспечивается не только биохимическими адаптациями, но и деятельностью ряда других адаптивных механизмов на различных уровнях организации.

Характерной поведенческой реакцией двустворчатых моллюсков на воздействие низких концентраций кислорода в морской воде является плотное смыкание створок раковины, что препятствует обезвоживанию организма [Алякринская, 2004]. Физиологическим механизмом приспособления к недостатку кислорода в среде обитания у *Bivalvia* считается запасание кислорода в мантийной жидкости [Newell, 1989]. В условиях аноксии запасы кислорода быстро истощаются [Gabbott, 1983; Newell, 1989], и, когда парциальное давление кислорода падает ниже 20–50 мм рт. ст., моллюски переходят на анаэробный обмен и расход энергии у них заметно снижается [Ortmann, Grieshaber, 2003]. Для того чтобы избежать закисления внутренней среды продуктами анаэробного метаболизма, увеличивается концентрация кальция в лимфе за счет растворения раковины, который регулирует уровень pH крови и дает возможность избежать ацидоза тканей [Алякринская, 2004]. Для прикрепленных литоральных организмов реакция избежания неблагоприятного воздействия гипоксии невозможна, поэтому, помимо физиологических механизмов потребления максимально доступного кислорода из воды и его транспорта в ткани, для них характерны следующие адаптивные метаболические стратегии выживания в условиях недостатка кислорода в морской воде: обладание большими запасами потенциальных источников энергии в тканях (главным образом гликогена и некоторых аминокислот); соединение реакций гликолиза с дополнительными реакциями на уровне субстратного фосфорилирования с повышенным выходом АТФ; образование альтернативных конечных продуктов молочной кислоты, которые являются или летучими, или менее кислотными компонентами, для того чтобы клеточный гомеостаз минимально изменялся во время воздействия долгосрочной аноксии; значительное понижение скорости метаболизма, что способствует снижению потребностей организма в молекулах АТФ [Kapper, Stickle, 1987; Burnett, Strickle, 2001; Larade, Storey, 2002].

Для морских моллюсков характерен двухфазный адаптивный ответ на воздействие низких концентраций кислорода в окружающей среде. Во время отлива они подвергаются *первичному воздействию гипоксии*, при этом у них значительно истощаются запасы кислорода в тканях, постепенно усиливается распад углеводов. Такие изменения в метаболизме моллюсков приводят к компенсаторному увеличению выхода ферментативного АТФ, необходимого для поддержания нормальной скорости общего метаболизма.

При *длительном воздействии низких концентраций кислорода,* то есть при отсутствии кислорода в морской воде (например, в экспериментальных условиях или при загрязнении среды обитания), у моллюсков падает скорость метаболизма, а выход АТФ составляет 10% от аэробного метаболизма. Снижение скорости метаболизма продолжается до тех пор, пока внутренние запасы организма способствуют выживанию моллюсков в таких неблагоприятных условиях. Известно, что большинство морских моллюсков, обитающих на литорали, могут выживать в условиях аноксии дни и даже недели [Larade, Storey, 2002; Алякринская, 2004]. Значительное снижение метаболизма в свою очередь способствует подавлению скорости реакций синтеза и использования АТФ в метаболических процессах. Следовательно, многие физиологические процессы длительное время могут обеспечиваться за счет продукции АТФ ферментативным способом [Storey, 2004].

У морских моллюсков описано несколько механизмов регуляции уровня метаболизма. Одним из них является изменение скорости гликолитических реакций. Например, для *Bivalvia* характерно *аллостерическое регулирование активности ферментов* в условиях аноксии, в ходе которого метаболиты оказывают воздействие на специфические локусы ферментов. Одним из примеров такой регуляции в бескислородных условиях служит ингибирование активности 6-фосфофрукто-1-киназы и пируваткиназы низкими концентрациями фруктоза-2,5-дифосфата и повышенным содержанием L-аланина соответственно. Регуляция с помощью *изменений в значениях pH* окружающей среды также способствует альтерациям в скорости гликолитических реакций. Так, низкие значения pH благоприятствуют направлению потоков фосфоенолпирувата (ФЕП) в сторону синтеза сукцината [Larade, Storey, 2002] (подробнее см. далее).

Одним из важных механизмов снижения скорости общего метаболизма служит обратимое фосфорилирование белков. Такие изменения в структуре белков вызывают значительные модификации в активности многих ферментов и функциональных белков, участвующих во всех процессах жизнедеятельности организма. Например, у *Littorea littorea,* как и у большинства моллюсков, устойчивых к аноксии, обратимое фосфорилирование некоторых ферментов гликолиза способствует перенаправлению потока углерода в анаэробный путь ферментативного метаболизма, а также подавлению скорости гликолитического пути. Известно, что в аноксийных условиях фосфорилирование фосфофруктокиназы и пируваткиназы переводит их в менее активные формы [Storey, 2004]. Следовательно, ковалентная модификация ферментов, индуцированная аноксией, значительно понижает их активность, изменяет кинетические свойства и подавляет общую скорость метаболизма.

Фосфорилирование ферментов гликолиза и различных протеинкиназ, вызванное действием аноксии, может не только изменять их кинетические свойства, но и превращать эти ферменты в менее активные формы. Основными киназами являются цАМФ-, цГМФ-, Ca^{2+} и фосфолипидзависимые протеинкиназы, активность которых также обеспечивается соответствующими вторичными мессенджерами – цАМФ, цГМФ, Ca^{2+} и фосфолипидами [Larade, Storey, 2002]. Показано, что в условиях аноксии снижается количество цАМФ-зависимой протеинкиназы. Следовательно, метаболические функции, которые усиливает данная протеинкиназа, будут подавляться во время анаэробиоза.

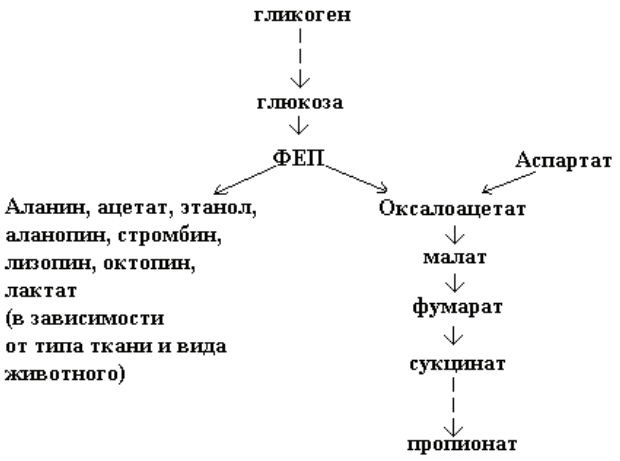
Считается, что подавление каскада сигнальной трансдукции является одним из механизмов снижения скорости метаболизма [Storey, 2004]. Известно, что цГМФ и его протеинкиназа играют основную роль в сигнальной трансдукции при адаптивном ответе морских двустворчатых моллюсков на действие низких концентраций кислорода в морской воде. В переднем мускуле-замыкателе *Mytilus edulis* увеличение концентрации цГМФ происходит в ответ на действие ацетилхолина, который является нейротрансмиттером, стимулирующим сокращение этих мышц для того, чтобы закрыть створки раковины. У двустворчатых моллюсков закрытые створки раковины стимулируют падение уровня кислорода в организме, а также активируют анаэробные адаптации [Larade, Storey, 2002]. цГМФ-зависимая протеинкиназа способствует фосфорилированию некоторых ферментов, включенных в обмен углеводов (в частности пируваткиназы) у большинства видов морских моллюсков [Brooks, Storey, 1997], и экспрессии генов, ответственных за устойчивость моллюсков к аноксии [Larade et al., 2001; Larade, Storey, 2002].

Несмотря на то что снижение скорости метаболизма является количественно выгодным механизмом, способствующим выживанию морских моллюсков в условиях аноксии, активация модифицированных путей метаболизма также играет важную роль в процессах адаптаций морских моллюсков к низким концентрациям кислорода в морской воде. В ходе данных реакций в значительной степени увеличивается выход АТФ и образуются некислотные и/или летучие конечные продукты, способствующие в свою очередь сохранению гомеостаза клетки в условиях аноксии.

У морских моллюсков первичным ответом на недостаток кислорода в окружающей среде является обычный метаболический путь: превращение гликогена и аспартата в конечные продукты – аланин и сукцинат соответственно. Так, в ходе реакций гликолиза гликоген (а именно глюкоза) распадается до пирувата, а затем, вместо того чтобы восстанавливаться до лактата, пируват подвергается реакции трансаминирования (используя аминогруппы аспартата) с образованием аланина (рис.). Продукт дезаминирования аспартата – оксалоацетат – восстанавливается до малата (используя НАДН, который в других обстоятельствах расходуется в реакции с лактатдегидрогеназой). Малат превращается в фумарат, а затем – в сукцинат с образованием АТФ, а последующее превращение сукцината в пропионат у некоторых видов морских моллюсков связано с дополнительным синтезом АТФ. Известно, что вследствие истощения пула аспартата происходит метаболический сдвиг, который направляет ФЕП, образованный в ходе реакций гликолиза, на синтез оксалоацетата (см. рис.). Данный эффект достигается ингибированием фермента пируваткиназы таким образом, что ФЕП карбоксилируется с образованием оксалоацетата, который затем используется в реакциях синтеза сукцината [Хочачка, Сомеро, 1988; Larade, Storey, 2002].

Необходимо отметить, что восстановление малата до сукцината происходит с помощью сукцинатдегидрогеназного комплекса электрон-транспортной цепи (комплекс II). Во время прилива у моллюсков аэробный энергетический метаболизм осуществляется посредством цикла Кребса, с переносом электронов от сукцината на убихинон (KoQ) через комплекс II в электрон-транспортной цепи. Во время отлива у моллюсков включается анаэробный путь, когда перенос электронов осуществляется через родохинон на фумарат с образованием

сукцината [Tielens, van Hellemond, 1998]. Родохинон является аналогом KoQ с более отрицательным потенциалом [Скулачев, 1989]. В тех случаях, когда недостаточно кислорода в окружающей среде, фумарат действует как акцептор электронов, образуя при этом сукцинат. Повышенный уровень сукцината во время анаэробиоза позволяет митохондриям сохранять свою метаболическую активность до тех пор, пока кислород снова станет доступным [Bacchiocchi, Principato, 2000].



Схематическое изображение метаболических путей использования гликогена и аспартата у морских моллюсков в условиях недостатка кислорода [Хочачка, Сомеро, 1988]

Необходимо отметить, что во время анаэробиоза у морских моллюсков накопление лактата и сукцината приводит к снижению внутри- и внеклеточного pH [Ellington, 1983; Walsh et al., 1984]. Одним из механизмов избежания изменений в кислотном статусе ткани в организме моллюсков является ингибирование пируваткиназы [Demers, Guderley, 1994; Michaelidis et al., 1999]. Во время анаэробиоза лактат превращается в пируват и, несмотря на высокую активность лактатдегидрогеназы во всех тканях моллюска, лактат анаэробно декарбоксилируется в ацетил-KoA, который затем используется для синтеза липидов.

В тканях моллюсков отмечается повышение уровня жирных кислот [Michaelidis et al., 1999; Fokina et al., 2007]. Ключевой гликолитический фермент пируваткиназа играет важную роль при направлении пирувата в сторону биосинтеза жирных кислот. Путем фосфорилирования этот фермент превращается в менее активную форму в течение первых 12 ч аноксии. Изменения в кинетических свойствах пируваткиназы приводят к последовательному снижению скорости накопления анаэробных конечных продуктов (лактата и сукцината), тем самым оказывая положительное влияние на кислотный статус ткани [Michaelidis et al., 1999].

Предполагается, что изменения значений pH при влиянии аноксийных условий также инициируют понижение скорости метаболизма, однако этому утверждению о сигнальной роли значений pH в снижении скорости общего метаболизма противоречат следующие факты. Во-первых, уровень pH во время воздействия аноксии снижается равномерно в течение длительного времени, тогда как переход в гипометаболическое состояние происходит за короткий промежуток времени после начала действия аноксии [Storey K., Storey J., 1990]. Во-вторых, морские моллюски используют механизм «наименьшего синтеза» кислот во время воздействия аноксии (то есть они в основном накапливают нейтральные и летучие конечные продукты, используя бикарбонаты раковины для создания буфера) [De Zwaan, 1977; Storey K., Storey J., 1990].

Вместе с тем показано, что низкие значения pH во время воздействия аноксии способствуют созданию определенного метаболического состояния, которое благоприятствует снижению скорости метаболизма [Busa, Nuccitelli, 1984]. Например, низкий уровень pH активирует распад ФЕП посредством реакции с участием ФЕП-карбоксилазы (а не с помощью пируваткиназы), и, следовательно, направляет гликолитический углерод в сторону реакции синтеза сукцината [Хочачка, Сомеро, 1988]. Более того, низкие значения pH могут влиять на протекание других процессов, таких как связывание ферментов с субклеточными структурными элементами, скорость ферментативных реакций, активность протеинкиназы относительно протеинфосфатазы, а также изменение стабильности белков [Storey, 1988; Hand, Hardewig, 1996; Schmidt, Kamp, 1996; Sokolova et al., 2000].

Помимо особенностей организации гликолитической системы и дикарбоновой части цикла Кребса, позволяющих функционировать в условиях отсутствия кислорода длительное время и достаточно эффективно [Громосова, Шапиро, 1984], к биохимическим механизмам адаптаций моллюсков можно отнести большое содержание каротиноидов, являющихся аккумуляторами кислорода в клетке [Карнаухов, 1973].

Большинство процессов, затрачивающих энергию, в том числе процессов синтеза белка, подавляются у организмов при долгосрочном воздействии низких концентраций кислорода в окружающей среде. Вместе с тем известно, что некоторые специфические РНК транскрипты, наоборот, активируются под действием аноксии. Вероятно, они обеспечивают

синтез белков, способствующих выживанию моллюсков в неблагоприятных анаэробных условиях [Larade, Storey, 2002]. Активность примерно 10,6% перекрестно действующих генов (около 300 генов), предположительно, усиливается в два или более раз под влиянием аноксии. Они включают гены протеинкиназ и фосфатаз, факторов трансляции, антиоксидантных ферментов и ядерных рецепторов. В частности, гипоксия-индуцируемый транскрипционный фактор (HIF-1) служит посредником при усилении синтеза гликолитических ферментов, необходимых для повышения выхода ферментативного АТФ.

У *Littorea littorea* впервые обнаружены и исследованы гены *kvn* и *sarp-19*. Так, у продукта *kvn* гена N-концевая гидрофобная сигнальная последовательность направляет белки к эндоплазматическому ретикулуму, где они обрабатываются и секретируются к конечному месту назначения. Данный факт позволяет предположить, что белок KVN выполняет внеклеточную функцию. Он обладает рядом определенных последовательностей, таких как цистеиновые кластеры. Предполагается, что KVN является железо-серным белком, который связывает железо, и поэтому может относиться к семейству ферредоксинов. Его функция аналогична другим ферредоксинподобным белкам. По-видимому, он является посредником в электронпереносящих реакциях во время действия аноксии или при возвращении организмов в исходные условия.

Продукт гена *sarp*-19 – белок, синтезируемый в результате действия аноксии на моллюсков. Общая функция EF- домена данного белка – это связывание кальция, что в свою очередь стимулирует конформационные изменения, приводящие к активации (или инактивации) белков-мишеней. Функция белка SARP-19 при анаэробиозе может включать кальций-активируемый сигналинг или выделение кальция. Как уже отмечалось, переключение метаболизма у моллюсков с аэробного пути на анаэробный сопровождается растворением раковины с образованием бикарбоната кальция, который выполняет буферные функции.

Характерной реакцией у двустворчатых моллюсков на воздействие воздуха служит закрытие створок раковины, а у брюхоногих моллюсков – крышки отверстия в раковине. Таким образом, моллюски ограничивают себя от действия окружающей среды, что в свою очередь требует создание водного и осмотического баланса внутри организма. Закрывание раковины моллюсков вызывает существенное повышение уровня кальция во время анаэробиоза. Следовательно, повышенное количество кальцийсвязывающего белка (SARP-19) в организме моллюсков под действием аноксии способствует снижению уровня свободного кальция. В основном это происходит в условиях гипометаболического состояния организма, когда сокращаются расходы АТФ на перенос кальция через плазматическую мембрану [Storey, 2004].

Предполагается, что у многих организмов кислородным сенсором служит фермент пролилгидроксилаза, который модифицирует остаток пролина в кислородзависимом домене HIF-1, основного транскрипционного фактора, включенного в регуляцию транскрипции генов с помощью кислорода [Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001]. Данный кислородный сенсор встречается у большинства животных, однако вторичные мишени этого сенсора (HIF-1 или другие) значительно отличаются у животных, *чувствительных* к гипоксии и *устойчивых* к аноксии. Известно, что HIF-1 у *чувствительных к гипоксии* млекопитающих запускает различные компенсаторные реакции, в ходе которых увеличивается поступление кислорода в ткани и усиливаются гликолитические реакции. У животных, *устойчивых к действию аноксии*, наоборот, инициируется серия механизмов, способствующих подавлению скорости метаболизма, и обратимо останавливаются различные энергозависимые процессы. Следовательно, у животных, устойчивых к аноксии, в том числе у морских моллюсков, в опосредование экспрессии генов в ответ на недостаток кислорода включаются транскрипционные факторы, отличные от HIF-1 [Larade, Storey, 2002].

Уровень обмена веществ, и в частности энергетического метаболизма, определяет адаптивные возможности организма. Ключевым звеном, обусловливающим уровень биоэнергетики особи, служит количество поступающего в организм кислорода [Озернюк, 2003]. В литературе по биоэнергетике животных особое внимание уделяется использованию липидных и углеводных субстратов в качестве источников энергии [Громосова, Шапиро, 1984; Хочачка, Сомеро, 1988]. Известно, что в аэробных условиях морские моллюски используют в качестве источников энергии липиды, углеводы и аминокислоты. При аноксии углеводы становятся основным энергетическим субстратом, поскольку в ходе реакций гликолиза, а именно окисления фосфатов гексоз (образованных из глюкозы и гликогена) до фосфатов триоз, а также субстратного фосфорилирования, образуется АТФ [Larade, Storey, 2002]. У моллюсков наблюдается использование в качестве энергетических субстратов не только гликогена, но и белков, тогда как липиды еще не стали главным источником энергии [Хочачка, Сомеро, 1988; Шульман и др., 1993].

Вместе с тем у *Mytilus edulis* L. было показано, что липиды могут утилизироваться в анаэробных условиях через β-окисление с образованием ацетил-КоА [Громосова, Шапиро, 1984]. В исследованиях на беломорских мидиях [Фокина и др., 2006а, 2010] было показано снижение уровня триацилглицеринов (ТАГ) и эфиров холестерина под влиянием 12 и 24 ч аноксии, что свидетельствует о возможном использовании запасных липидов в качестве источников метаболической энергии или на синтез обычных для мидий энергетических субстратов углеводной/белковой природы. Причем участие запасных липидов в компенсаторной реакции беломорских мидий в ответ на действие краткосрочной аноксии зависит от этапа периода нереста (3*B* или 3*C*) [Фокина и др., 2006а]. Описанные выше колебания в составе запасных липидов характерны для 3*C* мидий (этап резорбции остаточных половых продуктов). У 3*B* мидий (этап вымета гамет), наоборот, значительно повышается уровень ТАГ, что указывает, вероятно, на появление потребности альтернативного источника энергии, которым могут быть липиды [Васильева, Мещерякова, 2003; Фокина и др., 2006а]. Некоторые авторы связывают повышение уровня ТАГ у мидий в условиях недостатка кислорода (суточной аноксии) с явлением аутофагии в пищеварительных клетках [Hole et al., 1995].

Считается, что колебания в жидкостности (микровязкости) липидного бислоя влекут за собой изменения в проницаемости мембран и модификации активности встроенных в нее белков (ферментов, ионных каналов, рецепторов), что в свою очередь приводит к активации и развитию регуляторных реакций, направленных на адаптацию организма к неблагоприятным условиям окружающей среды [Лось, 2001; Los, Murata, 2004]. Следует отметить, что в некоторых работах, посвященных исследованию влияния аноксии на морских животных, отмечается снижение проницаемости мембран [Hochachka et al., 1996]. У беломорских мидий в ответ на действие краткосрочной аноксии отмечались изменения в основных показателях микровязкости липидного бислоя – холестерин/фосфолипиды и фосфатидилэтаноламин/фосфатидилхолин (ФЭА/ФХ) [Фокина и др., 2010], свидетельствующие об уплотнении мембран и, следовательно, о снижении их проницаемости [Еляков, Стоник, 1988; Gillis, Ballantyne, 1999a, b; Loque et al., 2000]. Высокий уровень холестерина и ФХ, которые стабилизируют липидный бислой, компенсировался у мидий повышенным содержанием полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), которые, как известно, оказывают разжижающее действие на мембраны [Крепс, 1981; Хочачка, Сомеро, 1988; Gillis, Ballantyne, 1999a, b]. В результате действия краткосрочной аноксии среди полиеновых кислот увеличивалась относительная доля n-6 кислот, которые благодаря особенностям своей структуры обеспечивают определенную прочность мембранам при неблагоприятном влиянии аноксии на мидий. Помимо полиенов обычного строения, важную роль в обеспечении целостности и стабильности липидного бислоя играют неметиленразделенные жирные кислоты (НМРЖК), которые, как известно, более устойчивы к окислению, что позволяет им в составе фосфолипидов значительно влиять на структуру липидного матрикса [Paradis, Ackman, 1977; Klingensmith, 1982; Жукова, 1992; Захарцев и др., 1998]. Отмеченные модификации концентраций НМРЖК и их биосинтетических предшественников у литоральных мидий свидетельствуют о возможном дополнительном синтезе НМРЖК [Фокина и др., 2010]. Предполагается, что необходимость в кислотах с необычной структурой появилась у прибрежных моллюсков в связи с падением уровня n-3 ПНЖК. Подобная обратная зависимость между НМРЖК и n-3 кислотами была ранее отмечена у морских моллюсков и другими авторами [Klingensmith, 1982; Жукова, 1992]. Такие изменения в составе жирных кислот способствуют стабилизации мембраны при сохранении необходимого уровня жидкостности за счет синтеза *de novo* НМРЖК моллюсками, и в таком случае они не зависят от внешних источников полиеновых кислот [Захарцев и др., 1998]. У субстратных мидий изменения в количестве моноеновых и НМРЖК были менее выражены, кроме того, у них наблюдалось повышенное содержание полиенов линоленового семейства (n-3 ПНЖК), которые, по-видимому, обеспечивают нормальное функционирование мембран при воздействии аноксии на моллюсков [Fokina et al., 2007; Фокина и др., 2010].

У литоральных и субстратных мидий в результате действия краткосрочной аноксии (12 и 24 ч) отмечались изменения в содержании минорных фосфолипидов мембран – фосфатидилинозитола (ФИ), лизофосфатидилхолина (ЛФХ) и сфингомиелина (СФМ), а также жирных кислот (18:1n-9, 18:2n-6, 20:4n-6, 20:5n-3 и 22:6n-3), обладающих определенной физиологической активностью [Фокина и др., 2010]. В результате суточного влияния аноксии на литоральных и субстратных мидий заметно снижалось количество СФМ, который, как известно, через генетический аппарат клетки контролирует синтез ХС [Scheek et al., 1997], а понижение уровня ЛФХ у мидий с искусственных субстратов после влияния 12 ч аноксии связывается с его мембранно-

модулирующим эффектом [Проказова и др., 1998; Фокина и др., 2010].

При влиянии 12 и 24 ч аноксии на литоральных и субстратных мидий значительно повышался уровень арахидоновой 20:4n-6 кислоты. Отмеченные изменения в коэффициенте 18:2n-6/20:4n-6 свидетельствуют о высоком уровне метаболизма 20:4n-6 кислоты и ее биосинтетического предшественника – линолевой 18:2n-6 кислоты [Фокина и др., 2006б; Fokina et al., 2007]. Поскольку 20:4n-6 кислота используется для синтеза эйкозаноидов [Bell et al., 1986; Tocher, 2005], вероятно, ее усиленный обмен способствует выживанию моллюсков в неблагоприятных условиях аноксии. Помимо 20:4n-6 кислоты, у литоральных и субстратных мидий в результате влияния аноксии повышался уровень олеиновой 18:1n-9 кислоты [Fokina et al., 2007; Фокина и др., 2010]. Данный эффект может быть связан с увеличением активности ферментов, ответственных за синтез данной кислоты. Показано, что гены, кодирующие ферменты, которым для активации нужен кислород, могут регулироваться гипоксией. В частности, активность Δ9-десатуразы, которая катализирует реакцию образования моноеновых кислот (главным образом олеиновой 18:1n-9 кислоты), зависит от уровня кислорода в окружающей среде. Известно, что степень ненасыщенности жирных кислот, образованных в результате действия Δ9-десатуразы, влияет на физические свойства мембранных фосфолипидов. Более того, в организме животных метаболиты ПНЖК действуют как сигнальные молекулы. Изменение экспрессии мРНК 9-десатуразы, по-видимому, является ответом на недостаток кислорода как субстрата [David et al., 2005]. Снижение количества основных кислот линоленового семейства: 20:5n-3 и 22:6n-3 у литоральных мидий в результате влияния краткосрочной аноксии связывается с использованием этих кислот для синтеза эйкозаноидов или на энергетические нужды организма [Tocher, 2005; Freites et al., 2002]. Более того, известно, что в анаэробных условиях мембраны клетки обладают слабой ферментативной активностью, а отличительной особенностью липидного состава таких мембран является небольшое количество стеринов и необычный состав жирных кислот, характеризующийся низким содержанием полиненасыщенных кислот, в то же время состав фосфолипидов не меняется [Кандюк, 2006]. У субстратных мидий, наоборот, отмечалось повышенное содержание 20:5n-3 и 22:6n-3 кислот, которые, как известно, имеют фитопланктонное происхождение [Ackman et al., 1974; Pollero et al., 1979; Zhukova, Aizdaicher, 1995; Ramos et al., 2003], что указывает на возможный их дополнительный синтез. Подобное явление, свидетельствующее о возможном синтезе ненасыщенных жирных кислот в условиях аноксии, было описано в литературе [Horst et al., 1970, 1974]. Установлено, что у морских прикрепленных беспозвоночных 20:5n-3 кислота наряду с другими макромолекулами играет важную роль в адаптационном процессе [Ромашина, 1983; Шульман, Юнева, 1990], тогда как 22:6n-3 кислота у двустворчатых моллюсков в основном используется для получения метаболической энергии, а также участвует в регулировании мембранной жидкостности [Freites et al., 2002].

Таким образом, анализ литературных и данных собственных исследований свидетельствует о том, что в ходе эволюции морские двустворчатые моллюски выработали комплекс биохимических адаптаций, которые позволяют им переживать неблагоприятное воздействие краткосрочной аноксии. Вследствие прикрепленного образа жизни биохимические адаптации у двустворчатых моллюсков более разнообразны и выражены в большей степени, чем у свободноживущих организмов, у которых в первую очередь развиты поведенческие и физиологические механизмы, позволяющие избежать кратковременных неблагоприятных воздействий окружающей среды. Данные литературы о биохимических адаптациях у моллюсков, приведенные в рассматриваемом обзоре, подтверждают имеющиеся предположения о том, что в действительности биохимическая адаптация часто является крайним средством, к которому организм прибегает, когда у него нет поведенческих или физиологических способов избежать неблагоприятного воздействия среды [Хочачка, Сомеро, 1988; Немова, Высоцкая, 2004]. Поскольку биохимическая адаптация – не легкий путь, часто организмам проще найти подходящую среду путем миграции, чем перестроить химизм клетки. В случае прикрепленных морских прибрежных двустворчатых моллюсков миграция к благоприятным условиям среды невозможна, поэтому у них хорошо развиты механизмы регуляции метаболизма, позволяющие им адаптироваться к постоянно изменяющейся прибрежной зоне моря, для которой характерны периодические осушения.

Работа выполнена при поддержке программы Президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-3731.2010.4).

Литература

Алякринская И. О. Устойчивость к обсыханию водных моллюсков // Известия АН. Сер. биологическая. 2004. № 3. С. 362–374.

Васильева О. Б., Мещерякова О. В. Некоторые особенности липидного и углеводного обменов мидий *Mytilus edulis* L. Белого моря в условиях краткосрочной гипоксии // Актуальные проблемы биологии и экологии: тез. докл. X молодежной науч. конф. (Сыктывкар, 15–17 апреля 2003 г.). Сыктывкар, 2003. С. 45–47.

Громосова С. А., Шапиро А. З. Основные черты биохимии энергетического обмена мидий. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. 120с.

Еляков Г. Б., Стоник В. А. Стероиды морских организмов. М.: Наука, 1988. 207с.

Жукова Н. В. Неметиленразделенные жирные кислоты морских двустворчатых моллюсков: распределение по тканям и классам липидов // Журн. эволюц. биохим. и физиол. 1992. Т. 28, № 4. С. 434–440.

Захарцев М. В., Науменко Н. В., Челомин В. П. Неметиленразделенные жирные кислоты в фосфолипидах мембран мидии *Crenomytilus grayanus* // Биология моря. 1998. Т. 24, № 3. С. 183–186.

Кандюк Р. П. Стерины моллюсков и их функциональная роль (обзор) // Гидробиол. журн. 2006. Т. 42, №1. С. 62–74.

Карнаухов В. Н. Функции каротиноидов в клетках животных. М.: Наука, 1973. 103 с.

Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов. Л.: Наука, 1981. 339с.

Лось Д. А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // Успехи биологической химии. 2001. Т. 41. С. 163–198.

Немова Н. Н., Высоцкая Р. У. Биохимическая индикация состояния рыб. М.: Наука, 2004. 215с.

Озернюк Н. Д. Феноменология и механизмы адаптационных процессов. М.: изд-во МГУ, 2003. 215с.

Проказова Н. В., Звездина Н. Д., Коротаева А. А. Влияние лизофосфатидилхолина на передачу трансмембранного сигнала внутрь клетки // Биохимия. 1998. Т. 63, вып. 1. С. 38–46.

Ромашина Н. А. Морские беспозвоночные как источник эйкозапентаеновой и других полиеновых кислот // Биология моря. 1983. № 3. С. 66–68.

Скулачев В. П. Биоэнергетика. Мембранные преобразователи энергии. М.: Высшая школа, 1989. 271с.

Фокина Н. Н., Нефедова З. А., Немова Н. Н. Изменение липидного состава мидий *Mytilus edulis* L. при краткосрочной гипоксии // Северная Европа в XXI веке: природа, культура, экономика: мат-лы Междунар. конф. (Петрозаводск, 24–27 октября 2006 г.). Петрозаводск, 2006а. С. 129–131.

Фокина Н. Н., Нефедова З. А., Рипатти П. О., Немова Н. Н. Влияние суточной гипоксии на уровень (n-3) и (n-6) жирных кислот у мидий *Mytilus edulis* L. Белого моря // Биология – наука XXI века: Сб. тез. 10-й Пущинской школы-конференции молодых ученых (Пущино, 17–21 апреля 2006 г.). Пущино, 2006б. С. 98.

Фокина Н. Н., Нефедова З. А., Немова Н. Н. Липидный состав мидий *Mytilus edulis* L. Белого моря. Влияние некоторых факторов среды обитания. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2010. 243 с.

Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир, 1988. 586с.

Шульман Г. Е., Аболмасова Г. И., Столбов А. Я. Использование белка в энергетическом обмене гидробионтов // Успехи современной биологии. 1993. Т. 113, вып. 5. С. 576–586.

Шульман Г. Е., Юнева Т. В. Роль докозагексаеновой кислоты в адаптациях рыб (обзор) // Гидробиол. журн. 1990. Т. 26. С. 43–51.

Ackman R. G., Epstein S., Kelleher M. A composition of lipids and fatty acids of the ocean quahaug, *Arctica islandica*, from Nova Scotia and New Brunswick // J. Fish. Res. Bd. Canada. 1974. Vol. 31, N 11. P. 1803–1811.

Bacchiocchi S., Principato G. Mitochondrial contribution to metabolic changes in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* during anaerobiosis // J. Exp. Zool. 2000. Vol. 286. P. 107–113.

Bell M. V., Henderson R. J., Sargent J. R. The role of polyunsaturated fatty acids in fish // Comp. Biochem. Physiol. B. 1986. Vol. 83, N 4. P. 711–719.

Brinkhoff W., Stockmann K., Grieshaber M. Natural occurrence of anaerobiosis in molluscs from intertidal habitats // Oecologia. 1983. Vol. 57. P. 151–155.

Brooks S.P.J., Storey K. B. Glycolytic controls in estivation and anoxia: a comparison of metabolic arrest in land and marine mollusks // Comp. Biochem. Physiol. A. 1997. Vol. 118. P. 1103–1114.

Burnett L. E., Stickle W. B. Physiological Responses to Hypoxia // Coastal Hypoxia: Consequences for Living Resources and Ecosystems. Coastal and Estuarine Studies. 2001. P. 101–114.

Busa W., Nuccitelli R. Metabolic regulation via intracellular pH // Am. J. Physiol. 1984. Vol. 246. P. 409–438.

David E., Tanguy A., Pichavant K., Moraga D. Response of the Pacific oyster Crassostrea gigas to hypoxia exposure under experimental conditions // FEBS Journal. 2005. Vol. 272. P. 5635–5652.

De Zwaan A. Anaerobic energy metabolism in bivalve mollusks // Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. 1977. Vol. 15. P. 103–187.

De Zwaan A., Kluytmans J. H., Zandee D. I. Facultative anaerobiosis in molluscs // Biochem. Soc. Symp. 1976. Vol. 41. P. 133–168.

De Zwaan A., Putzer V. Metabolic adaptations of intertidal invertebrates to environmental hypoxia (a comparision of environmental anoxia to exercise anoxia) // Symp. Soc. Exp. Biol. 1985. Vol. 39. P. 33–62.

Demers A., Guderley H. Acclimatization to intertidal conditions modifies the physiological response to prolonged air exposure in *Mytilus edulis* // Marine biology. 1994. Vol. 118. P. 115–122.

Ellington W. The extent of intracellular acidification during anoxia in the catch muscles of two bivalve mollusks // J. Exp. Zool. 1983. Vol. 227. P. 313–317.

Fandrey J. Hypoxia-inducible gene expression // Respir Physiol. 1995. Vol. 101, N 1. P. 1–10.

Fokina N., Nemova N., Nefedova Z. Fatty acid composition of mussels *Mytilus edulis* under short-term anoxia // Chemistry and physics of lipids. Abstracts from 48th International Conference on the Bioscience of Lipids (Turku, Finland, 4–8 sept. 2007). Turku, 2007. Vol. 149. P. 60.

Freites L., Fernandez-Reiriz M.J., Labarta U. Fatty acid profiles of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) mussel of subtidal and rocky shore origin // Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 2002. N 2. P. 453–461.

Gabbott P.A. Developmental and seasonal metabolic activities in marine mollusks // Mollusca. Vol. 2. Environmental biochemistry and physiology. Academic Press Inc. 1983. P. 165–217.

Gade G. Energy metabolism of arthropods and mollusks during environmental and functional anaerobiosis // J. Exp. Zool. 1983. Vol. 228, N 3. P. 415–429.

Gillis T.E., Ballantyne J.S. Mitichondrial membrane composition of two arctic marine Bivalve mollusks, *Serripes groenlandicus* and *Mya truncata* // Lipids. 1999 a. Vol. 34, N 1. P. 53–57.

Gillis T.E., Ballantyne J.S. Influences of subzero thermal acclimation on mitochondrial membrane composition of temperate zone marine bivalve mollusks // Lipids. 1999 b. Vol. 34, N 1. P. 59–66.

Hand S., Hardewig I. Down regulation of cellular metabolism during environmental stress: mechanisms and implications // Annu. Rev. Physiol. 1996. Vol. 58. P. 539–563.

Hochachka P.W., Bick L.T., Doll C.J., Land S.C. Unifying theory of hipoxia tolerance: Molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 9493–9498.

Hole L.M., Moore M.N., Bellamy D. Age-related cellular and physiological reactions to hypoxia and hyperthermia in marine mussels // Mar. Ecol. Prog. Ser. 1995. Vol. 122. P. 173–178.

Horst D. J. van der. Investigation of the synthesis and distribution of fatty acids in the lipids of the snail *Cepaea nemoralis* (L.). I. The fatty acid composition of the total lipids // Neth. J. Zool. 1970. Vol. 20. P. 433–444.

Horst D. J. van der, Oudejans R. C. H. M., Meijers J.A., Testerink G.J. Fatty acid metabolism in hibernating *Cepaea nemoralis* (Mollusca: Pulmonata) // J. Comp. Physiol. 1974. Vol. 91. P. 247–256.

Ivan M., Kondo K., Yang H. et al. HIF-alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O_2 sensing // Science. 2001. Vol. 292. P. 464–468.

Jaakkola P., Mole D., Tian Y.M. et al. Targeting of HIF-a to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O_2 -regulated prolyl hydroxylation // Science. 2001. Vol. 292. P. 468–472.

Kapper M.A., Stickle W.B. Metabolic responses of the estuarine gastropod *Thais haemastoma* to hypoxia // Physiol. Zool. 1987. Vol. 60. P. 159–173.

Klingensmith J.S. Distribution of methylene and nonmethylene-interrupted dienoic fatty acids in polar lipids and triacylglycerols of selected tissues of the hardshell clam (*Mercenaria mercenaria*) // Lipids. 1982. Vol. 17. P. 976–981.

Larade K., Nimigan A., Storey K. Transcription pattern of ribosomal protein L26 during anoxia exposure in *Littorina littorea* // J. Exp. Zool. 2001. Vol. 290. P. 759–768.

Larade K., Storey K.B. A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates // Cell and molecular responses to stress. Vol. 3. Sensing, signaling and cell adaptation. 2002. 346 p.

Logue J.A., de Vries A.L., Fodor E., Cossins A.R. Lipid compositional correlates of temperature-adaptive interspecific differences in membrane physical structure // J. Exp. Biol. 2000. Vol. 203. P. 2105–2115.

Los D.A., Murata N. Membrane fluidity and its role in the perception of environmental signals // Biochim. Biophys. Acta. 2004. Vol. 1666, N 1–2. P. 142–157.

Michaelidis B., Pallidou A., Vakouftsi P. Effects of anoxia on the extra- and intracellular acid-base status in the land snail Helix lucorum (L.): lack of evidence for a relationship between pyruvat kinase down-regulation and acid-base status // J. Exp. Biol. 1999. Vol. 202. P. 1667–1675.

Newell R.I.E. Species profiles: Life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (North and Mid-Atlantic). Blue mussel // Biological Report 82 (11.102) TR EL-82-4. 1989. 25 p.

Ortmann C., Grieshaber M.K. Energy metabolism and valve closure behaviour in the Asian clam *Corbicula fluminea* // J. Exp. Biol. 2003. Vol. 206. P. 4167–4178.

Paradis M., Ackman R.G. Potential for employing the distribution of anomalous non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in several marine invertebrates as part of food web studies // Lipids. 1977. Vol. 12, N 2. P. 170–176.

Pollero R.T., Remaria E., Brenner R.R. Seasonal changes of the lipids of the mollusc *Chlamys tehuelcha* // Comp. Biochem. Physiol. 1979. Vol. A64, N 2. P. 257–263.

Ramos C.S., Parrish C.C., Quibuyen T.A.O., Abrajano T.A. Molecular and carbon isotopic variations in lipids in rapidly settling particles during a spring phytoplankton bloom // Organic geochemistry. 2003. Vol. 34. P. 195–207.

Scheek S., Brown M.S., Goldstein J.L. Sphingomyelin depletion in cultured cells blocks proteolysis of sterol regulatory element binding proteins at site 1 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. Vol. 94. P. 11179–11183.

Schmidt H., Kamp G. The Pasteur effect in facultative anaerobic metazoan // Experientia. 1996. Vol. 52. P. 440–448.

Sokolova I., Bock C., Portner H.-O. Resistance to freshwater exposure in White Sea Littorina spp. II: Acid-base regulation // J. Comp. Physiol. B. 2000. Vol. 170. P. 105–115.

Storey K. Suspended animation: the molecular basis of metabolic depression // Can. J. Zool. 1988. Vol. 66. P. 124–131.

Storey K.B. Gene regulation in physiological stress // International congress series. 2004. Vol. 1275. P. 1–13.

Storey K., Storey J. Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation // Quart. Rev. Biol. 1990. Vol. 65. P. 145–174.

Sukhotin A.A., Portner H.-O. Age-dependence of metabolism in mussels Mytilus edulis (L.) from the White Sea // J. Exp. Mar. Biol. and Ecol. 2001. Vol. 257. P. 53–72.

Tielens A., van Hellemond J. The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes // Biochim. Biophys. Acta. 1998. Vol. 1365. P. 71–78.

Tocher D. R Metabolism and functions of lipids and fatty acids in Teleost fish // Reviews in fisheries science. 2005. Vol. 11, N 2. P. 107–184.

Walsh P., McDonald D., Booth C. Acid-base balance in the sea mussel, Mytilus edulis. II. Effects of hypoxia and air-exposure on intracellular acid-base status // Mar. Biol. Lett. 1984. Vol. 5. P. 359–369.

Wu R. S. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses // Mar. Pollut. Bull. 2002. Vol. 45, N 1–12. P. 35–45.

Zhukova N. V., Aizdaicher N. A. Fatty acid composition of 15 species of microalgae // Phytochemistry. 1995. Vol. 39. P. 351–356.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Фокина Наталья Николаевна
научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: fokinann@gmail.com
тел. (8142) 571879

Нефедова Зинаида Анатольевна
ведущий научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: znefed@krc.karelia.ru
тел. (8142) 571879

Немова Нина Николаевна
директор ИБ КарНЦ РАН, зав. лаб. экологической биохимии, д.б.н., проф., чл.-корр. РАН
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: nemova@krc.karelia.ru
тел. (8142) 783615

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

Nefedova, Zinaida
Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: znefed@krc.karelia.ru
tel. (8142) 571879

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

Труды Карельского научного центра РАН
№ 3. 2011. С. 131–136.

УДК 581.1

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ФИТОГОРМОНОВ В КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ ПРИ ИНДУКЦИИ ОРГАНОГЕНЕЗА *in vitro* ЗАРОДЫШЕЙ *PICEA ABIES* [L.] KARST.

К. А. Хмара

Институт экологических проблем Севера УрО РАН

Исследовано содержание индолилуксусной кислоты, абсцизовой кислоты, цитокининов группы зеатина, изопентениладенина (2иП), изопентениладенозина (ИПА) в каллусных тканях при индукции органогенеза у зародышей *Picea abies* [L.] Karst. Органогенез был индуцирован на питательной среде, содержащей тидиазурон и индолилуксусную кислоту. Основным фитогормоном, индуцирующим дифференциацию адвентивных почек, является цитокинин, и процесс образования адвентивных почек зависит от содержания цитокининов группы зеатинов в тканях. Способные к органогенезу зародыши имели повышенный уровень зеатинов по сравнению с зародышами, не способными к органогенезу. Изолированные зародыши приобретали способность к органогенезу, когда уровень зеатина и зеатин-рибозида достигал 8610 нг/ г сухого веса и сохранялся выше данного уровня в течение всего пассажа. На процесс каллусогенеза большое влияние оказывало содержание ИУК и АБК в культивируемых тканях, но значительное увеличение количества данных фитогормонов в тканях приводило к ингибированию как каллусогенеза, так и органогенеза.

Ключевые слова: *Picea abies* [L.] Karst., ИУК, АБК, цитокинины, органогенез, эндогенные фитогормоны.

K. A. Khmara. DYNAMICS OF PHYTOHORMONES IN CALLUS TISSUE DURING THE INDUCTION OF ORGANOGENESIS IN EMBRYOS OF *PICEA ABIES* KARST. *in vitro*

The content of IAA, ABA, cytokinins (zeatin), 2iP-N6, IPA in callus tissues during the induction of organogenesis in embryos of Norway spruce is researched. Organogenesis was induced on a medium containing thiduazuron and IAA. The main phytohormone inducing differentiation of adventitious buds is cytokinin of the zeatin group in the tissues. Embryos capable of organogenesis had increased levels of zeatin as compared to embryos incapable of organogenesis. Isolated embryos acquired the ability for organogenesis when the level of zeatin and zeatin-ribozida reached 8610 ng/g dry weight and remained above this level throughout the passage. The process of callus formation is greatly influenced by the content of IAA and ABA in the cultured tissues, but a significant increase in the content of these groups of phytohormones resulted in inhibition of both callus induction and organogenesis.

Key words: *Picea abies* [L.] Karst., IAA, ABA, cytokinins, organogenesis, endogenous phytohormones.

Введение

Одним из факторов, влияющих на дифференцировку клетки, является воздействие фитогормонов и регуляторов роста. Спектр действия каждого из них очень широк, одно и то же соединение может по-разному влиять на развитие ткани. Фитогормоны играют жизненно важную роль в регуляции роста не только растения как целого организма, но и отдельных его органов. Каждая химическая категория фитогормонов оказывает характерное влияние на рост и дифференцировку растительных клеток и тканей.

Высокое содержание индолилуксусной кислоты (ИУК) в апикальных меристемах в период их активности свидетельствует о ее влиянии на митотическую активность тканей [Уоринг, Филлипс, 1984; Label et al., 1989]. Огромную роль ауксины играют при размножении растений in vitro. ИУК стимулирует развитие адвентивных корней [Batten, Goodwin, 1978; Manzanera, Pardos, 1990], а также образование ксилемных, флоэмных элементов [Stabel et al., 1990]. ИУК обнаружена во всех органах растений [Уоринг, Филлипс, 1984]. Высокий уровень ИУК был найден в развивающихся почках [Скуодене, 1981], активном камбии и проводящих пучках [Меняйло,1987], пыльце и формирующихся семенах [Полевой, 1982].

Цитокинины оказывают основное влияние на индукцию деления клеток, они особенно активны в регуляции клеточного деления [Кулаева, 1973; Burrows, 1978]. В молодых развивающихся зародышах уровень эндогенных цитокининов чрезвычайно высок, а на более поздних стадиях развития семени он быстро снижается [Уоринг, Филлипс, 1984].

Абсцизовая кислота (АБК*)* играет огромную роль в физиологических процессах в растениях [Walton, 1980]. Обработка экзогенной АБК во многих тестах ингибирует рост и прорастание семян. Отмечено изменение уровня эндогенной АБК в процессе индукции цветения с помощью длинного и короткого фотопериода у табака [Чайлахян, Ложникова, 1989].

Возникает вопрос о роли эндогенных фитогормонов в регуляции направленного развития клетки. Установлено [Skoog, Miller, 1957], что при изменении соотношения между ауксином и цитокинином изменяется тип образующей меристемы: при высоком отношении ауксина к цитокининам из части клеток каллуса возникают зачатки корней, а если концентрация цитокинина превышает концентрацию ауксина, то клетки дифференцируются в апикальные меристемы стебля.

Роль экзогенных фитогормонов при микроклональном размножении ели обыкновенной доказана [Chalupa, 1977; von Arnold, Eriksson, 1978, 1979], однако участие эндогенных фитогормонов в индукции органогенеза in vitro изучено недостаточно. Неизвестно, какое количество и соотношение различных групп фитогормонов оказывает влияние на процесс формирования органогенного каллуса. Поэтому актуальной задачей является изучение содержания эндогенных фитогормонов при индукции органогенеза в культуре ткани зародыша *Picea abies* [L.] Karst.

Цель данной работы – определение количества фитогормонов в каллусной ткани при индукции органогенеза у зародышей *Picea abies* [L.] Karst. и изучение их влияния на процесс развития эксплантa.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали зародыши семян *Picea abies* [L.] Karst. Семена были собраны на Устюженской лесосеменной плантации в Вологодской области с деревьев Г-184, Г-132, ПВ-56, ПВ-21. Каждая биологическая повторность состояла из семян, собранных с одного дерева.

Для индукции органогенеза применяли питательную среду (ПС), содержащую минеральные соли по Мурасиге и Скугу. В состав ПС входили: 1 % сахарозы, 0,6 % агара, 5 мг/л тиамин-HCL, 1мг/л пиридоксина, 5 мг/л никотиновой кислоты, 100 мг/л инозита. В ПС добавляли 0,01 мг/л тидиазурона и 0,01 мг/л ИУК. Экспланты культивировали на ПС в течение 28 дней, при +21°С, при 16 ч освещении. Затем их помещали на ПС, не содержащую регуляторов роста, в которую добавляли активированный уголь.

Нативные фитогормоны определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) [Катаева и др., 1990].

Экстракция фитогормонов из растительного материала. Замороженный растительный материал растирали в агатовой ступке при +4°С до гомогенного состояния и экстрагировали в течение 2 ч охлажденным до 0°С 80 %-м метиловым спиртом, содержащим 0,1 % 2,6-бутилметил-4-метилфенола (БМФ) в качестве антиоксиданта, при постоянном перемешивании в темноте, в атмосфере азота.

Полученный экстракт центрифугировали, осадок отделяли, ресуспензировали в 80 %-м метаноле, содержащем 0,1 % БМФ, и повторно экстрагировали в тех же условиях еще 30 мин. Экстракт центрифугировали, осадок отбрасывали, супернатанты объединяли. Супернатант пропускали с помощью пластикового однора-

зового шприца через предколонки объемом 3 см^3, заполненные обращенной фазой С-18 «Сепарон» (производства Чехия). Получали обесцвеченный экстракт, свободный от хлорофиллов, фенолов, каротиноидов и др. Затем экстракт делили на две равные части: одна часть для определения цитокининов, другая – ИУК и АБК. Потери фитогормонов при очистке определяли радиоактивными препаратами. Радиоактивность образцов измеряли на сцинтилляционном счетчике 1919 Рак Бета «Спектраль» фирмы ЛКБ (Швеция). В соответствии с полученными результатами учитывали потери при очистке.

Процедура ИФА. Полистироловые планшеты сенсибилизировали в течение 12 ч раствором антител в гидрокарбонате натрия (pH 9,5–9,7) при 4°С. В каждую лунку вносили по 200 мкл соответствующей антисыворотки. После сенсибилизации планшеты трижды промывали трис-солевым буфером (ТБС) в течение 15 мин, в каждую лунку вносили по 200 мкл 0,1 %-го раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА) в ТБС и инкубировали 30 мин при +37°С (кроме вариантов для определения ИУК и АБК). Затем планшеты промывали и в лунки вносили по 50 мкл стандартного раствора гормона или растительного экстракта, перемешивали 1 мин и инкубировали 1 ч (температура инкубации для цитокининов – +37°С, для ИУК и АБК – +18 – +22°С). Через 1 ч в инкубационную смесь добавляли по 150 мкл соответствующего коньюгата – щелочную фосфатазу (ЩФ-гормон), перемешивали 1 мин и инкубировали 1 ч в тех же условиях. Планшеты промывали с добавлением в ТБС 0,01 %-го раствора детергента Тритон Х-100, затем лунки заполняли 200 мкл субстрата (n-нитрофенилфосфат 1 мг/л в гидрокарбонате натрия, pH 9,5–9,7) и инкубировали 1 ч при +37° С. Реакцию останавливали, добавляя в каждую лунку по 50 мкл 5N КОН. Оптическую плотность продукта реакции измеряли при 405 нм на спектрофотометре Multiscan MCC (Flow, Англия).

Оценка результатов. В соответствии с методикой Родбарк [Rodbarc, 1974] определяли зависимость между ферментативной активностью при инкубации антител с возрастающими концентрациями гормона и ферментативной активностью при инкубации в аналогичных условиях без экзогенного гормона.

Все эксперименты проводили в четырех биологических повторностях. При проведении ИФА использовали пять аналитических повторностей. В таблице приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

Результаты

При культивировании зародышей *Picea abies* [L.] Karst. на индукционной питательной среде (ИПС) отмечено, что пути развития зародышей в культуре ткани были различны. В связи с этим были определены этапы измерения содержания фитогормонов в зародышах.

Данные иммуноферментного анализа по содержанию различных групп фитогормонов в культивируемых тканях приведены в табл.

Содержание фитогормонов в каллусной ткани после 5 дней культивирования на индукционной питательной среде

При культивировании в течение 5 дней на ИПС содержание ИУК в тканях зародыша *Picea abies* [L.] Karst. увеличилось в 15 раз (с 83 до 1275 нг/г сухого веса), зеатина и зеатин-рибозида в зародышах – до 4868 нг/г сухого веса. Количество эндогенных зеатина и зеатин-рибозида в культивируемых зародышах в течение первых 5 дней возросло в 45 раз. В первые дни культивирования в зародышах не происходило увеличения содержания эндогенных цитокининов ряда 2иП и ИПА. На 5-й день культивирования в зародышах содержалось 4 нг/г сухого веса 2иП и ИПА, что составляет почти ту же величину, что и до культивирования.

Содержание фитогормонов в процессе индукции органогенеза у зародышей ели обыкновенной на питательной среде, содержащей 0,01мг/л тидиазурона и 0,01мг/л ИУК

Тип эксплантa	Содержание фитогормонов, нг/г сухого веса			
	ИУК	АБК	зеатин+зеатин-рибозид	2иП+ИПА
Зародыши до введения в культуру ткани	83±2	164±1	109±8	4±1
После 5 дней культивирования	1275±65	21± 4	4868±79	5±1
После 12 дней культивирования	13812±401	518±61	8610±416	1250±11
После 28 дней (органогенный каллус)	12461±360	323±41	9829±596	1036±6
После 28 дней (каллус отсутствует, но формируются адвентивные почки)	28855±1420	321±28	9774±341	795±4
После 28 дней (органогенез не наблюдается)	279082±5 420	617±28	5668±27	667±8
7 дней на безгормональной среде (органогенный каллус)	1760±210	64±4	8316±68	1830±162
7 дней на безгормональной среде (органогенез отсутствует)	378994±10515	952±72	4534±271	813±48

Содержание фитогормонов в каллусной ткани после 12 дней культивирования на индукционной питательной среде

Культивирование в течение 12 дней на ПС приводило к увеличению содержания ИУК в культивируемых тканях в 167 раз. Количество АБК в культивируемых зародышах было высоким – 518 нг/г сухого веса. Содержание зеатина и зеатин-рибозида в зародышах к этому времени составляло 8610 нг/г сухого веса. Количество эндогенных цитокининов ряда 2иП и ИПА в культивируемых зародышах в течение первых 12 дней увеличилось в 298 раз.

Содержание фитогормонов в каллусной ткани после 28 дней культивирования на индукционной питательной среде

После 28 дней культивирования можно было выделить три пути развития зародыша *Picea abies* [L.] Karst. в культуре ткани. Первый – образование органогенного каллуса, на поверхности которого формировались адвентивные побеги. Второй – зародыши не образовывали каллуса, но на поверхности зародыша формировались адвентивные почки. Третий – зародыши не развивались и при дальнейшем культивировании некротизировались. У эксплантов, развивающихся различными путями, наблюдались значительные различия в содержании ИУК. В зародышах, образующих органогенный каллус, концентрация ИУК была 12461 нг/г сухого веса. Зародыши, у которых формирование адвентивных почек происходило на их поверхности, количество ИУК было в два раза выше, чем у образующих органогенный каллус. Зародыши, не способные к органогенезу на данной ПС, имели очень высокое содержание ИУК – 279082 нг/г сухого веса. Данный показатель в 10 раз превышает концентрацию ИУК в зародышах, не образующих каллус, но способных формировать адвентивные почки.

У зародышей, не способных к органогенезу, наблюдалось самое высокое содержание АБК. Количество АБК в органогенном каллусе было таким же, как и у зародышей, не образующих каллус, но способных к формированию адвентивных почек.

У зародышей, образующих органогенный каллус, и у зародышей, у которых формирование адвентивных почек наблюдалось на поверхности самого зародыша, содержание цитокининов ряда зеатина и зеатин-рибозида было примерно одинаковым и составляло соответственно 9829 и 9774 нг/г сухого веса. Зародыши, не способные к органогенезу, содержали цитокинины группы зеатинов несколько меньше – 5668 нг/г сухого веса.

Зародыши, образующие каллус, на поверхности которого происходит формирование адвентивных почек, содержали 2иП и ИПА – 1036 нг/г сухого веса. Зародыши, у которых формирование адвентивных почек наблюдалось на поверхности зародыша, содержали цитокинины ряда 2иП и ИПА (795 нг/г сухого веса). У третьей группы зародышей, не способной к органогенезу, содержание цитокининов ряда 2иП и ИПА было 667 нг/г сухого веса.

Содержание фитогормонов в каллусной ткани после 7 дней культивирования на безгормональной питательной среде

После пересадки зародышей *Picea abies* [L.] Karst. на питательную среду, из состава которой были исключены регуляторы роста, органогенная каллусная ткань формировала адвентивные побеги. При этом содержание ИУК в каллусе резко снижалось и достигало уровня при культивировании зародышей в течение 5 дней на ИПС, содержащей регуляторы роста. Зародыши, не способные к органогенезу, при культивировании их на безгормональной ПС погибали. Содержание ИУК в них было очень высоким, примерно в 200 раз выше, чем в органогенном каллусе.

При пересадке культивируемых зародышей на ПС, не содержащую регуляторов роста, количество АБК в органогенном каллусе значительно снижалось. У зародышей, не способных к органогенезу, содержание АБК было в 15 раз выше, чем в органогенном каллусе.

После пересадки эксплантов на ПС, не содержащую регуляторов роста, отмечалось снижение уровня эндогенных зеатинов в культивируемых тканях. При этом увеличилось количество эндогенных цитокининов ряда 2иП и ИПА.

Обсуждение

В связи с тем что в ПС отсутствовали экзогенные цитокинины, а в качестве индуктора органогенеза применялся тидиазурон (данное вещество, являясь производным тиомочевины и обладая хорошо выраженным цитокининовым эффектом, не вступало в перекрестные реакции с антисыворотками, полученными к цитокининам), все регуляторы роста группы цитокининов в зародышах имели эндогенное происхождение. АБК была также эндогенного происхождения, так как в ПС данное вещество не добавлялось. На содержание ауксинов в культивируемых тканях оказывала влияние экзогенная ИУК.

Результаты показали, что способность зародышей *Picea abies* [L.] Karst. в культуре ткани к органогенезу зависела от содержания фито-

гормонов в культивируемых тканях. При индукции органогенеза у ели обыкновенной на питательной среде, содержащей тидиазурон, необходимым условием является культивирование зародышей в течение 7 дней на индукционной ПС [Хмара, Катаева, 1993]. Более короткие сроки культивирования не способны вызвать органогенез.

После 5 дней культивирования на ПС зародышей *Picea abies* [L.] Karst. происходило увеличение содержания ИУК и цитокининов группы зеатинов в зародышах. Уровень АБК значительно снижался, а 2иП и ИПА оставались без изменения. Полученные данные показали, что на первом этапе культивирования зародышей происходило накопление ИУК, которая оказывала влияние на деление, растяжение и дифференциацию клеток. Увеличение содержания цитокининов на данном этапе говорит о том, что в зародышах происходили процессы, стимулирующие деление клеток. Снижение содержания АБК на первом этапе культивирования – необходимое условие для начала развития зародышей в культуре ткани, так как АБК является ингибитором роста, а ее концентрация в зародышах до начала эксперимента была высокой.

После 12 дней культивирования на ИПС зародыши приобретали способность к формированию адвентивных почек, при этом увеличивалось содержание всех групп фитогормонов. Повышение количества АБК к 12 дню культивирования на индукционной питательной среде в культивируемых тканях объясняется интенсивным накоплением биомассы. В работе Л. Н. Тимергалиной и др. [2007] было показано увеличение содержания АБК в зоне роста листа и корней у растений пшеницы, что подтверждает наши результаты.

После 28 дней культивирования на ИПС, в зависимости от пути развития зародышей *Picea abies* [L.] Karst., отмечались следующие закономерности: высокое содержание ИУК в культивируемых зародышах ингибировало процесс образования каллуса; основную роль при индукции органогенеза играют цитокинины, и если уровень их не достигал определенного значения, то ткани зародыша были не способны формировать адвентивные почки.

Процесс образования адвентивных почек коррелировал со значительным изменением уровня эндогенных цитокининов группы зеатинов в тканях зародышей *Picea abies* [L.] Karst. Аналогичные данные были получены К. Г. Чжань и др. [2005]. Высокое содержание 6-бензиламинопурина (БАП) является основным фактором образования побегов на каллусе. Зародыши, способные к формированию адвентивных почек, имели уровень цитокининов группы зеатинов примерно в два раза выше, чем зародыши, не способные к органогенезу на данной питательной среде. Высокое содержание ИУК и АБК в культивируемых тканях приводило к ингибированию процесса образования каллуса и органогенеза. Зависимость каллусогенеза от ИУК показана в работе К. Г. Чжань и др. [2005]. При образовании почек банана в культуре ткани высокие концентрации эндогенной ИУК тормозили развитие почек, что подтверждает полученные результаты [Gilmar et al., 2000].

Рассматривая способность зародышей ели обыкновенной к органогенезу, можно отметить, что основное влияние на способность их к органогенезу в культуре ткани оказывало соотношение цитокининов к АБК. Так, соотношение цитокининов группы зеатинов к АБК при органогенезе через каллусогенез и при образовании адвентивных почек на поверхности зародыша было одинаковым. У зародышей, не способных к органогенезу в культуре ткани, данное соотношение было значительно меньше. Наши результаты позволяют утверждать, что эндогенные фитогормоны играют основную роль при индукции органогенеза в культуре ткани зародыша *Picea abies* [L.] Karst. Способность тканей эксплантa к органогенезу зависит от соотношения различных групп фитогормонов, но основную роль при этом играют цитокинины. К. Г. Чжань и др. [2005] показали, что для образования побегов важнее низкое соотношение ИУК к БАП, чем низкие концентрации каждого из этих гормонов, соотношение ИУК к БАП определяло рост каллусов и образование почек.

Данные по использованию в качестве индуктора органогенеза в культуре зародыша *Picea abies* [L.] Karst. тидиазурона, который не вступает в перекрестные реакции с антителами к цитокининам, позволяют утверждать, что способность тканей зародыша к органогенезу зависит от биосинтеза эндогенных фитогормонов в тканях эксплантa. К. А. Хмара и Н. В. Катаева [1993] показали, что на формирование органогенного каллуса в культуре тканей зародышей *Piera abies* [L.] Karst. большое влияние оказывает исходный генотип. Учитывая данный фактор и наши результаты, можно отметить, что зародыши изначально обладают различной способностью к биосинтезу фитогормонов.

Нами выявлена динамика изменения фитогормонов в процессе индукции органогенеза у *Picea abies* [L.] Karst. Основную роль при индукции органогенеза играют цитокинины, и если уровень их не достигал определенного значения, то ткани зародыша были не способны формировать адвентивные почки. Зародыши,

способные образовывать адвентивные почки через каллусогенез и непосредственно на поверхности самого зародыша, имели одинаковый уровень цитокининов. На процесс каллусогенеза основное влияние оказывал уровень ИУК и АБК, но резкое увеличение содержания этих регуляторов роста в тканях приводило к ингибированию каллусогенеза и органогенеза.

Литература

Катаева Н. В., Александрова И. Г., Карягина Т. Б., Машкова А. Х. Возможности метода иммуноферментного анализа для определения фитогормонов в культивируемых in vitro побегах // Физиология растений. 1990. Т. 37, № 4. С. 813–821.

Кулаева О. Н. Цитокинины, их структура и функции. М.: Наука, 1973. С. 9–23.

Меняйло Л. Н. Гормональная регуляция ксилогенеза хвойных. Новосибирск: Наука, 1987. 185 с.

Полевой В. В. Фитогормоны. Л., 1982. 183 с.

Скуодене Л. П., *Даргинавичене Ю. Н.* Вопросы повышения продуктивности лесов южной Прибалтики. Вильнюс, 1981. 176 с.

Тимергалина Л. Н., Высоцкая Л. Б., Веселов С. Ю., Кудоярова Г. Р. Содержание гормонов, водный обмен и рост листьев растяжением у растений пшеницы при повышении освещенности // Физиология растений. 2007. Т. 54, № 5. С. 715–721.

Уоринг Ф., Филлипс И. Рост растений и дифференцировка. М.: Мир, 1984. С. 80–225.

Хмара К. А., Катаева Н. В. Влияние генотипа материнского растения и веществ цитокининового типа действия на способность тканей зародыша ели обыкновенной (*Picea abies* L.) к органогенезу *in vitro* // Физиология растений. 1993. Т. 40, № 5. С. 802–805.

Чайлахян М. Х., Ложникова В. Н. Фитогормоны и цветение растений // Регуляторы роста и развития растений. Киев, 1989. С. 117–132.

Чжань К. Г., Ли. В., Мао Ф. и др. Содержание гормонов в каллусах *Scutellaria baicalensis*, индуцированных тидиазуроном // Физиология растений. 2005. Т. 52, № 3. С. 392–398.

Von Arnold S., Eriksson T. Induction of adventitious buds on embruos of Norway spruce grown in vitro // Physiol Plant. 1978. Vol. 44, N 2. P. 283–287.

Von Arnold S., Eriksson T. Bud induction on isolated needles of Norway spruce (Picea abies L. Karst.) grown in vitro // Plant Science. 1979. Vol. 15, N 4. P. 363–372.

Batten D. J., Goodwin P. B. Phytohormones and the induction of adventitious roots // Phytohormones and Related Compounds. 1978. Vol. 11. P. 137–173.

Burrows W. Cytokinins // Biochem. Soc. Trans. 1978. Vol. 6. P. 1395–1400.

Chalupa V. Development of isolated Norway spruce and Douglas fir buds in vitro // Commun. Inst. Forest. Cech. 1977. Vol. 10, N 1. P. 71–78.

Gilmar R. Z., Gilberto B. K., Jan E. K., Elaine C. R. Hormonal and Histological Studies Related to In Vitro Banana Bud Formation // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2000. Vol. 63. N 3. P. 187–192.

Label Ph., Sotta B., Miginiac E. Endogenous levels of ABA and IAA during in vitro rooting of Wild Cherry explants produced by micropropagation // Plant Growth Red. 1989. Vol. 8. P. 325–333.

Manzanera J., Pardos J. Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L. // Plant Cell Tissue and Organ Cult. 1990. Vol. 21, N 1. P. 1–8.

Rodbarc D. Statistical quality control and routhine data processing for radioimmunoassay and immunoradiometric assays // Clin. Chem. 1974. Vol. 20, N 8. P. 1255–1257.

Skoog F., Miller W. Chemical regulation of growth and organ formation in vitro // Symp. Soc. Exp. Biol. 1957. Vol. 11. P. 118–121.

Stabel P., Eriksson T., Engstrom P. Changes in Protein Synthesis upon Cytokinin-Mediated Adventitious Bud Induction and during Seedling Development in Norway Spruce, *Picea abies* // Plant Physiol. 1990. Vol. 92. P. 1174–1183.

Walton D. Biochemistry and physiology of abscisic acid // Annu. Rev. Plant Physiol. 1980. Vol. 31. P. 453–489.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ:

Хмара Константин Алексеевич
научный сотрудник, к.б.н.
Институт экологических проблем Севера УрО РАН
Набережная Северной Двины, 23, Архангельск,
Россия, 163000
эл. почта: KAX1961@yandex.ru

Khmara, Konstantin
Institute of North Ecological Problems UB RAS
23 Nabereznaya Severnoy Dviny,
163000 Archangelsk, Russia
e-mail: KAX1961@yandex.ru

Труды Карельского научного центра РАН
№ 3. 2011. С. 137–145.

УДК [577.121.7+577.151]:597.552.51

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ СИГОВ *COREGONUS LAVARETUS* L., ОБИТАЮЩИХ В ХВОСТОХРАНИЛИЩЕ ГОРНООБОГАТИТЕЛЬНОГО КОМБИНАТА, ПО НЕКОТОРЫМ БИОХИМИЧЕСКИМ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ

М. В. Чурова, О. В. Мещерякова, Н. В. Ильмаст, Н. Н. Немова

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Проведено сравнительное исследование уровня РНК/ДНК, активности ферментов энергетического и углеводного обмена, уровня экспрессии генов некоторых ферментов в мышцах, печени, почках и жабрах сигов (3+ и 4+), обитающих в чистом озере (оз. Каменное) и хвостохранилище отходов Костомукшского горнообогатительного комбината (оз. Костомукшское). Показано, что значение индекса РНК/ДНК в белых мышцах сигов из загрязненного озера было значительно ниже, чем в мышцах сигов из чистого озера, что указывает на более низкий уровень синтеза белка и замедление темпов роста рыб из хвостохранилища. Энергетический обмен мышц, печени сигов из неблагоприятного водоема характеризовался низким уровнем аэробного синтеза АТФ и более высоким уровнем анаэробного обмена, что, возможно, является компенсаторным механизмом поддержания энергетического гомеостаза. В жабрах рыб, наоборот, наблюдалась интенсификация аэробного обмена. Особенностью метаболизма печени являлось также усиленное использование углеводов в процессах энергообеспечения и в пентозофосфатном пути. Установлены различия в уровне экспрессии генов цитохром *c* оксидазы и лактатдегидрогеназы в белых мышцах сигов 3+ и 4+ из чистого и техногенного водоемов, отражающие возрастные особенности в регуляции активности ферментов ЦО и ЛДГ на уровне транскрипции при адаптации к неблагоприятному воздействию.

Ключевые слова: ферменты энергетического и углеводного обмена, индекс РНК/ДНК, экспрессия генов, техногенный водоем, сиги.

M. V. Churova, O. V. Mesheryakova, N. V. Ilmast, N. N. Nemova. HEALTH ASSESSMENT OF WHITEFISH *COREGONUS LAVARETUS* L. FROM THE TAILING DUMP OF THE KOSTOMUKSHA IRON MINING AND ORE DRESSING MILL BY SEVERAL BIOCHEMICAL MARKERS AND LEVEL OF ENZYME GENE EXPRESSION

The comparative study of RNA/DNA ratio, enzymes activity of energy and carbohydrate metabolism, enzymes gene expression in muscles, liver, kidney and gills of whitefish inhabiting the tailing dump of the Kostomuksha iron mining and ore dressing mill (lake Kostomukshskoe) and non affected lake Kamennoe were examined. The RNA/DNA ratio in white muscles of whitefish from the tailing dump was lower in comparison with whitefish from lake Kamennoe, that indicates the lower growth rate of fish from the tailing dump. Energy metabolism of muscles and liver of whitefish from affected lake is characterized by the low level of aerobic ATP synthesis and the high level of anaerobic

metabolism. The aerobic metabolism in gills of whitefish from the tailing dump was intensified. The using of carbohydrates in energy metabolism and in pentose-phosphate pathway were intensified in liver of affected lake fish. The difference in expression level of genes of lactate dehydrogenase and cytochrome *c* oxidase in muscles of different ages whitefish from clean and antropogenically affected water bodies were established. It reflected the age-dependent alterations in transcriptional regulation of cytochrome *c* oxidase and lactate dehydrogenase during adaptation to unfavorable environmental conditions.

Key words: enzymes of energy and carbohydrate metabolism, RNA/DNA ratio, gene expression, industrial waters, whitefish.

Введение

Важной составляющей в оценке состояния, роста и развития рыб при изменении условий окружающей среды является исследование их биохимических и молекулярно-генетических параметров. Изменения на клеточном и молекулярном уровне, возникающие в организме рыб, происходят на самых ранних этапах негативного воздействия, задолго до того, как проявятся изменения на физиологическом, организменном и популяционном уровне [Немова, Высоцкая, 2004; Konradt, Braunbeck, 2001]. В экотоксикологических исследованиях для оценки состояния рыб, темпов их роста, функциональной и метаболической активности органов и тканей используют различные биохимические показатели, в частности определение индекса отношения концентрации нуклеиновых кислот (РНК/ДНК), активности ферментов общих путей метаболизма, а также уровень экспрессии ряда генов, кодирующих ферменты или другие белки. Например, достаточно чувствительным к различным видам загрязнения водных экосистем является индекс соотношения концентраций нуклеиновых кислот РНК/ДНК [Grant, 1996; Mankiewicz-Boczek et al., 2010], отражающий уровень синтеза белков, в том числе обеспечивающих прирост мышечной ткани рыб. Он показывает, как меняется уровень клеточной РНК и соответственно синтез белка при постоянной концентрации ДНК в клетке. В связи с этим данный параметр используется для оценки состояния и темпов роста рыб.

Активность ключевых ферментов энергетического обмена и метаболизма углеводов у рыб при воздействии различных факторов среды позволяет оценить интенсивность и направление путей аэробного и анаэробного синтеза АТФ, степень использования углеводов в энергетическом и пластическом обмене, выявить закономерности и механизмы поддержания необходимого уровня метаболического гомеостаза при неблагоприятном воздействии [Мещерякова и др., 2004; Немова, 2005; Konradt, Braunbeck, 2001]. Так, показателем уровня аэробного обмена служит активность фермента дыхательной цепи митохондрий цитохром *c* оксидазы [Goolish, Adelman, 1987], характеризующий степень окисления всех энергетических субстратов – промежуточных продуктов распада углеводов, белков и жиров – в процессе аэробного метаболизма и сопряженного с ним аэробного синтеза АТФ. Малатдегидрогеназа – фермент цикла трикарбоновых кислот – при наличии корреляции с ЦО также отражает уровень аэробного метаболизма [Merrit, Quattro, 2003]. Лактатдегидрогеназа катализирует реакцию взаимного превращения лактата в пируват. В зависимости от направления реакции, катализируемого различными изоферментами, активность фермента служит показателем интенсивности анаэробного метаболизма (преимущественно в мышцах), индикатором глюконеогенеза – процесса ресинтеза глюкозы в печени или превращения лактата в пируват с последующим его включением в аэробный метаболизм. Значение активности определяемой в данной работе изоформы альдолазы характеризует уровень окисления углеводов в гликолизе. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы указывает на интенсивность протекания пентозофосфатного пути окисления углеводов, в процессе которого образуются пентозы, необходимые для синтеза нуклеиновых кислот, а также НАДФН для реакций биосинтеза липидов и восстановления глутатиона [Konradt, Braunbeck, 2001].

Для оценки воздействия промышленного производства на рыб и выявления возможных механизмов их адаптации проведено сравнительное исследование показателя РНК/ДНК, активности ферментов энергетического и углеводного обмена и уровня экспрессии генов некоторых ферментов в мышцах, печени, почках и жабрах сигов Coregonus *Lavaretus* L., обитающих в чистом озере (оз. Каменное) и хвостохранилище отходов Костомукшского горнообогатительного комбината (оз. Костомукшское).

Материал и методы

Исследовали сигов двух возрастных групп 3+, 4+, выловленных в озерах Костомукшское и Каменное в июне 2009 г. Озеро Костомукшское (54°61′ с.ш., 30°47′ в.д.) в результате строительства дамбы преобразовано в технологический водоем Костомукшского горно-обогатительного комбината и используется для оборотного водоснабжения и захоронения отходов производства (хвостов обогащения, которые в виде пульпы поступают в водоем). Вода в озере характеризуется высоким содержанием ионов K^+, Na^+, Ca^+, SO_4^{2-}, HCO_3^-, высокой минерализацией (до 645 г/мл), большим количеством мелкодисперсной минеральной взвеси (1,34 мг/л) [Состояние водных объектов .., 2007; Ильмаст и др., 2010]. Озеро Каменное (64°28′ с.ш., 30°13′ в.д.) представляет собой чистый водоем с аналогичным температурным режимом и глубиной. Размерно-весовые характеристики рыб представлены в табл. 1.

Определение активности ферментов. Активность ферментов определяли в белых мышцах, печени, жабрах и почках сигов. Ткань гомогенизировали в 0,01 М трис-HCl буферном растворе (pH 7,5). Общую активность ферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ, 1.1.1.27), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ, 1.1.1.49), малатдегидрогеназы (МДГ, 1.1.1.37) в органах сигов определяли по общепринятым методикам [Кочетов, 1980]. Активность альдолазы (КФ 4.1.2.13) – по методике Beck в модификации Ананьева и Обуховой [Колб, Камышников, 1976]. Активность цитохром *c* оксидазы (ЦО, КФ 1.9.3.1.) определяли по методу Смита [Smith, 1955], при этом цитохром *c* восстанавливали двукратным по массе количеством аскорбиновой кислоты в 0,02 М фосфатном буферном растворе (pH 7,0) в течение 2 ч и затем на колонке с сефадексом G-25 выделяли в восстановленной форме свободным от избытка восстановителя.

Определение концентрации РНК и ДНК. Тотальную РНК выделяли из белых мышц по Хомчински и Сакхи (Chomczynski, Sacchi, 1987) с помощью набора Yellow Solve («Клоноген», С.-Петербург). ДНК белых мышц экстрагировали методом Альанаби и Мартинеса [Aljanabi, Martinez, 1997]. Концентрации РНК и ДНК определяли спектрофотометрически (спектрофотометр SmartSpec Plus, BioRad, США) [Маниатис и др., 1984].

Определение уровня экспрессии генов. Уровень экспрессии генов цитохром *c* оксидазы субъединицы IV (*COX* IV) и лактатдегидрогеназы субъединицы А (*LDH-A*) в белых мышцах оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Тотальную РНК обрабатывали ДНКазой (10 ед./мл) («Силекс», Россия). Комплементарную ДНК (кДНК) синтезировали из препарата тотальной РНК с использованием MMLV-обратной транскриптазы и случайных гексануклеотидов (набор «Синтез первой цепи ДНК», «Силекс»). Концентрацию кДНК измеряли спектрофотометрически. Амплификацию осуществляли на приборе i-Cycler с оптической приставкой IQ5 (BioRad) с использованием набора «2,5 х реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ с Taq ДНК-полимеразой и ингибирующими активность фермента антителами в присутствии SYBR Green I» («Синтол», Россия). Праймеры подбирали с помощью программы Beacon Designer 5.0. Последовательности праймеров следующие:

LDH-A: прямой 5'- CGTTGACATCCTGACCTAC-3', обратный 5'- TCTCCGTGCTCTCCAATG-3' (GenBank BT043598);

COX IV: прямой 5'-TACGTGGGGCACATGGTGTT-3', обратный 5'-CCCAGGAGCCCTTCTCCTTC-3' (GenBank BT043749);

фактор элонгации *EF-1* (GenBank AF321836) прямой 5'- TGCTGGTGGTGTTGGTGAG-3', обратный 5'-AAACGCTTCTGGCTGTAGGG-3'.

Протокол ПЦР: денатурация ДНК при 95°С 5 мин; повторяющиеся циклы (45): денатурация ДНК при 95°С 20 с, отжиг праймеров при 59°С по 30 с, элонгация ДНК при 72°С по 30 с; с последующей процедурой плавления фрагментов ДНК. Концентрацию матричной РНК в виде кДНК определяли по стандартной кривой [Gahr et al., 2008]. Уровень экспрессии исследуемых генов нормализовали по уровню экспрессии референсного гена *EF-1*. Данные выражались как отношение концентрации мРНК исследуемого гена к концентрации мРНК *EF-1*.

Математический анализ полученных результатов производили с помощью непараметрических критериев: Манна–Уитни и рангового коэффициента корреляции Спирмена. Различия считали достоверными при $p<0,05$ [Коросов, Горбач, 2007].

Таблица 1. Линейно-весовые характеристики сигов возрастом 3+ и 4+ из озер Каменное и Костомукшское

Показатель	3+		4+	
	оз. Каменное (n=9)	оз. Костомукшское (n=7)	оз. Каменное (n=5)	оз. Костомукшское (n=5)
Длина (см)	20,50 ± 0,29	18,70 ± 0,35*	25,13 ± 0,77	21,6 ± 0,15*
Вес (г)	84,7 ± 3,49	65 ± 4,18*	142,83 ± 1,48	101,33 ± 5,49*

* Достоверность различий между озерами при P ≤ 0,05.

Результаты и обсуждение

Показатель РНК/ДНК в белых мышцах сигов из сравниваемых озер

Согласно результатам исследования, значение показателя РНК/ДНК в белых мышцах сигов обоих возрастов, обитающих в хвостохранилище, было ниже по сравнению с таковым в мышцах рыб из чистого водоема (рис. 1). Это указывает на снижение уровня синтеза белков, в том числе обеспечивающих прирост мышечной массы рыб, ухудшение состояния рыб и снижение темпов их роста. Эти выводы подтверждаются и данными по линейно-весовым характеристикам рыб, свидетельствующими о меньших размерах сигов из неблагоприятного водоема (см. табл. 1). Мы предполагаем, что низкий уровень синтеза белка у рыб из техногенного водоема и снижение темпов их роста обусловлены следующими факторами: во-первых, скудной кормовой базой этого озера (по данным ихтиологического анализа [Ильмаст и др., 2010]) и, во-вторых, неблагоприятным влиянием компонентов воды на различные метаболические процессы рыб, определяющие интенсивность белкового синтеза. Результаты наших исследований хорошо согласуются с литературными сведениями. Так, например, снижение индекса РНК/ДНК и темпов роста рыб было показано для окуней *Perca fluviatilis* L., испытывающих влияние сточных вод [Mankiewicz-Boczek et al., 2010], *P. flavescens,* обитающих в озере с высоким содержанием тяжелых металлов [Audet, Couture, 2003], а также при действии токсических веществ на рыб разных видов в экспериментальных условиях [Mohapatra, Noble, 1992; Varo et al., 2007].

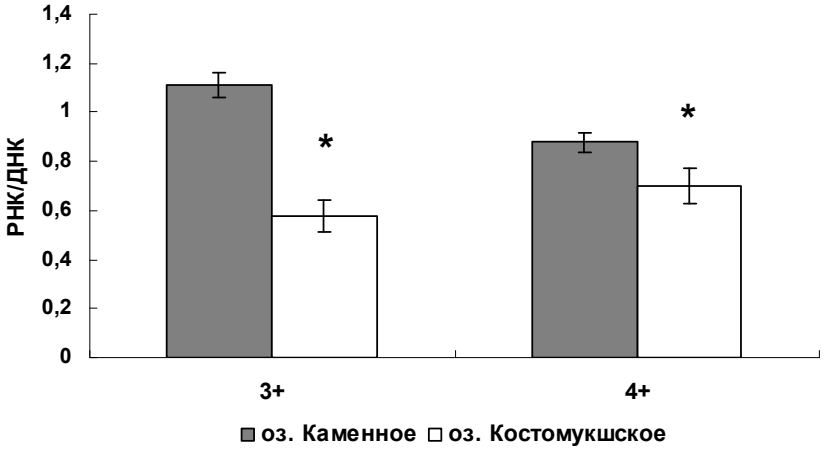


Рис. 1. Значение показателя РНК/ДНК в белых мышцах сигов возрастом 3+ и 4+ из озер Каменное и Костомукшское (M ± m)

Активность ферментов в различных органах сигов из сравниваемых озер. Тканеспецифичные особенности

В белых мышцах сигов из хвостохранилища отмечался низкий уровень аэробного энергетического обмена и высокий – анаэробного процесса синтеза АТФ, на что указывала более низкая активность цитохром *c* оксидазы и высокая – ЛДГ по сравнению с сигами из оз. Каменное (табл. 2). Интенсификацию анаэробного синтеза АТФ можно рассматривать как компенсаторную реакцию энергетического метаболизма, направленную на частичное восполнение недостающего количества АТФ, получаемое аэробным путем [Richards, 2009]. Кроме того, у сигов из сравниваемых озер наблюдалось различное значение коэффициента корреляции активностей аэробных и анаэробных ферментов: у сигов из чистого озера оно было положительным, а у рыб из хвостохранилища – отрицательным (табл. 3). Это свидетельствовало о том, что в норме аэробный и анаэробный пути синтеза АТФ функционируют совокупно, а при неблагоприятном влиянии на организм снижение интенсивности аэробного метаболизма компенсируется увеличением уровня анаэробного.

Особенность метаболизма белых мышц сигов из хвостохранилища состояла также в перераспределении использования углеводов между аэробным и анаэробным энергетическим метаболизмом в сторону усиления их использования в анаэробном синтезе АТФ. На это указывали более низкое значение активности альдолазы в мышцах (см. табл. 2) и отличия во взаимосвязи активности альдолазы и ферментов аэробного и анаэробного обмена (см. табл. 3). Значения коэффициентов корреляции альдолазы с ЦО и ЛДГ в мышцах сигов из чистого водоема были положительными и высокими, а для сигов из техногенного озера наблюдалась достоверная взаимосвязь только для альдолазы и ЛДГ.

Таблица 2. Удельная активность ферментов в органах сигов возрастом 3+ и 4+, обитающих в озерах Каменное и Костомукшское

Фермент	3+			4+		
	оз. Каменное	оз. Костомукшское	М, %	оз. Каменное	оз. Костомукшское	М, %
Мышцы						
ЦО	1,25±0,08	0,96±0,09*	23	1,78±0,32	0,79±0,25*	56
МДГ	15,03±0,99	13,05±1,12		16,38±1,83	14,30±1,61	
ЛДГ	328,127±15,59	400,96 ± 17,68*	22	252,01±18,5	362,16±16,6*	40
альдолаза	100,03±2,82	87,28 ± 3,01*	12	93,57±6,62	86,05±4,04	
Печень						
ЦО	2,38±0,14	1,14±0,16*	52	2,83 ± 0,15	1,82 ± 0,11*	35
МДГ	3,25±0,64	1,29±0,22*	60	4,33 ± 1,1	1,66 ± 0,6*	62
ЛДГ	201,44±19,66	290,82 ± 23,22*	44	181,68 ±15,51	259,43 ± 19,66*	43
альдолаза	42,09±2,94	56,88 ± 5,44*	35	52,65 ±2,13	58,61 ± 4,15*	11
Г-6-ФДГ	4,74±0,56	8,16 ± 1,59*	72	10,09 ± 0,3	16,51 ± 1,23 *	64
Почки						
ЦО	5,38±0,37	2,20±0,44*	59	5,71±0,40	3,52±0,36	38
МДГ	19,11±1,26	9,15±0,9*	52	20,35 ± 1,2	10,37 ± 0,9	49
Г-6-ФДГ	4,63±1,1	1,77±0,45*	62	4,64±0,9	1,55±0,35*	67
ЛДГ	93,3±17,3	65,36±11,5*	30	80,93 ± 10,72	64,11 ± 9,98*	21
альдолаза	29±2,05	13,57±1,98*	53	20,71 ± 1,86	12,31 ± 1,56*	41
Жабры						
ЦО	1,51±0,26	4,35±1,05*	188	2,88 ± 0,34	5,17 ± 0,88*	80
ЛДГ	81,81±5,59	47,56±6,93*	42	111,98 ± 6,70*	75,91 ± 5,35*	32
альдолаза	21,95±7,28	22,35±8,16		11,97 ± 5,11	10,75 ± 2,35	

Примечания. * Достоверные различия между активностью ферментов сигов одного возраста из разных озер (P < 0,05). Значение удельной активности ферментов представлено как M ± m в следующих единицах измерения: для ЦО – к / мг белка, для остальных ферментов – мкмоль/ мин/ мг белка.

Таблица 3. Значение коэффициентов корреляции активности исследуемых ферментов между собой в белых мышцах сигов возрастом 3+ и 4+ из сравниваемых озер

Фермент	3+		4+	
	оз. Каменное	оз. Костомукшское	оз. Каменное	оз. Костомукшское
r (ЛДГ)				
ЦО	0,82*	0,71*	0,92*	0,86*
r (альдолаза)				
ЦО	0,88*	0,23	0,89*	0,3
ЛДГ	0,84*	0,76*	0,93*	0,83*

* Достоверные значения коэффициента корреляции (P < 0,05).

В печени сигов из хвостохранилища был отмечен низкий уровень аэробного синтеза АТФ, о чем свидетельствовала низкая активность ферментов аэробного обмена ЦО и МДГ (см. табл. 2). Как известно, аэробный метаболизм имеет огромное значение для клеток печени. Это полифункциональный орган, здесь пересекаются метаболические пути углеводного, липидного и белкового обмена, синтезируются различные соединения для пластического обмена, осуществляются процессы детоксикации. Для выполнения такого большого числа функций необходим достаточный уровень АТФ, поэтому энергообеспечение клеток печени осуществляется главным образом за счет эффективного аэробного синтеза АТФ. В норме клетки печени содержат большое количество митохондрий, имеют высокую активность митохондриальных ферментов, в том числе ЦО и МДГ [Романенко, 1978; Goolish, Adelman, 1987]. Даже незначительное уменьшение интенсивности аэробного энергообеспечения клеток печени приводит к нарушению многих процессов их жизнедеятельности и снижению функциональной активности органа, что отрицательно сказывается на жизнедеятельности всего организма рыб, темпах его роста и способности адаптироваться к изменению условий окружающей среды.

Несмотря на более скудную и обедненную кормовую базу оз. Костомукшское по сравнению с кормовой базой оз. Каменное [Ильмаст и др., 2010], согласно данным гистологического анализа [Мурзина и др., 2011], в печени сигов из хвостохранилища наблюдалось жировое перерождение. Мы предполагаем, что это связано с низким уровнем аэробного окислительного метаболизма, так как невозможность полного окисления питательных веществ, поступающих с пищей, приводит к их накоплению и запасанию в виде липидов. Следует подчеркнуть, что важнейшим преимуществом аэробного метаболизма является возможность использования в нем различных энергетических субстратов – промежуточных продуктов распада белков, липидов, углеводов, что имеет огром-

ное значение при несбалансированном питании и приспособлении к условиям окружающей среды. Таким образом, низкий уровень аэробного синтеза АТФ в печени сигов из хвостохранилища делает невозможным достаточно эффективное и полноценное использование даже относительно небольшого количества поступающих с пищей веществ и приводит, с одной стороны, к дефициту энергии, а с другой – к избыточному накоплению липидов в печени.

Обменные процессы в печени сигов из неблагоприятного озера характеризовались также интенсивным метаболизмом углеводов, активным использованием их в энергетическом и пластическом обмене. Так, например, высокие значения активности альдолазы и ЛДГ по сравнению с таковыми в печени сигов из чистого озера (см. табл. 2) свидетельствовали об усилении их использования в процессах анаэробного энергообеспечения, а высокая активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы указывала на более высокий уровень пентозо-фосфатного пути окисления углеводов (см. табл. 2). Повышение активности Г-6-ФДГ печени рыб при токсическом воздействии на рыб отмечается во многих исследованиях [Konradt, Braunbeck, 2001; Venkataramana, Radhakrishnaiah, 2001]. Вероятно, высокие значения активности фермента связаны с увеличением потребности в эквивалентах НАДФН для восстановления глутатиона, участвующего в процессах детоксикации ксенобиотиков. Эти результаты согласуются с исследованием наших коллег, отмечавших высокую активность глутатион S-трансферазы, фермента системы биотрансформации ксенобиотиков, в печени сигов из хвостохранилища [Борвинская и др., 2011]. Сходные результаты по положительной зависимости активностей ферментов Г6ФДГ и глутатион S-трансферазы отмечены и для других видов рыб, в частности для карпа *Cyprinus Carpio*, обитающего в условиях антропогенного загрязнения вод [Sahan et al., 2010].

В почках сигов из хвостохранилища активность всех исследуемых ферментов была ниже, чем в почках сигов из чистого водоема (см. табл. 2), что говорит о снижении в них энергетического обмена (как аэробного, так и анаэробного процессов синтеза АТФ), степени использования углеводов в энергетическом и пластическом обмене. В данном случае, возможно, имеет место серьезное нарушение метаболической и функциональной активности почек, что может быть вызвано сильным влиянием высокого уровня минерализации воды в хвостохранилище.

В жабрах сигов из хвостохранилища активность лактатдегидрогеназы была ниже, а цитохром *c* оксидазы выше по сравнению с рыбами из оз. Каменное (см. табл. 2). Так как активность альдолазы практически не изменялась, а ЛДГ снижалась (см. табл. 2), это указывало на то, что уровень использования углеводов в энергообмене жабр сига не изменялся, а происходило перераспределение степени использования углеводов между аэробным и анаэробным метаболизмом в сторону усиления аэробного синтеза АТФ. Это свидетельствует об интенсификации процесса аэробного энергетического обмена, направленной на усиление функционирования жаберного аппарата и повышение эффективности дыхания в данных неблагоприятных условиях [Gagnon, Holdway, 1999; Немова, 2005].

Таким образом, в органах сигов из техногенного водоема наблюдались серьезные различия в протекании ряда метаболических путей, однако значительных возрастных особенностей при этом не отмечено. Прежде всего, обращает на себя внимание снижение уровня одного из важнейших процессов – аэробного синтеза АТФ в мышцах, печени и почках рыб. Можно предположить, что сиги, обитающие в хвостохранилище, испытывают состояние гипоксии. Это может быть связано с низким уровнем поступления кислорода в организм рыб в результате нарушения функционирования клеток жаберного аппарата под прямым воздействием минеральных компонентов воды или оседания мелкодисперсной механической взвеси на жабрах, блокирующей поступление кислорода. Аэробный обмен служит основным источником энергии, высокий уровень которого отражается на проявлении активной жизнедеятельности организма, процессах роста и развития [Озернюк, 2000]. В связи с этим наблюдаемое снижение темпов роста сигов из хвостохранилища можно объяснить не только скудной кормовой базой, но и снижением общего уровня аэробного метаболизма и перераспределением использования углеводов в сторону ряда метаболических процессов, а именно на компенсаторные реакции анаэробного синтеза АТФ и пластический обмен.

Уровень экспрессии генов цитохром с оксидазы и лактатдегидрогеназы-А в белых мышцах сигов из сравниваемых озер

При сравнении уровня экспрессии генов цитохромоксидазы (*COX* IV) и лактатдегидрогеназы-А (*LDH-A)* в белых мышцах сигов из чистого озера и хвостохранилища были обнаружены некоторые возрастные особенности. Так, у сигов из оз. Костомукшское в возрасте 3+ по сравнению с контролем уровень экспрессии гена *COX* IV был существенно выше, а в возрасте 4+ изменение не наблюдалось (рис. 2). Как

известно, молекула цитохром *c* оксидазы состоит из 13 субъединиц: 3 основных каталитических (*COX* I, II, III), кодируемых митохондриальным геномом, и 10 минорных, которые кодируются ядерным геномом. Субъединица IV цитохром *c* оксидазы (ядерная) необходима для сборки структуры и аллостерической регуляции активности фермента [Duggan, 2010]. Согласно результатам у сигов 3+ при низкой активности ЦО в мышцах усиливается экспрессия генов. Можно предположить, что у сигов, испытывающих негативное влияние, по сравнению с рыбами из чистого оз. Каменное изменяется баланс процессов синтеза и распада белка в мышцах и требуется дополнительный синтез фермента. Возможно, имеет место прямое влияние компонентов воды на структуру фермента. У сигов 4+ данный эффект был выражен слабее: по сравнению с сигами из чистого водоема активность ЦО ниже, а уровень экспрессии гена *COX* IV не изменялся.

Что касается уровня экспрессии гена лактатдегидрогеназы анаэробной субъединицы А, то у сигов из оз. Костомукшское в возрасте 4+ он был значительно выше по сравнению с контролем (см. рис. 2). Возможно, что у сигов в возрасте 3+ наблюдаемое увеличение в активности ферментов обеспечивается механизмами регуляции на пост-транскрипционном уровне, тогда как у сигов 4+ также усиливается дополнительный синтез фермента (его анаэробной изоформы). Таким образом, наши результаты свидетельствуют о различиях в механизмах регуляции активности ферментов цитохром *c* оксидазы и лактатдегидрогеназы у разных возрастных групп сигов из хвостохранилища.

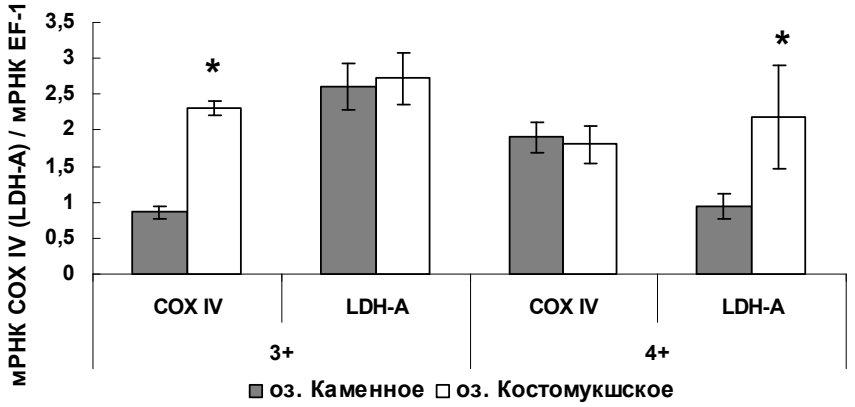


Рис. 2. Уровень экспрессии генов цитохромоксидазы (*COX IV)* и лактатдегидрогеназы – A_4 (*LDH-A)* в белых мышцах сигов возрастом 3+ и 4+ из озер Каменное и Костомукшское (M ± m)

Выводы

1. Показано, что значение индекса РНК/ДНК в белых мышцах у сигов из хвостохранилища ниже, чем у рыб из чистого озера, что указывает на низкий уровень синтеза белка в белых мышцах и снижение темпов роста рыб при неблагоприятном воздействии.

2. Установлено, что характерной реакцией обмена веществ ряда мышц, печени и почек рыб, обитающих в хвостохранилище, является снижение уровня их энергообеспечения, в частности уровня аэробного синтеза АТФ. При этом в мышцах и печени наблюдалась интенсификация процесса анаэробного синтеза АТФ, что являлось компенсаторным механизмом, направленным на частичное поддержание энергетического гомеостаза клеток этих органов.

3. Метаболизм печени сигов из неблагоприятного оз. Костомукшское характеризовался также интенсивным обменом углеводов, а именно усилением их использования в анаэробном процессе образования энергии и пентозофосфатном пути.

4. Установлен высокий уровень экспрессии генов *COX* IV у сигов 3+ и *LDH-A* у сигов 4+, что указывает на возрастные различия в механизмах регуляции активности ферментов цитохром *c* оксидазы и лактатдегидрогеназы у разных возрастных групп сигов из хвостохранилища.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований ОБН РАН «Биологические ресурсы России: оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга» на 2009–2011 гг., гранта Президента РФ НШ-3731.2010.4, РФФИ № 11-04-00167_а, проекта программы ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.» (№ г.к. 02.740.11.0700, № г.к. 14.740.11.1034, проект НК-28 (12).

Литература

Борвинская Е. В., Немова Н. Н., Смирнов Л. П. Глутатион-S-трансфераза у рыб северных водоемов: влияние минерализации водной среды // Доклады Академии наук. 2011. Т. 436, № 4. С. 566–568.

Ильмаст Н. В., Стерлигова О. П., Кучко Я. А. Биология сига костомукшского хвостохранилища (Республика Карелия) // Экологические проблемы северных регионов и пути их решения: мат. III Всерос. конф. с междунар. участием. Ч. I (Апатиты 4–8 октября, 2010 г.). Апатиты, 2010. 228 с.

Колб В. Г., Камышников В. С. Клиническая биохимия. Минск, 1976. 311 с.

Коросов А. В., Горбач В. В. Компьютерная обработка биологических данных: метод. пособие. Петрозаводск: ПетрГУ, 2007. 76 с.

Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа, 1980. 272 с.

Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир. 1984. 480 с.

Мещерякова О. В., Груздев А. И., Немова Н. Н. Сравнительная энзиматическая оценка углеводного обмена окуней *Perca fluviatilis* L. из водоемов с различным уровнем содержания гуминовых кислот // Известия РАН. Сер. биологическая. 2004. № 1. С. 21–26.

Моисеенко Т. И. Водная экотоксикология: Теоретические и прикладные аспекты. М.: Наука. 2009. 400 с.

Мурзина С. А., Нефедова З.А., Немова Н.Н. Использование гистологических методов анализа печени рыб для оценки влияния техногенных вод горнообогатительного комбината (ГОКа) // J. Internat. Scient. Publication: Ecology and safety. 2011. Vol. 4. Part 2. (в печати).

Немова Н. Н. Биохимические эффекты накопления ртути у рыб. М.: Наука, 2005. 157 с.

Немова Н. Н., Высоцкая Р. У. Биохимическая индикация состояния рыб. М.: Наука, 2004. 215 с.

Озернюк Н. Д. Биоэнергетика онтогенеза. М.: изд-во МГУ, 2000. 259 с.

Романенко В. Д. Печень и регуляция промежуточного обмена. Киев: Наукова думка, 1978. 184 с.

Состояние водных объектов Республики Карелия. По результатам мониторинга 1998–2006 гг. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. 210 с.

Aljanabi S. M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucleic Acid Res. 1997. Vol. 25. P. 4692–4693.

Audet D., Couture P. Seasonal variations in tissue metabolic capacities of yellow perch (*Perca flavescens*) from clean and metal-contaminated environments // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 2003. Vol. 60. P. 269–278.

Chomczynski P., Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal. Biochem. 1987. Vol. 162. P. 156–159.

Duggan A. Control of cytochrome c oxidase biosynthesis in the thermal remodeling of white muscle of two cyprinid minnows. M.S. thesis. Kingston: Ontario, 2010.

Gagnon D. F., Holdway A. I. Respiratory functional activity of gills of some fish species at toxic effect // Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem Mol. Biol. 1999. Vol. 120. P. 256–266.

Gahr S. A., Vallejo R. L., Weber G. M. et al. Effects of short-term growth hormone treatment on liver and muscle transcriptomes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Physiol. Genomics. 2008. Vol. 32. P. 380–392.

Goolish E. M., Adelman I. R. Tissue specific cytochrome c oxidase activity in largemouth bass: the metabolic cost of feeding and growth // Physiol. Zoology. 1987. Vol. 60. P. 454–464.

Grant G. C. RNA-DNA ratios in white muscle tissue biopsies reflect recent growth rates of adulr brown trout // J. Fish Biol. 1996. N 48. P. 1223–1230.

Konradt J., Braunbeck T. Alterations of selected metabolic enzymes in sh following long-term exposure to contaminated streams // J. Aquatic Ecosyst. Stress and Recov. 2001. Vol. 8. P. 299–318.

Mankiewicz-Boczek J., Kaczkowski Z., Godowska M., Zalewski M. RNA/DNA ratio as an indicator of the impact of long-term accumulative contamination for the assessment of river degradation – a pilot study // Ecohydrol. and Hydrobiol. 2010. P I–VIII. URL: http://versita.metapress.com/content/c906680500771684/ (дата обращения: 15.03.2011).

Merrit T. J. S., Quattro J. M. Evolution of the vertebrate cytosolic malate dehydrogenase gene family: duplication and divergence in actinopterygian fish // J. Mol. Evol. 2003. Vol. 56. P. 265–276.

Mohapatra B. C., Noble A. RNA-DNA ratio as indicator of stress in fish // Comp. Physiol. Ecol. 1992. Vol. 17. P. 41–47.

Richards J. G. Metabolic and Molecular Responses of Fish to Hypoxia // Fish Physiol. Vol. 27. Hypoxia / Eds.: Richards J.G., Farrell A.P., Brauner C.J. San Diego: Elsevier, 2009. P. 443–485.

Sahan A., Kurutas E. B., Altun T. The determination of biochemical indicators (biomarkers) in the common carp (*Cyprinus carpio*) to the physico-chemical parameters of the Ceyhan River (Adana-Turkey) // Ekoloji. 2010. Vol. 19. P. 8–14.

Smith L. Spectrophotometric assay of cytochrome *c* oxidase // Methods Biochem. Analysis. 1955. Vol. 2. P. 427–434.

Varo I., Nunes B., Amat F. et al. Effect of sublethal concentrations of copper sulphate on seabream *Sparus aurata* fingerlings // Aquat. Living Resour. 2007. Vol. 20. P. 263–270.

Venkataramana P., Radhakrishnaiah K. Copper-influenced changes in lactate dehydrogenase and G-6-PDH activities of the freshwater teleost, *Labeo rohita* // Bul. Environ Contam. Toxicol. 2001. Vol. 67. P. 257–263.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Чурова Мария Викторовна
младший научный сотрудник
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: mchurova@yandex.ru
тел. (8142) 571879

Мещерякова Ольга Владимировна
старший научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: mesch@krc.karelia.ru
тел. (8142) 571879

Ильмаст Николай Васильевич
ведущий научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: ilmast@krc.karelia.ru
тел. (8142) 571879

Немова Нина Николаевна
директор ИБ КарНЦ РАН, зав. лаб. экологической биохимии, д.б.н., проф., чл.-корр. РАН
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: nemova@krc.karelia.ru
тел. (8142) 783615

Churova, Maria
Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: mchurova@yandex.ru
tel. (8142) 571879

Mescheryakova, Olga
Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: mesch@krc.karelia.ru
tel. (8142) 571879

Ilmast, Nikolai
Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: ilmast@krc.karelia.ru
tel. (8142) 571879

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

Труды Карельского научного центра РАН
№ 3. 2011. С. 146–147.

ХРОНИКА

IX СИМПОЗИУМ РОССИЙСКОГО ОБЩЕСТВА НЕМАТОЛОГОВ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «НЕМАТОДЫ ЕСТЕСТВЕННЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ЭКОСИСТЕМ» (Петрозаводск, 27 июня – 1 июля 2011 г.)

ИБ КарНЦ РАН совместно с Центром паразитологии ИПЭЭ РАН и ИБМ ДВО РАН с **27 июня по 1 июля 2011 г.** провел **IX симпозиум Российского общества нематологов с международным участием «Нематоды естественных и трансформированных экосистем»**.

Нематоды, относящиеся ко второму по числу видов классу царства животных, представлены паразитическими и свободноживущими формами. Отдельные виды нематод стали модельными объектами в современной биологии, изучение которых привело к открытию ряда фундаментальных биологических закономерностей и механизмов жизнедеятельности организмов (Нобелевская премия 2002 г. Бреннера, Хорвица и Сальстона присуждена за открытие программируемой клеточной смерти, которое было сделано на свободноживущей нематоде *Caenorhabditis elegans*). Можно также отметить, что и присвоение двух других нобелевских премий по физиологии и медицине было непосредственно связано с *Caenorhabditis elegans* – в 2006 г. за открытие РНК-интерференции и в 2008 г. за разработку методов использования сигнального протеина с зеленой флуоресценцией (GFP). *C. elegans* был основным объектом исследований по этим большим проектам.

В нашей стране это направление также активно развивается. Накоплен большой теоретический и практический опыт в этой области, который активно обсуждается на научных мероприятиях различного статуса в России и за рубежом. Исследователи-нематологи являются членами созданного в 1994 г. Российского общества нематологов (РОН), представляющего собой неформальное профессиональное объединение всех специалистов, работающих в России и СНГ. За прошедший период организационная работа РОН показала свою несомненную успешность.

Международные симпозиумы, проводимые Российским обществом нематологов, являются основным форумом нематологов из России и стран СНГ. Важность таких симпозиумов, где обсуждаются основные вопросы экологии популяций, филогении и таксономии нематод, новые методы их изучения и идентификации, прикладные вопросы нематологии, не вызывает сомнений. В связи с этим в них активно участвуют исследователи из научных организаций РАН, практики из прикладных научно-исследовательских институтов и производственных организаций, педагоги из вузов России, специалисты из научных организаций ближнего и дальнего зарубежья. К настоящему времени уже проведено восемь нематологических симпозиумов с активным участием коллег из зарубежных стран, что способствует установлению тесных рабочих контактов.

В ходе работы IX Международного нематологического симпозиума были рассмотрены теоретические и прикладные проблемы современной нематологии, специалисты ознакомились с последними достижениями в различных областях нематологии. Отдельное внимание на симпозиуме было уделено молодым ис-

следователям. Они выступили с докладами и стендовыми сообщениями о своей научной работе, обсудили ее результаты с известными отечественными и зарубежными специалистами в данной области, прослушали лекции по теоретической нематологии, посетили практические занятия по прикладной нематологии. Особое внимание к молодежи обусловлено тем фактом, что резко сократилось число аспирантов, изучающих нематологию. В связи с этим необходима широкая просветительская работа среди студентов, привлечение их к научным исследованиям в области нематологической и смежных наук. Оргкомитетом было принято решение в рамках симпозиума провести научную школу-семинар по теоретической и прикладной нематологии для молодых ученых, аспирантов и студентов Эколого-биологического учебно-научного центра при ИБ КарНЦ РАН. С ознакомительными лекциями по различным направлениям исследований нематод и применяемым методикам выступили ведущие ученые России. Лекции изданы в виде учебно-методического пособия «Краткий спецкурс по нематологии». Были организованы практические занятия по прикладным вопросам нематологии.

В работе симпозиума приняли участие свыше 70 исследователей – нематологов из ведущих нематологических центров России, стран СНГ и зарубежных стран (Бельгия, Великобритания, Германия, Египет, Иран, Япония, Сербия и др.), 20 студентов, аспирантов, молодых ученых.

Симпозиум является плановым научным мероприятием Отделения биологических наук РАН и проведен при финансовой поддержке ОБН РАН, программы целевых расходов Президиума РАН, РФФИ.

Сопредседатель оргкомитета
Е. М. Матвеева

V РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ» (Петрозаводск, 8–12 августа 2011 г.)

Российская академия наук, Президиум РАН, Отделение биологических наук РАН, Научный совет РАН по биоорганической химии, учреждения Российской академии наук: Институт биологии Карельского научного центра, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Петрозаводский государственный университет **с 8 по 12 августа 2011 г**. проводят **V Российский симпозиум «Белки и пептиды»** (380 участников), в рамках которого будет организована школа молодых ученых (150 чел.). В 2003 г. по инициативе академиков В.Т. Иванова и Н.Ф. Мясоедова была возрождена традиция регулярно проводившихся в 80–90-х гг. прошлого века «пептидных» конференций. На IV симпозиуме, состоявшемся в г. Казани, было принято решение провести следующий V симпозиум в г. Петрозаводске. Ученые и специалисты из ведущих регионов, в которых к настоящему времени активно развиваются инновационные и научно-образовательные процессы (Москва, Санкт-Петербург, Казань, Томск, Новосибирск и др.), представят научные доклады и прочитают лекции для студентов, аспирантов и молодых ученых. Тематика планируемого мероприятия входит в перечень задач, решаемых в рамках **ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 гг.»** по приоритетному направлению реализации программы **«Живые системы»** в разделах критических технологий Российской Федерации – **«Клеточные технологии»** и **«Биомедицинские и ветеринарные технологии жизнеобеспечения и защиты человека и животных»**.

Основная цель симпозиума – ознакомление с последними достижениями фундаментальных и прикладных исследований в области современной химии и биологии белков и пептидов, а также новыми методами; выявление наиболее важных направлений в изучении структуры, функционирования и применения белков и пептидов; обсуждение возможных путей внедрения результатов научных исследований в практику био- и медицинских технологий, в том числе при создании новых лекарственных средств; установление более тесных контактов между учеными ведущих научных центров страны. Кроме того, важная задача симпозиума – привлечение молодых ученых к активной научной деятельности, повышение их профессионального уровня, вовлечение молодых ученых в систему информационного обмена, формирование у них навыков представления результатов и участия в научной дискуссии с целью подготовки квалифицированных научно-технических кадров в этой области. В рамках симпозиума планируется интегрировать опыт и новые подходы к созданию объектов инновационной инфраструктуры при использовании результатов исследований белков и пептидов в ведущих российских институтах, вузах и научно-образовательных центрах.

Симпозиум организован при финансовой поддержке Президиума Российской академии наук, Отделения биологических наук РАН, Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 11-04-06042. Генеральный спонсор симпозиума – ООО «ГЕРОФАРМ» (г. Санкт-Петербург). Кроме того, спонсорскую помощь оказывают ЗАО «Инновационный научно-производственный центр “Пептоген”» (г. Москва), ООО «ПЕПТОС ФАРМА» (г. Москва), ЗАО «ДжиИ Хэлскеа» (г. Москва), Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН (г. Санкт-Петербург), ООО «Спектроника» (г. Москва).

Открытие симпозиума состоится **8 августа 2011 г.** в 9.30 в конференц-зале Петрозаводского государственного университета по адресу: г. Петрозаводск, пр. Ленина, 33.

Сопредседатель оргкомитета
Н. Н. Немова

Труды Карельского научного центра РАН
№ 3. 2011. С. 149–152.

ЮБИЛЕИ И ДАТЫ

НИКОЛАЙ НИКОЛАЕВИЧ ТЮТЮННИК
(к 70-летию со дня рождения)

15 января 2011 г. исполнилось 70 лет заслуженному деятелю науки Республики Карелия, доктору сельскохозяйственных наук, профессору Николаю Николаевичу Тютюннику.

Он родился в 1941 г. в с. Петровцы Миргородского района Полтавской области. Еще в студенческие годы, обучаясь в Петрозаводском государственном университете, проявил интерес к научным исследованиям. Под руководством профессора В.А. Берестова в 1968 г. защитил дипломную работу «Особенности белкового, углеводного и жирового обмена у норок, песцов и лисиц». После окончания учебы в университете он был направлен на работу в отдел звероводства Карельской государственной опытной станции в качестве научного сотрудника. В 1972 г. избран по конкурсу в лабораторию физиологии пушных зверей ИБ КФ АН СССР. Здесь он окончил заочную аспирантуру и в 1974 г. защитил кандидатскую диссертацию «Использование морфологических и биохимических тестов для оценки питательных достоинств применяемых в звероводстве кормов». В 1980–1988 гг. Н.Н. Тютюнник работал заместителем директора по научной работе, в 1988–2008 гг. – заведующим лабораторией экологической физиологии животных ИБ КарНЦ РАН. В 2002 г. он защитил докторскую диссертацию «Физиолого-биохимический статус организма норок (*Mustela vison* Schr.) и песцов (*Alopex lagopus* L.) и пути его оптимизации».

Основные научные исследования Н.Н. Тютюнника связаны с изучением влияния факторов среды на организм млекопитающих, познанием структурных и функциональных механизмов адаптивных процессов. Разработка этого направления крайне важна в отношении хищных пушных зверей и грызунов, разводимых в неволе, где условия жизни значительно отличаются от природных. Неотъемлемой частью этих исследований является поиск средств обеспечения оптимального функционирования организма. Под научным руководством Н.Н. Тютюнника проведены комплексные исследования новых видов кормов и

кормовых добавок, изучался минеральный состав волосяного покрова, гормональный, энзиматический и витаминный статус пушных зверей в норме и патологии. Выявлены закономерности адаптивных перестроек в организме хищных пушных зверей в ответ на воздействие различных факторов среды. Многолетние исследования явились основой для разработки системы мониторинга за состоянием здоровья животных, введенных в зоокультуру, и его оптимизации, в том числе и с использованием ряда биологически активных веществ.

Н.Н. Тютюнник является автором более 300 научных и научно-методических работ. Он получил три авторских свидетельства и три патента, разработал ряд методических пособий и рекомендаций, направленных на совершенствование способов кормления и оптимизацию физиологического состояния пушных зверей. Практические разработки с его участием были представлены на III Московском международном салоне инноваций и инвестиций 4–7 февраля 2003 г., VII Московском международном салоне промышленной собственности «Архимед» в 2004 г., 1-й межрегиональной выставке «Инновации Европейскому Северу» в Петрозаводске в 2005 г., а также в г. Санкт-Петербурге на VII Международном форуме «Биотехнология и современность» в 2006 г.

Наряду с научно-исследовательской работой большое внимание Н.Н. Тютюнник уделяет подготовке научных кадров высшей квалификации и научно-организационной деятельности – под его руководством защищено пять кандидатских диссертаций. В течение ряда лет он председатель государственной аттестационной комиссии Петрозаводского госуниверситета по специальности «Зоотехния», руководитель филиала кафедры зоотехнии агротехнического факультета ПетрГУ в Институте биологии КарНЦ РАН, член Ученого совета Института биологии, член Объединенного диссертационного совета по защите докторских диссертаций при КГПА – специальности «Биохимия» и «Физиология», инициатор и организатор четырех международных симпозиумов.

За плодотворную научную и научно-организационную деятельность Н.Н. Тютюнник награжден почетными грамотами Совета Министров РК, Исполкома Петрозаводского городского Совета народных депутатов, КарНЦ РАН и Министерства сельского хозяйства Карелии, медалью «Ветеран труда». Ему присвоено почетное звание «Заслуженный деятель науки Республики Карелия» и ученое звание профессора по специальности «Физиология».

Поздравляем Николая Николаевича с юбилеем, желаем крепкого здоровья, исполнения всех ближних и дальних творческих задумок, любознательных и инициативных учеников, счастья и надежных друзей!

В. А. Илюха

СПИСОК ОСНОВНЫХ НАУЧНЫХ ТРУДОВ Н.Н. ТЮТЮННИКА

1967. Гематологические показатели углеводно-жирового обмена у пушных зверей // Уч. записки Петрозаводского ун-та. Т. XV, вып. 4. С. 24–38. (Совместно с В. А. Берестовым.)

1971. Уровень липидов, холестерина и липопротеидов в сыворотке крови пушных зверей // Уч. записки Петрозаводского ун-та. Т. XVII, вып. 4. С. 21–29. (Совместно с В. А. Берестовым.)

1972. Изменение биохимических показателей крови телят в период постнатального онтогенеза // Научные труды. СЗНИИСХ, вып. XXII. Животноводство. С. 126–134. (Совместно с А. Н. Мелькиной, В. Т. Графовой.)

Морфо-биохимический состав крови норок, содержащихся на рационах с различным уровнем минтая // Уч. записки Петрозаводского ун-та. Т. XIX, вып. 5. С. 22–33.

1979. Способ кормления пушных зверей. Автор. свидетельство № 682218. (Совместно с В. А. Берестовым, Г. Г. Петровой, С.П.Изотовой, С.А. Черноморским, Т. В. Никитиной.)

1980. Способ кормления пушных зверей. Автор. свидетельство № 733617. (Совместно с В. А. Берестовым, Г. Г. Петровой, С. П. Изотовой и др.)

1984. Минеральный состав волосяного покрова норок и песцов. Петрозаводск: Карелия. 158 с. (Совместно с В. А. Берестовым, Н. В. Тюрниной.)

Stress problems on fur farms and the ways of their solving // Scientifur. Vol. 8, N 2. P. 107–112. (Совместно с L. K. Kozhevnikova, V. A. Berestov.)

Способ выращивания молодняка пушных зверей. Автор. свидетельство № 1124467. (Совместно с Л. Ф. Адигамовым, В. А. Берестовым, М. П. Черниковым, В. В. Баевым.)

1987. Гормональная функция половых желез у некоторых видов пушных зверей // Очерки по физиологии пушных зверей / Под ред. В. А. Берестова. Л.: Наука. С. 156–184. (Совместно с О. Н. Савченко, Л. Н. Сироткиной.)

1990. Endocrine ovarian function in mink (*Mustela vison*) and blue fox (*Alopex lagopus*) during the anestrous and reproductive season // Scientifur. Vol. 14, N 4. P. 259–262. (Совместно с L. N. Sirotkina, O. N. Sawchenko.)

1993. Средство для улучшения качества меха норок. Патент № 150704 ХРП от 01.04.1993 г. (Совместно с Л. К. Кожевниковой, М. Н. Бадовской, М.Н Кондрашовой и др.)

1994. Some blood indices of mink nanism // Scientifur Vol. 18, N 3. P. 157–160. (Совместно с L. B. Uzenbaeva.)

Effekt of fat and carbohydrate diet on digestive enzyme activity in mink blood and organs // Scientifur. Vol. 18, N 4. P. 277–280. (Совместно с V. M. Oleinik.)

Способ отбора самок норок для воспроизводства. Решение о выдаче патента от 14.10.94 г. (Совместно с Г. М. Малининой.)

1995. Показатели крови при карликовости у норок // Кролиководство и звероводство. №3. С. 24 (Совместно с Л. Б.Узенбаевой.)

Витамин А в организме норок в различные биологические периоды // Кролиководство и звероводство. № 4. С. 9–10. (Совместно с Г. Г. Петровой, Т. Р. Руоколайнен, И. И. Григович, Т. Н. Ильиной.)

1996. Биохимическое тестирование как способ оценки физиологического состояния пушных зверей, разводимых в промышленных комплексах // С.-х. биология. № 2. С. 39–50. (Совместно с Л. К. Кожевниковой.)

Seasonal variation in the isoenzymatic profile of lactate dehydrogenase in organs of farm mink and polar foxes // Scientifur. Vol. 20, N 1. P. 54–60. (Совместно с L. K. Kozhevnikova, H. I. Meldo, A. R. Unzhakov.)

Succinic acid as a stimulator of physiological processes and productivity in farm mink // Scientifur. Vol. 20, N 1. P. 85–91. (Совместно с L. K. Kozhevnikova, H. I. Meldo A. R. Unzhakov, M. N. Kondrashova, L. A. Badovskaja.)

1997. Биохимический мониторинг норок в период лактации // Ветеринария. № 2. С. 48–51. (Совместно с Л. К. Кожевниковой, В. А. Илюхой, Л. Б. Узенбаевой, Х. И. Мелдо.)

Specificity of Metabolic characteristics of farm-bred white mink // Scientifur. Vol. 21, N 4. P. 265–269. (Совместно с L. K. Kozhevnikova, V. A. Ilyukha, A. R. Unzhakov, H. J. Meldo.)

1998. Изменения изоферментного спектра лактатдегидрогеназы органов норок при алеутской болезни норок // Ветеринария. № 4. С. 24–27. (Совместно с Л. К. Кожевниковой, А. Р. Унжаковым, Х. И. Мелдо.)

1999. Оптимизация физиологического состояния и продуктивности норок янтарной кислотой // С.-х. биология. №4. С. 51–56. (Совместно с Л. К. Кожевниковой, Х. И. Мелдо, М. К. Кондрашовой, Л. А. Бадовской, А. Р. Унжаковым.)

Эффект гидролизата из мидий при алеутской болезни норок // Вопр. вирусологии. Т. 44, № 1. С. 32–35. (Совместно с Л. Б. Узенбаевой, В. А. Илюхой, Х. И. Мелдо, А. Р. Унжаковым.)

Гормональная функция щитовидной железы, коры надпочечников и гонад пушных зверей в период постнатального онтогенеза и репродукции // С.-х. биология. №6. С. 93–99. (Совместно с Л. Н.Сироткиной.)

Лабиринты биоэтики // Философия науки. Научное издание по философии, методологии и логике естественных наук. №2 (6). С. 41–50. (Совместно с Н. А. Балакиревым, Б. Барабашем, Е. М. Колдаевой и др.)

2000. Изоферменты лактатдегидрогеназы при сезонных адаптациях хищных пушных зверей // Журн. эволюц. биохим. и физиол. Т. 36, № 1. С. 24–29. (Совместно с Л. К. Кожевниковой, А. Р. Унжаковым, Х. И. Мелдо.)

Специфические показатели профиля тиамина у норок в условиях его недостаточности // Ветеринария. № 3. С. 45–49. (Совместно с Г. Г. Петровой, Т. Н. Ильиной.)

2001. Активность ферментов пищеварительных желез в крови у норок и песцов в течение года // С.-х. биология. № 4. С. 15–18. (Совместно с В. М. Олейником, Е. Б. Свечкиной.)

Характеристика статуса тиамина у норок в условиях развития его дефицита // С.-х. биология. №6. С. 67–72. (Совместно с Г. Г. Петровой, Т. Н. Ильиной, И. П. Черникевичем.)

2002. Изоферментные спектры лактатдегидрогеназы органов норок и песцов в постнатальном развитии // Онтогенез. Т. 33, №3. С. 218–224. (Совместно с Л. К. Кожевниковой, А. Р. Унжаковым, Х. И. Мелдо.)

Обмен веществ и физиолого-биохимический статус норок под влиянием генно-инженерного соматотропного гормона // С.-х. биология. № 4. С. 66–73. (Совместно с Л. К. Эрнстом, Л. Ф. Адигамовым, Л. Н. Сироткиной и др.)

Комплекс активирующих факторів імунітету – засіб підвищення продуктивності молодняку норок // Науковый вісник національного аграрного університету. Киев. № 55. С. 234–236. (Совместно с А. М. Никитенко.)

Янтарная кислота как стимулятор // Кролиководство и звероводство. № 4. С. 7–8. (Совместно с Л. К. Кожевниковой М. Н. Кондрашовой, Л. А. Бадовской и др.)

2003. Тиреоидные гормоны и активность лизосомальных протеолитических ферментов в органах песца *Alopex lagopus* // Журн. эволюц. биохим. и физиол. Т. 39, № 3. С. 234–236. (Совместно с Н. Л. Рендаковым, Л. Н. Сироткиной, М. Ю. Крупновой, Н. Н. Немовой.)

Thiamine status in mink blood under alimentary hypovitaminosis B1 after feeding thiaminase-containing fish // Scientifur. Vol. 26, N 4. P. 106–111. (Совместно с G. G. Petrova, T. N. Ilyina, I. P. Chernikevich, H. I. Meldo.)

Средство для улучшения качества пушнины песцов. Патент №2198539 от 20 февраля 2003 г. (Совместно с Ю. К. Калининым, А. Р. Унжаковым, Х. И. Мелдо и др.)

2004. Видовая специфичность изоферментных профилей лактатдегидрогеназы органов грызунов различного экогенеза // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. Т. 90, №2. С. 187–192. (Совместно с Л. К. Кожевниковой, А. Р. Унжаковым, Х. И. Мелдо.)

Влияние кратковременного полного голодания на физиологическое состояние песцов // Вестник РАСХН. № 3. С. 63–66. (Совместно с А. Р. Унжаковым, Л. К. Кожевниковой, Х. И. Мелдо, Н. А. Балакиревым.)

2005. Изоферментные спектры лактатдегидрогеназы органов пушных зверей различного экогенеза // Журн. эволюц. биохим. и физиол. Т. 41, № 3. С. 240–246. (Совместно с Л. К. Кожевниковой, А. Р. Унжаковым, Х. И. Мелдо.)

Влияние различных режимов освещения, мелатонина и эпиталона на активность лизосомальных протеиназ в печени и почках крыс // Медицинский академический журнал. Т. 5, №3. Прил. 7. С. 33–35. (Совместно с Н. Л. Рендаковым.)

Влияние световых режимов на возрастные изменения активности панкреатической и кишечной амилаз крыс // Медицинский академический журнал. Т. 5, №3. Прил. 7. С. 35–36. (Совместно с Е. Б. Свечкиной.)

2006. Влияние возраста, различных режимов освещения, мелатонина и эпиталона на активность лизосомальных протеиназ в печени и почках крыс // Успехи геронтологии. Вып. 19. С. 72–79. (Совместно с Н. Л. Рендаковым, И. А. Виноградовой.)

Влияние световых режимов и геропротекторов на активность панкреатической и кишечной амилаз у крыс разного возраста // Успехи геронтологии. Вып. 19. С. 66–72. (Совместно с Е. Б. Свечкиной, И. А. Виноградовой.)

2007. Особенности структуры лейкоцитов крови норок различных генотипов // Вестник ВОГиС. Т. 11, № 1. С. 155–161. (Совместно с Л. Б. Узенбаевой, А. Г. Голубевой, В. А. Илюхой.)

Специфичность изоферментных спектров ЛДГ у норок белого окраса // Вестник ВОГиС. Т. 11, № 1. С. 139–145. (Совместно с А. Р. Унжаковым, Л. К. Кожевниковой, В. А. Илюхой, Х. И. Мелдо.)

Активность пищеварительных ферментов в сыворотке крови норок различных генотипов // Вестник ВОГиС. Т. 11, № 1. С. 99–109. (Совместно с Е. Б. Свечкиной.)

Morphometric and cytochemical investigation of subcellular structure on sapphire mink leucocytes // Scientifur. Vol. 31, N 2. P. 49–53. (Совместно с L. B. Uzenbaeva, A. G. Golubeva, V. A. Ilukha, M. G. Nyuppieva.)

Морфофункциональные особенности лейкоцитов млекопитающих, разводимых в неволе в условиях Европейского Севера // Труды Карельского научного центра РАН. Вып. 11. С. 109–117. (Совместно с Л. Б. Узенбаевой, А. Г. Голубевой, В. А. Илюхой, С. А. Коросовым.)

Ecological adaptations of the nematode *Toxascaris leonina* (Linstow, 1902) Leiper, 1907 – parasite of predaceous mammals // Russian Journal of Nematology. Vol. 15, N 2. P. 162–163. (Совместно с L. V. Anikieva V. S. Anikanova.)

2009. Морфофункциональные особенности лейкоцитов млекопитающих, разводимых в неволе в условиях Европейского Севера // Информационный вестник ВОГиС. Т. 13, № 3. С. 571–577. (Совместно с Л. Б. Узенбаевой, А. Г. Голубевой, В. А. Илюхой.)

Содержание тиреоидных гормонов и активность лизосомальных протеиназ у песцов (Alopex lagopus) в условиях промышленной доместикации // Информационный вестник ВОГиС. Т. 13, № 3. С. 624–638. (Совместно с Н. Л. Рендаковым, Л. Н. Сироткиной, М. Ю. Крупновой, Н. Н. Немовой.)

Some biochemical effects of starvation in arctic blue foxes (*Alopex lagopus*) // Ann. Anim. Sci., Vol. 9, N 4. 425–434. (Совместно с A. Unzhakov, E. Svechkina, B. Barabas.)

Роль гуморальных факторов естественной защиты при токсаскаридозе песцов // Труды Карельского научного центра РАН. № 3. С. 4–7. (Совместно с Л. В. Аникиевой, В. С. Аникановой.)

Мутантные норки как модель в биомедицинских исследованиях // Труды Карельского научного центра РАН. № 3. С. 52–61. (Совместно с Л. Б. Узенбаевой, А. Г. Голубевой, В. А. Илюхой.)

2010. Дефект лейкоцитов у разводимых в неволе пушных зверей // Кролиководство и звероводство. № 4. С. 25–27. (Совместно с А. Г. Голубевой, Л. Б. Узенбаевой, В. А. Илюхой.)

Влияние витамина С на морфофункциональные и цитоэнзиматические показатели крови у норок с функциональным дефектом // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. № 4. С. 216–219. (Совместно с. А. Г. Кижиной, Л. Б. Узенбаевой, Е. Э. Антюковой, В. В. Илюхой.)

Труды Карельского научного центра РАН
№ 3. 2011. С. 153–155.

РЕЦЕНЗИИ И БИБЛИОГРАФИЯ

Лысенко Л. А., Немова Н. Н., Канцерова Н. П. Протеолитическая регуляция биологических процессов / Отв. ред. Н. Н. Немова. Петрозаводск: Карельский НЦ РАН, 2010. 312 с. Ил. 41. Библиогр. 653 назв.

Монография представляет собой обобщающее издание, основанное на анализе современной зарубежной, отечественной научной литературы и собственных данных авторов по вопросам структурно-функциональной организации, регуляции и биологической роли индивидуальных протеаз, протеолитических путей и каскадов. Рассмотрена роль указанных белков на различных уровнях функционирования живого – от молекулярных процессов до взаимодействия организма и среды обитания. Уделено внимание механизму протеолитической регуляции не только в норме, но и при развитии заболеваний, ассоциированных с наследственными или регуляторными дефектами протеаз.

Для исследователей в области биохимии, молекулярной и клеточной биологии, преподавателей высшей школы, а также может быть рекомендована в качестве учебного пособия для студентов и аспирантов биологических специальностей.

Lysenko L. A., Nemova N. N., Kantserova N. P. Proteolytic regulation of biological processes / Editor-in-Charge N. Nemova. Petrozavodsk: Karelian Research Centre RAS, 2010. 312 p.

The monograph represents a review based on the analysis of data from recent foreign and Russian scientific literature and the authors' own research concerning the structural and functional organization, regulation and the biological role of individual proteases, proteolytic pathways and cascades. The role of those proteins in a variety of processes in living organisms – from the molecular level to organism/environment interaction – is considered. We dwell upon the mechanism of proteolytic regulation both in the norm and in the case of diseases associated with hereditary or regulatory defects in proteases.

The book would be of interest to researchers working in biochemistry, molecular and cellular biology, university professors, and can also be recommended as a manual for graduate and post-graduate students of biological disciplines.

Фокина Н. Н., Нефедова З. А., Немова Н. Н. Липидный состав мидий *Mytilus edulis* L. Белого моря. Влияние некоторых факторов среды обитания / Отв. ред. Н. Н. Немова. Петрозаводск: Карельский НЦ РАН, 2010. 243 с. Ил. 49. Библиогр. 390 назв.

Монография представляет собой обзор собственных экспериментальных исследований и

имеющихся в мировой и отечественной литературе данных о биохимических механизмах адаптаций морских моллюсков, в особенности на уровне липидного состава, к основным факторам окружающей среды. Липиды благодаря большому спектру функций, выполняемых в организме, играют важную роль в процессах адаптации животных к различным воздействиям среды обитания. Наиболее подробно изучено влияние температуры на биохимические и физиологические процессы, происходящие в организме у водных животных. Наряду с температурным влиянием колебания солености морской воды, приливно-отливные циклы и антропогенное воздействие являются основными факторами среды обитания морских животных. Многочисленные исследования зарубежных и российских авторов, представленные в монографии, показали, что двустворчатые моллюски выработали набор адаптаций на различных уровнях организации к указанным факторам окружающей среды, при этом модификации липидного состава описаны в меньшей степени. Так, практически не изучены изменения на уровне запасных липидов у двустворчатых моллюсков в ответ на действие низких концентраций кислорода в морской воде, возникающих в прибрежной зоне моря во время отлива. Биохимические адаптации в ответ на действие различной солености морской воды, в том числе на уровне липидного метаболизма, описаны главным образом для осморегулирующих организмов, тогда как изучению компенсаторных изменений в составе липидов у осмоконформеров, к которым относятся двустворчатые моллюски *Mytilus edulis* L., посвящено сравнительно мало работ. При изучении влияния одного из основных загрязняющих факторов морской среды обитания – нефтепродуктов – основное внимание уделялось описанию роли запасных липидных компонентов, хотя известно, что не менее важное значение в процессах адаптации имеют структурные и физиологически активные липидные компоненты. Представленные в монографии собственные экспериментальные данные существенно дополняют общие представления о биохимических механизмах адаптаций на уровне липидного состава у двустворчатых моллюсков к действию различной солености морской воды, низких концентраций кислорода и загрязнению окружающей среды нефтепродуктами. Кроме того, монография включает подробное описание биологии мидии обыкновенной *Mytilus edulis* L. (1758), а также детальное рассмотрение липидного состава беломорских мидий из естественной среды обитания (в том числе описаны возрастные и экологические особенности состава липидов), что позволяет всестороннее оценить модификации состава липидов *Mytilus edulis* в ответ на действие некоторых факторов окружающей среды.

Fokina N. N., Nefedova Z. A., Nemova N. N. Lipid composition of mussels *Mytilus edulis* L. from the White Sea. Effect of some environmental factors / Editor-in-Charge N. Nemova. Petrozavodsk: Karelian Research Centre RAS, 2010. 243 p.

The book is a review of own experimental studies and data published globally and in Russia on the biochemical mechanisms of adaptation to major environmental factors in marine mollusks, particularly at the lipid composition level. Owing to a wide range of functions they perform in the organism lipids play an essential part in the adaptation of animals to various environmental impacts. A most thoroughly investigated aspect is the effect of temperature on biochemical and physiological processes in aquatic organisms. Other important environmental factors influencing marine organisms, alongside with temperature, are fluctuations in seawater salinity, tidal cycles, and human impact. Numerous studies by Russian and foreign authors mentioned in the book demonstrate that bivalves have developed a number of adaptations to the stated environmental factors at various organizational levels, but modifications in the lipid composition are least covered. E.g., changes in storage lipids in bivalves exposed to low oxygen concentrations in seawater in the littoral

zone during ebbing tide have hardly been studied at all. Biochemical adaptations in response to variations in seawater salinity, including modifications in the lipid metabolism, have been described mainly for osmoregulating organisms, and only relatively few papers dwell upon compensatory changes in the lipid composition in osmoconformers, such as *Mytilus edulis* L. The focus in studies of a major contaminating factor in the marine environment – oil products – has been on description of the role of storage lipid components, whereas we know that structural and physiologically active lipid components are equally important for adaptation. The authors' own experimental data presented in the monograph much expand the general understanding of the biochemical mechanisms of adaptation at the lipid composition level in bivalves in response to the action of different seawater salinities, low oxygen concentrations, and oil pollution. In addition, the monograph comprises a detailed description of the biology of the blue mussel *Mytilus edulis* L. (1758), as well as thoroughly considers the lipid composition of White Sea mussels from their natural environment (including an account of the age-related and ecological characteristics of the lipid composition), so that modifications in the lipid composition in *Mytilus edulis* in response to some environmental impacts can be comprehensively assessed.

ПРИЛОЖЕНИЕ
http://transactions.krc.karelia.ru

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

(требования к работам, представляемым к публикации
в «Трудах Карельского научного центра Российской академии наук»)

«Труды Карельского научного центра Российской академии наук» (далее – Труды КарНЦ РАН) публикуют результаты завершенных оригинальных исследований в различных областях современной науки: теоретические и обзорные статьи, сообщения, материалы о научных мероприятиях (симпозиумах, конференциях и др.), персоналии (юбилеи и даты, потери науки), статьи по истории науки. Представляемые работы должны содержать новые, ранее не публиковавшиеся данные.

Статьи проходят обязательное рецензирование. Решение о публикации принимается редакционной коллегией серии или тематического выпуска Трудов КарНЦ РАН после рецензирования, с учетом научной значимости и актуальности представленных материалов. Редколлегии серий и отдельных выпусков Трудов КарНЦ РАН оставляют за собой право возвращать без регистрации рукописи, не отвечающие настоящим правилам.

При получении редакцией рукопись регистрируется (в случае выполнения авторами основных правил ее оформления) и направляется на отзыв рецензентам. Отзыв состоит из ответов на типовые вопросы «Анкеты» и может содержать дополнительные расширенные комментарии. Кроме того, рецензент может вносить замечания и правки в текст рукописи. Авторам высылается электронная версия «Анкеты» и комментарии рецензентов. Доработанный экземпляр автор должен вернуть в редакцию вместе с первоначальным экземпляром и ответом на все вопросы рецензента не позднее чем через месяц после получения рецензии. Перед сдачей в печать авторам высылается распечатанная версия статьи, которая вычитывается, подписывается авторами и возвращается в редакцию.

Почтовый адрес редакции: 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11, КарНЦ РАН, редакция Трудов КарНЦ РАН. Телефон (8142) 780109.

Содержание номеров Трудов КарНЦ РАН и другая полезная информация, включая настоящие Правила, доступна на сайте http://transactions.krc.karelia.ru.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РУКОПИСИ

Статьи публикуются на русском или английском языке. Рукописи должны быть тщательно выверены и отредактированы авторами.

Статьи должны быть подписаны всеми авторами.

Объем рукописи (включая таблицы, список литературы, подписи к рисункам, рисунки) для серии «Экспериментальная биология» не должен превышать: для обзорных статей – 25 страниц, для оригинальных – 15, для сообщений – 8, для хроники и рецензий – 5–6. Объем рисунков не должен превышать 1/4 объема статьи. Рукописи большего объема (в исключительных случаях) принимаются при достаточном обосновании по согласованию с ответственным редактором.

Рукописи присылаются в электронном виде, а также в двух экземплярах, напечатанных на одной стороне листа формата А4 в одну колонку через 1,5 интервала (12 пунктов шрифта типа Times New Roman). Размер полей: сверху, снизу – 2,5 см, справа, слева – 2,5 см. Все страницы, включая список литературы и подписи к рисункам, должны иметь сплошную нумерацию в нижнем правом углу. Страницы с рисунками не нумеруются.

ОБЩИЙ ПОРЯДОК РАСПОЛОЖЕНИЯ ЧАСТЕЙ СТАТЬИ

Элементы статьи должны располагаться в следующем порядке: *УДК* курсивом на первой странице, в левом верхнем углу; заглавие статьи на русском языке заглавными буквами полужирным шрифтом; инициалы, фамилии всех авторов на русском языке полужирным шрифтом; полное название организации – место работы каждого автора в именительном падеже на русском языке курсивом (если авторов несколько и работают они в разных учреждениях, то следует отметить арабскими цифрами соответствие фамилий авторов учреждениям, в которых они работают; если все авторы статьи работают в одном учреждении, можно не указывать место работы каждого автора отдельно); аннотация на русском языке; ключевые слова на русском языке; инициалы, фамилии всех авторов на английском языке полужирным шрифтом; название статьи на английском языке заглавными буквами полужирным шрифтом; аннотация на английском языке; ключевые слова на английском языке; текст статьи (статьи экспериментального характера, как правило, должны иметь разделы: ВВЕДЕНИЕ. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. ВЫВОДЫ. ЛИТЕРАТУРА); благодарности; литература (с новой страницы); таблицы (на отдельном листе); рисунки (на отдельном листе); подписи к рисункам (на отдельном листе).

На отдельном листе дополнительные сведения об авторах: фамилия, имя, отчество всех авторов полностью на русском и английском языках; полный почтовый адрес каждой организации (страна, город) на русском и английском языках; должности авторов; адрес электронной почты для каждого автора; телефон для контактов с авторами статьи (можно один на всех авторов).

ЗАГЛАВИЕ СТАТЬИ должно точно отражать содержание статьи[*1] и содержать не более 8–10 значащих слов.

АННОТАЦИЯ должна быть лишена вводных фраз, содержать только главную информацию статьи, не превышать объем – 15 строк.

Отдельной строкой приводится перечень КЛЮЧЕВЫХ СЛОВ. Ключевые слова или словосочетания отделяются друг от друга запятой, в конце фразы ставится точка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ должны содержать сведения об объекте исследования с обязательным указанием латинских названий и сводок, по которым они приводятся, авторов классификаций и пр. Транскрипция географических названий должна соответствовать атласу последнего года издания. Единицы физических величин приводятся по Международной системе СИ. Желательна статистическая обработка всех количественных данных. Необходимо возможно точнее обозначать местонахождения (в идеале – с точным указанием географических координат).

ИЗЛОЖЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ должно заключаться не в пересказе содержания таблиц и графиков, а в выявлении следующих из них закономерностей. Автор должен сравнить полученную им информацию с имеющейся в литературе и показать, в чем заключается ее новизна. Для фаунистических и флористических работ следует указывать место хранения коллекционных образцов. Если в статье приводятся сведения о новых для исследованной территории таксонах, то желательно и процитировать этикетку. Следует ссылаться на табличный и иллюстративный материал так: на рисунки, фотографии и таблицы в тексте (рис. 1, рис. 2, табл. 1, табл. 2 и т. д.), фотографии, помещаемые на вклейках (рис. I, рис. II). Обсуждение завершается формулировкой основного вывода, которая должна содержать конкретный ответ на вопрос, поставленный во Введении. Ссылки на литературу в тексте даются фамилиями, например: Карху, 1990 (один автор); Раменская, Андреева, 1982 (два автора); Крутов и др., 2008 (три автора или более), и заключаются в квадратные скобки. При перечислении нескольких источников работы располагаются в хронологическом порядке, например: [Иванов, Топоров, 1965; Успенский, 1982; Erwin et al., 1989; Рыбаков, 1994; Longman, 2001].

ТАБЛИЦЫ нумеруются в порядке упоминания их в тексте, каждая таблица имеет свой заголовок. На полях рукописи (слева) карандашом указываются места расположения таблиц при первом упоминании их в тексте. Диаграммы и графики не должны дублировать таблицы. Материал таблиц должен быть понятен без дополнительного обращения к тексту. Все сокращения, использованные в таблице, должны быть пояснены в Примечании, расположенном под ней. При повторении цифр в столбцах нужно их повторять, при повторении слов – в столбцах ставить кавычки. Таблицы могут быть книжной или альбомной ориентации (при соблюдении вышеуказанных параметров страницы).

РИСУНКИ представляются отдельными файлами с расширением TIFF (*.TIF) или JPG (не встраивать в Word). Графические материалы должны быть снабжены распечатками с указанием желательного размера рисунка в книге, пожеланий и требований к конкретным иллюстрациям. На каждый рисунок должна быть как минимум одна ссылка в тексте. Иллюстрации объектов, исследованных с помощью фотосъемки, микроскопа (оптического, электронного трансмиссионного и сканирующего), должны сопровождаться масштабными линейками, причем в подрисуночных подписях надо указать длину линейки. Приводить данные о кратности увеличения необязательно, поскольку при публикации рисунков размеры изменятся. Крупномасштабные карты желательно приводить с координатной сеткой, обозначениями населенных пунктов и/или названиями физикогеографических объектов и разной фактурой для воды и суши. В углу карты желательна врезка с мелкомасштабной картой, где был бы указан участок, увеличенный в крупном масштабе в виде основной карты.

ПОДПИСИ К РИСУНКАМ должны содержать достаточно полную информацию, для того чтобы приводимые данные могли быть понятны без обращения к тексту (если эта информация уже не дана в другой иллюстрации). Аббревиации расшифровываются в подрисуночных подписях.

ЛАТИНСКИЕ НАЗВАНИЯ. В расширенных латинских названиях таксонов не ставится запятая между фамилией авторов и годом, чтобы была понятна разница между полным названием таксона и ссылкой на публикацию в списке литературы. Названия таксонов рода и вида печатаются курсивом. Вписывать латинские названия в текст от руки недопустимо. Для флористических, фаунистических и таксономических работ при первом упоминании в тексте и таблицах приводится русское название вида (если такое название имеется) и полностью – латинское, с автором и, желательно, с годом, например: водяной ослик (*Asellus aquaticus* (L. 1758). В дальнейшем можно употреблять только русское название или сокращенное латинское без фамилии автора и года опубликования, например, для брюхоногого моллюска *Margarites groenlandicus* (Gmelin 1790) – *M. groenlandicus* или для подвида *M. g. umbilicalis.*

СОКРАЩЕНИЯ. Разрешаются лишь общепринятые сокращения — названия мер, физических, химических и математических величин и терминов и т. п. Все сокращения должны быть расшифрованы, за исключением небольшого числа общеупотребительных.

---

* **Названия видов приводятся на латинском языке КУРСИВОМ**, в скобках указываются высшие таксоны (семейства), к которым относятся объекты исследования.

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.

ЛИТЕРАТУРА. Пристатейные ссылки и/или списки пристатейной литературы следует оформлять по ГОСТ Р 7.0.52008. Библиографическая ссылка. Общие требования и правила составления (http://www.bookchamber.ru/GOST_P_7.0.5.2008). Список работ представляется в алфавитном порядке. Все ссылки даются на языке оригинала (названия на японском, китайском и других языках, использующих нелатинский шрифт, пишутся в русской транскрипции). Сначала приводится список работ на русском языке и на языках с близким алфавитом (украинский, болгарский и др.), а затем – работы на языках с латинским алфавитом. В списке литературы между инициалами ставится пробел.

ОБРАЗЕЦ ОФОРМЛЕНИЯ 1-Й СТРАНИЦЫ

УДК 631.53.027.32 : 635.63

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ ПРЕДПОСЕВНОГО ЗАКАЛИВАНИЯ СЕМЯН НА ХОЛОДОУСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА

Е. Г. Шерудило[1], М. И. Сысоева[1], Е. Ф. Марковская[2]

[1] *Институт биологии Карельского научного центра РАН*
[2] *Петрозаводский государственный университет*

Аннотация на русском языке

Ключевые слова: *Cucumis sativus* L., кратковременное снижение температуры, устойчивость.

E. G. Sherudilo, M. I. Sysoeva, E. F. Markovskaya. EFFECTS OF DIFFERENT REGIMES OF SEED HARDENING ON COLD RESISTANCE IN CUCUMBER 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.

Илиел Э. Стереохимия соединений углерода / Пер. с англ. М.: Мир, 1965. 210 с.

Несис К. Н. Океанические головоногие моллюски: распространение, жизненные формы, эволюция. М.: Наука, 1985. 285 с.

Knorre D. G., Laric O. L. Theory and practice in affinity techniques / Eds. P. V. Sundaram, F. L. Eckstein. N. Y., San Francisco: Acad. Press, 1978. P. 169–188.

Ссылки на статьи

Викторов Г. А. Межвидовая конкуренция и сосуществование экологических гомологов у паразитических перепончатокрылых // Журн. общ. биол. 1970. Т. 31, № 2. С. 247–255.

Grove D. J., Loisides L., Nott J. Satiation amount, frequency of feeding and emptying rate in *Salmo gairdneri* // J. Fish. Biol. 1978. Vol. 12, N 4. P. 507–516.

Ссылки на материалы конференций

Марьинских Д. М. Разработка ландшафтного плана как необходимое условие устойчивого развития города (на примере Тюмени) // Экология ландшафта и планирование землепользования: тезисы докл. Всерос. конф. (Иркутск, 11–12 сент. 2000 г.). Новосибирск, 2000. С. 125–128.

Ссылки на авторефераты диссертаций

Шефтель Б. И. Экологические аспекты пространственно-временных межвидовых взаимоотношений землероек Средней Сибири: автореф. дис. …канд. биол. наук. М., 1985. 23 с.

Ссылки на диссертации

Шефтель Б. И. Экологические аспекты пространственно-временных межвидовых взаимоотношений землероек Средней Сибири: дис. …канд. биол. наук. М., 1985. С. 21–46.

Ссылки на патенты

Патент РФ № 2000130511/28, 04.12.2000.

Еськов Д. Н., Серегин А. Г. Оптико-электронный аппарат // Патент России № 2122745. 1998. Бюл. № 33.

Ссылки на архивные материалы

Гребенщиков Я. П. К небольшому курсу по библиографии : материалы и заметки, 26 февр. – 10 марта 1924 г. // ОР РНБ. Ф. 41. Ед. хр. 45. Л. 1–10.

Ссылки на интернет-ресурсы

Паринов С. И., Ляпунов В. М., Пузырев Р. Л. Система Соционет как платформа для разработки научных информационных ресурсов и онлайновых сервисов // Электрон. биб-ки. 2003. Т. 6, вып. 1. URL: http://www.elbib.ru/index.phtml?page=elbib/rus/journal/2003/part1/PLP/ (дата обращения: 25.11.2006).

Ссылки на электронные ресурсы на CDROM

Государственная Дума, 19992003 [Электронный ресурс]: электронная энциклопедия/Аппарат Гос. Думы Федер. Собрания Рос. Федерации. М., 2004. 1 CDROM.

CONTENTS

Научное издание

Труды Карельского научного центра Российской академии наук

№ 3, 2011

Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

Печатается по решению
Президиума Карельского научного центра РАН

Редактор Л. С. Баранцева
Оригинал-макет Г. А. Тимонен

Подписано в печать 04.08.2011. Формат 60x84 1/8.
Гарнитура Pragmatica. Печать офсетная. Уч.изд. л. 16,5. Усл. печ. л. 18,8.
Тираж 500 экз. Изд. № 203. Заказ 975.

Карельский научный центр РАН
Редакционно-издательский отдел
185003, г. Петрозаводск, пр. А. Невского, 50

Научное издание

Труды Карельского научного центра Российской академии наук

№ 3, 2011

Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

Печатается по решению
Президиума Карельского научного центра РАН

Редактор Л. С. Баранцева
Оригинал-макет Г. А. Тимонен

Подписано в печать 04.08.2011. Формат 60x84 1/8.
Гарнитура Pragmatica. Печать офсетная. Уч.изд. л. 16,5. Усл. печ. л. 18,8.
Тираж 500 экз. Изд. № 203. Заказ 975.

Карельский научный центр РАН
Редакционно-издательский отдел
185003, г. Петрозаводск, пр. А. Невского, 50