В. К. Голованов, А. К. Смирнов, Д. С. Капшай. ОКОНЧАТЕЛЬНО ИЗБИРАЕМЫЕ И ВЕРХНИЕ ЛЕТАЛЬНЫЕ ТЕМПЕРАТУРЫ МОЛОДИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ПРЕСНОВОДНЫХ РЫБ
А. В. Елифанов, С. Н. Гашев, Т. И. Моисеенко. ВЛИЯНИЕ СЫРОЙ НЕФТИ НА ОРГАНИЗМ ГРЫЗУНОВ В ПОДОСТРОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ
А. А. Еркоева, С. Н. Дроздов, Е. С. Холопцева. ВЛИЯНИЕ КИСЛОТНОСТИ ПОЧ- ВЫ НА ЭКОФИЗИОЛОГИЧЕСКУЮ ХАРАКТЕРИСТИКУ СЕЯНЦЕВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ
В. В. Лаврова, М. И. Сысоева, Е. М. Матвеева. ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИ- ПИДОВ ЛИСТЬЕВ КАРТОФЕЛЯ В УСЛОВИЯХ ПЕРИОДИЧЕСКОЙ И ДЛИ- ТЕЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ
О. Н. Лебедева, А. Ф. Титов, Т. С. Николаевская. ПРИСПОСОБЛЕННОСТЬ РАСТЕ- НИЙ <i>FESTUCA PRATENSIS</i> HUDS. С СУПРЕССИРОВАННОЙ ХЛОРОФИЛЛ- ДЕФЕКТНОСТЬЮ И ДЕЙСТВИЕ СТАБИЛИЗИРУЮЩЕГО ОТБОРА
В. Б. Придача, С. В. Позднякова, Т. А. Сазонова. ВЛИЯНИЕ СООТНОШЕНИЙ N : P : K В СРЕДЕ НА МИНЕРАЛЬНЫЙ СОСТАВ РАСТЕНИЙ РОДА <i>ВЕТULA</i> 104
Н. С. Репкина, В. В. Таланова, Л. В. Топчиева, Ю. В. Батова, А. Ф. Титов. ВЛИЯ- НИЕ КАДМИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТО- РОВ СВГ1 И DREB1 В ЛИСТЬЯХ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ
К. А. Сазанова, Д. И. Башмаков, А. С. Лукаткин. ГЕНЕРАЦИЯ СУПЕРОКСИДНОГО АНИОН-РАДИКАЛА В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ДЕЙ-СТВИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ
A. И. Сидорова, Н. М. Калинкина, И. В. Дыдик. РЕАКЦИЯ БАЙКАЛЬСКОЙ АМФИПОДЫ GMELINOIDES FASCIATUS STEBBING НА ДЕЙСТВИЕ ЛИВНЕВЫХ СТОКОВ ГОРОДА ПЕТРОЗАВОДСКА 125
В. С. Скидченко, Р. У. Высоцкая, Н. Н. Немова. СПЕКТР ИЗОФОРМ КИСЛОЙ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗЫ В ТКАНЯХ МИДИЙ <i>МҮТІLUS EDULIS</i> В УСЛОВИЯХ МОДЕЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ НЕФТЕПРОДУКТАМИ
О. М. Федоренко, М. В. Грицких, Т. С. Николаевская. ПОЛИМОРФИЗМ ПО ВРЕМЕНИ НАЧАЛА ЦВЕТЕНИЯ У ARABIDOPSIS THALIANA (L.) HEYNH. НА СЕВЕРНОЙ ГРАНИЦЕ ЕГО АРЕАЛА
Е. А. Хижкин, В. А. Илюха, В. Т. Комов, И. В. Паркалов, Т. Н. Ильина, И. В. Баишникова, С. Н. Сергина, В. А. Гремячих, Т. Б. Камшилова, Е. С. Степина. ВИДОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ СОДЕРЖАНИЯ РТУТИ В ОРГАНАХ ХИЩНЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ РАЗЛИЧНОГО ЭКОГЕНЕЗА
Краткие сообщения
А. С. Горюнов, А. Г. Борисова, В. А. Колодей, С. П. Рожков. СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ БИОКОНЪЮГАТОВ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА И ШУНГИТОВОГО НАНОУГЛЕРОДА
М. И. Сысоева, Е. Н. Икконен. ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССОВ ФОТОСИНТЕЗА РАСТЕНИЙ ОГУРЦА ПРИ КРАТКОВРЕМЕННОМ И ДЛИТЕЛЬНОМ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ
Т. Г. Шибаева, Е. Ф. Марковская. ВЛИЯНИЕ КРУГЛОСУТОЧНОГО ОСВЕЩЕНИЯ НА СОСТОЯНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА И РОСТ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА <i>CUCUMIS SATIVUS</i> L. НА РАННИХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА
Юбилеи и даты
М. И. Сысоева, Е. Н. Икконен. Владимир Константинович Курец (к 85-летию со дня рождения)
О. Н. Лебедева. Виктор Александрович Илюха (к 50-летию со дня рождения)
Рецензии и библиография
Правила для авторов

Подписной индекс в каталоге «Роспечать» 57397



ISSN 1997-3217

Труды



КАРЕЛЬСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

№ 2, 2012

transactions.krc.karelia.ru

Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

СОДЕРЖАНИЕ Обзорные статьи Г. А. Жулай, Е. К. Олейник. РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-ЛИМФОЦИТЫ CD4+CD25+FOXP3+. ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В ИММУНОТЕРАПИИ 3 С. А. Мурзина, З. А. Нефедова, Н. Н. Немова. ВЛИЯНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ (МАР-КЕРОВ ПИЩЕВЫХ ИСТОЧНИКОВ РЫБ) НА МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ В УСЛОВИЯХ ВЫСОКИХ ШИРОТ (Обзор) 18 Экспериментальные статьи Л. В. Аникиева, Н. Н. Тютюнник, В. С. Аниканова. ВЛИЯНИЕ ТОКСАСКАРИДОЗ-НОЙ ИНВАЗИИ НА ХОЗЯЙСТВЕННО-ПОЛЕЗНЫЕ ПРИЗНАКИ ПЕСЦОВ (ALOPEX LAGOPUS) КЛЕТОЧНОГО СОЛЕРЖАНИЯ **26** Ю. В. Батова, А. Ф. Титов, Н. М. Казнина, Г. Ф. Лайдинен. НАКОПЛЕНИЕ КАД-МИЯ И ЕГО РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПО ОРГАНАМ У РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ РАЗ-HOΓO BO3PACTA 32 И. Н. Бахмет, Н. Н. Фокина, З. А. Нефедова, Т. Р. Руоколайнен, Н. Н. Немова. МИ-ДИЯ MYTILUS EDULIS L. БЕЛОГО МОРЯ КАК БИОИНДИКАТОР ПРИ ВОЗ-ДЕЙСТВИИ РАСТВОРЕННЫХ НЕФТЕПРОДУКТОВ 38 Н. П. Будыкина, Т. Г. Шибаева, А. Ф. Титов. ВЛИЯНИЕ ЭПИНА ЭКСТРА – СИН-ТЕТИЧЕСКОГО АНАЛОГА 24-ЭПИБРАССИНОЛИДА НА СТРЕССО-УСТОЙЧИВОСТЬ И ПРОДУКТИВНОСТЬ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА (*CUCUMIS* 47 Л. В. Ветчинникова, О. С. Серебрякова, М. К. Ильинова. ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИПИДОВ ПЫЛЬЦЫ ОСНОВНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА **56** И. Л. Голованова, А. А. Филиппов. ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛИКОЗИДАЗ КИШЕЧНИ-КА ЛЕЩЕЙ ABRAMIS BRAMA (L.) ИЗ УЧАСТКОВ РЫБИНСКОГО ВОДОХРА-НИЛИЩА С РАЗЛИЧНОЙ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКОЙ 63

Карельский научный центр Российской академии наук

ТРУДЫ

КАРЕЛЬСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

Научный журнал Труды Карельского научного центра Российской академии наук № 2, 2012 Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ Scientific Journal
Proceedings of the Karelian Research Centre
of the Russian Academy of Sciences
No 2, 2012
EXPERIMENTAL BIOLOGY Series

Главный редактор А. Ф. Титов

Редакционный совет

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

Editor-in-Chief A. F. Titov

Editorial Council

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

Редакционная коллегия серии «Экспериментальная биология»

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

Editorial Board of the «Experimental Biology» Series

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

ISSN 1997-3217

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

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 612.112.94: 57.016.4: 621.017.1: 615.37

РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-ЛИМФОЦИТЫ CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В ИММУНОТЕРАПИИ

Г. А. Жулай, Е. К. Олейник

Институт биологии Карельского научного центра РАН

В обзоре рассматриваются основные вопросы биологии регуляторных Т-клеток CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺: их фенотипическое и функциональное разнообразие, а также молекулярные и клеточные механизмы иммунной супрессии. Представлены последние данные о содержании и распределении Treg клеток в организме в норме и при патологических состояниях (аутоиммунные и онкологические заболевания). Обсуждаются современные подходы в иммунотерапии, ориентированные на иммунную модуляцию с помощью регуляторных Т-клеток.

К л ю ч е в ы е с л о в а: Treg клетки, фенотип, иммуносупрессия, опухоль, аутоиммунитет.

G. A. Zhulaj, E. K. Oleinik. CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ REGULATORY T-LYMPHOCYTE. PROSPECTIVE APPLICATIONS IN IMMUNOTHERAPY

The review considers basic issues of the biology of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T (Treg) cells, their phenotypic and functional diversity, as well as molecular and cellular mechanisms of Treg cell suppression. Also in the review, the recent data on the frequency and distribution of Treg cells we present in normal and pathology (autoimmunity disease and cancer) conditions. Modern approaches in immunotherapy of these diseases directed on Treg cells are discussed.

Key words: Treg cells, phenotype, immunosuppression, tumor, autoimmunity.

Введение

В последнее десятилетие особое место в иммунологических исследованиях занимает изучение регуляторных супрессорных Т-клеток (Treg). Впервые они были охарактеризованы S. Sakaguchi с соавт. [1995] как CD4⁺CD25⁺ Т-клетки при исследовании аутоиммунных за-

болеваний у мышей. Позднее, к 2001 г., супрессорные свойства $CD^{4+}CD25^{1-}$ Т-клеток были найдены и у человека. В 2003 г. описан ген, локализованный в хромосоме X, *FOXP3* (forkhead box P3), который контролирует развитие и функционирование Treg клеток у мышей, затем это было показано и для Treg клеток человека [Sakaguchi et al., 2010]. Предполагается, что

регуляторные Т-клетки играют существенную роль в поддержании иммунного гомеостаза. Они могут подавлять активацию, пролиферацию и эффекторные функции широкого круга иммунокомпетентных клеток, включая CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, натуральные киллерные (NK)- и натуральные киллерные Т (NKT)-клетки, В-клетки и антиген-презентирующие клетки (APC) *in vitro* и *in vivo* [Shevach, 2009; Yang, Ansell, 2009; Sakaguchi et al., 2010].

Регуляторные Т-клетки играют ключевую роль в иммунной системе благодаря уникальной способности контролировать иммунный ответ, они предупреждают аутоиммунные заболевания, аллергию, реакцию отторжения трансплантата, поддерживают пищевую и трансплацентарную толерантность. Эта роль впервые была установлена у мышей, у которых недостаток или удаление Treg клеток приводили к развитию аутоиммунного гастрита, тиреоидита, диабета и воспалительной болезни кишечника (inflammatory bowel disease, IBD). Впоследствии во многих исследованиях было показано, что дефекты в CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg клетках могут способствовать развитию аутоиммунитета и что эти процессы отменяются адоптивным переносом Treg клеток. Важная роль CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Т-клеточной регуляции особенно ярко отмечается при болезнях человека, вызываемых мутациями в гене FOXP3, и проявляется в развитии тяжелого воспаления и аутоиммунитета у пациентов с синдромом Х-сцепленной иммунодисрегуляцией, полиэндокринопатией, энтеропатией (IPEX синдром). У таких пациентов вырабатывается широкий круг аутоантител, развивается инсулинозависимый диабет, тиреоидит, гемолитическая анемия и IBD [Buckner, 2010].

Однако регуляторные Т-клетки могут играть и негативную роль в организме. Например, FOXP3⁺ Treg клетки подавляют противоопухолевый иммунитет, тем самым способствуя опухолевой прогрессии [Curiel et al., 2004; Sakaguchi et al., 2010]. Кроме того, эти клетки также участвуют в развитии хронических инфекционных заболеваний [Chen et al., 2007; Yang et al., 2007].

Фенотипические характеристики регуляторных **Т**-клеток

Более детальное изучение Treg клеток, их отделение от других T-лимфоцитов и использование в клинической практике затруднено тем, что до настоящего времени не определен специфический поверхностный маркер этих клеток. Регуляторные T-клетки экспрессируют

целый спектр функциональных (табл.). Среди них в качестве Treg клеточных маркеров используют CD25 (α-цепь рецептоpa IL-2, IL-2Rα), CTLA-4 (CD152, cytotoxic T lymphocyte antigen 4), GITR (glucocorticoidinduced TNF-receptor-related protein), CD95 (Fas), CD127 $^{\circ}$ (IL-7R α) и другие, поскольку они конститутивно экспрессируются регуляторными Т-клетками. Однако следует иметь в виду, что эти молекулы, используемые как поверхностные маркеры Treg клеток, могут экспрессироваться и другими Т-клетками на определенных стадиях жизненного цикла. Например, молекулы CD25, CD69, CD127, CD45RO обнаруживаются и на Т-эффекторах. Также недавно было показано, что экспрессия таких маркеров, как CD39, CD73, CD101, GITR, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS) и CD120b (TNF RII), не находится в постоянной корреляции с экспрессией ключевого транскрипционного фактора Treg клеток FOXP3 [Tran et al., 2009a].

На сегодня FOXP3 – это наиболее специфический внутриклеточный маркер для Treg клеток. Ген FOXP3 отвечает за развитие Treg клеток и их супрессорную функцию. Его высокая экспрессия обнаружена и в периферических CD4⁺CD25⁺ Trea клетках, и в CD4⁺CD25⁺CD8⁻ тимоцитах мышей [Sakaguchi et al., 2010]. Однако недавно стали появляться сообщения о том, что FOXP3 могут экспрессировать и эффекторные Т-клетки после активации [Miyara et al., 2009b; Buckner, 2010]. Кроме того, показано, что экспрессия FOXP3 CD4⁺CD25⁻ Т-хелперными клетками не всегда сопровождается приобретением супрессорной функции и стабильного регуляторного фенотипа [Sakaguchi et al., 2010]. Поэтому вопрос об уникальном маркере для Treg клеток остается актуальным и в связи с этим поиск маркерных молекул, характерных только для Treg, активно продолжается.

Одной из попыток выделения очищенной популяции регуляторных Т-клеток, без активированных эффекторных Т-клеток, было предложение М. Kleinewietfeld с соавт. [2009] использовать антитела против молекулы CD49d, которая является α цепью интегрина VLA-4 и экспрессируется на поверхности широкого спектра иммунокомпетентных клеток. Они показали, что CD49d отсутствует на иммуносупрессорных FOXP3⁺ Treg клетках. Очищение по CD49d удаляло загрязняющие интерферон-ү (IFN-γ) и интерлейкин (IL)-17 секретирующие клетки от CD4⁺CD25^{hi} Treg клеток, и полученная популяция, CD4⁺CD25^{hi} CD49d⁻, проявляла супрессорные свойства *in vitro* и *in vivo*.

Функциональная характеристика основных молекул регуляторных Т-клеток

-			Опре	делена у			
Группа	Молекула	Роль молекулы в функционировании Treg клеток	мы- чело-		Источник		
. [-]		γ στο ποτιοτήτειο - γγιτικήτειο τροσοπίου το σ	ши	века			
Транскрип-	FOXP3	Контроль развития и функционирования Treg	+	+	Sakaguchi et al., 2010		
ционные		клеток					
факторы	Helios	Не определена; экспрессируется nTreg клетками		+	Thornton et al., 2010		
	Норх	Поддержание iTreg супрессии	+	н. о.	Hawiger et al., 2010		
Молекулы	αЕβ7 интегрин	Локализация Treg клеток в эпителиальных тканях	+	+	Campbell, Koch, 2011		
миграции	(CD103)				• • •		
•	CCR2, CCR4,	Миграция Treg клеток	+	+	Campbell, Koch, 2011		
	CCR6, CD62L				•		
	LFA-1	Привлечение Treg клеток в окружение незрелых	+	+	Onishi et al., 2008		
	(CD11a/CD18)	DC					
	CD304 (Nrp-1)	Четко не определена; возможно, участие в	+	-	Shevach, 2009		
		супрессии					
Молекулы	CD45RO	Маркер активированных Treg клеток	+	+	Sakaguchi et al., 2010		
активации	CD45RA	Маркер покоящихся Treg клеток	-	+	Sakaguchi et al., 2010		
	CD25	α-цепь рецептора IL-2, потребление IL-2	+	+	Sakaguchi et al., 2010		
	HLA-DR	Маркер конечной стадии дифференциации Treg	-	+	Sakaguchi et al., 2010		
		клеток					
	CD127	Недостаток экспрессии определяет Treg клетки	+	+	Sakaguchi et al., 2010		
	CD69	Возможно, супрессия	+	+	Tran et al., 2009a		
Молекулы,	CTLA-4	Воздействие на АРС	+	+	Shevach, 2009		
участвую-	ICOS	Участие в Tr1 супрессии	+	+	Sakaguchi et al., 2010		
щие в	LAP	Экспрессия комплекса LAP-mTGF-β	+	+	Tran et al., 2009a		
супрессии	супрессии IL-10, IL-35 Ингибиторные цитокины			+	Vignali et al., 2008		
		Лизис эффекторных Т-клеток	Gr.	Gr. A	Sakaguchi et al., 2010		
	перфорин		В				
	CD39-CD73	Гидролиз воспалительного внеклеточного АТФ	+	+	Mandapathil et al.,		
					2010		
	галектины 1, 9, 10	Участие в супрессии	+	+	Shevach, 2009		
	FGL2	Снижение функционирования Т-эффекторов, DC	+	+	Shevach, 2009		
_	LAG3(CD223)	Индукция ингибиторного сигнала	+	+	Shevach, 2009		
Другие	GITR	Участие в регуляции Treg супрессорной активности	+	+	Shevach, 2009		
молекулы,	OX40 (CD134)	Участие в развитии и поддержании Treg клеток	+	+	Tran et al., 2009a		
характер-	4-1BB (CD137)	Индуцирует пролиферацию Treg клеток	+	+	Tran et al., 2009a		
ные для	CD95	Повышенная экспрессия определяет Tregs	+	+	Sakaguchi et al., 2010		
Treg клеток	FR4	Не определена	+	н. о.	Ohkura et al., 2011		
	GARP	Четко не определена; рецептор mTGF-β у Treg	н. о.	+	Stockis et al., 2009		
	CD27	Повышенная экспрессия определяет Treg клетки	+	+	Sakaguchi et al., 2010		
-	UDZI	повышенная экспрессия определяет пеу клетки	<u> </u>	'	Janaguoni et al., 2010		

Примечание. Выделенные молекулы относятся к маркерам регуляторных Т-клеток. Tregs – регуляторные Т-клетки; н. о. – не определено; Gr. – гранзим, DC – дендритные клетки, Tr1 – регуляторные Т-клетки типа 1.

Однако D. Q. Tran с соавт. [2009а] обнаружили экспрессию CD49d и на Treg клетках, что делает использование этой молекулы для идентификации регуляторных Т-клеток спорным. Эта же группа ученых предложила свой вариант выделения чистой популяции Treg клеток. Они выяснили, что с помощью комбинации молекул LAP (латентно-ассоциированный пептид), CD121a, CD121b (рецепторы IL-1 типа I и II соответственно) можно отделить активированные FOXP3⁺ регуляторные Т-клетки от FOXP3⁻ и FOXP3⁺ нерегуляторных Т-клеток из периферической крови человека.

Еще одной молекулой, предлагаемой в качестве специфического маркера активированных регуляторных Т-клеток у человека, является GARP (glycoprotein-A repetitions predominant, или LRRC32), которая впервые была идентифицирована с помощью ДНК-микрочипного анализа группой D. Unutmaz [Wang et al., 2008].

Было показано, что белок GARP конститутивно отсутствует в покоящихся Treg клетках, но быстро накапливается на поверхности Treg клеток через 12-24 ч после активации. Экспрессия GARP была в 100 раз больше у активированных Treg клеток по сравнению с нерегуляторными Т-клетками (как активированными, так и покоящимися). Эктопическая экспрессия GARP в CD45RO CD25 наивных Т-клетках человека приводила к приобретению характерных для Treg клеток свойств: снижение продукции цитокинов (IFN-у и IL-2), ослабление пролиферативной способности, появление супрессорной активности, а также частичного Treg фенотипа, определенного по увеличению экспрессии FOXP3, CD25, CD62L [Wang et al., 2008; Probst-Kepper et al., 2009]. Есть данные о том, что экспрессия GARP зависит от FOXP3. Недавно было показано, что GARP является рецептором латентного TGF-β (трансформирующий фактор роста β) на поверхности активированных Treg клеток человека [Stockis et al., 2009; Tran et al., 2009b]. Очевидно, что молекула GARP играет немаловажную роль в функционировании Treg клеток, и ее исследование даст новое понимание биологии этих клеток.

Используя комбинацию молекул CD25. CD45RA, FOXP3, группа Sakaguchi [Miyara et al., попыталась выделить популяции CD4⁺FOXP3⁺ Treg клеток, находящихся на разных стадиях развития и дифференцировки. Они показали, что популяция CD25⁺CD4⁺FOXP3⁺ Т-клеток у человека состоит из трех фенотипически и функционально отличающихся субпопуляций: покоящиеся CD25⁺CD45RA⁺FOXP3¹⁰ клетки (resting, Treg rTreg), активиро-CD25^{hi}CD45RA⁻FOXP3^{hi} ванные Trea (activated, aTreg), и цитокин-секретирующие CD25⁺CD45RA⁻FOXP3¹⁰ несупрессорные Т-клетки. Клетки aTreg, находящиеся на терминальной стадии дифференцировки, быстро погибали после активации, в то время как rTreg клетки пролиферировали и переходили в aTreg клетки in vitro и in vivo. Показано, что rTreg и aTreg клетки имеют сходную функцию, но поскольку экспрессия генов у них отличается, то предполагается, что для них характерны разные супрессорные механизмы.

Помимо основной популяции CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg клеток идентифицировано еще несколько субпопуляций Т-клеток с супрессорными свойствами, но различными фенотипами. Их характеризуют на основе происхождения, функционирования, экспрессии клеточно-поверхностных маркеров и FOXP3. Исходя из этого, можно выделить следующие субпопуляции регуляторных Т-клеток: регуляторные Т-клетки типа 1 (Tr1, type 1 regulatory T cells), T-хелперные клетки типа 3 (Th3, type 3 helper T cells), CD8⁺ iTreg клетки (induced regulatory T cells), CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg клетки.

Клетки Tr1 образуются на периферии вне тимуса и поэтому относятся к адаптивным или Т-клеткам индуцибельным регуляторным (iTreg). iTreg клетки индуцируются под влиянием стимуляции активирующими агентами (в частности антигеном) и образуются в ходе иммунного ответа. Дифференцировка iTreg является антигензависимой и осуществляется при определенных условиях: в присутствии цитокиобладающих иммуномодулирующими свойствами и чувствительных к этим цитокинам APC [Fehervari, Sakaguchi, 2005; Beissert et al., 2006]. Клетки Tr1 в основном секретируют IL-10, а также в небольших количествах TGF-β и IL-5 [Fehervari, Sakaguchi, 2005; Beissert et al., 2006]. Они способны подавлять функции Th1 и Th2 как *in vitro*, так и *in vivo*. Tr1-клетки контролируют развитие аутоиммунных процессов, регулируют активацию наивных клеток и Т-клеток памяти, функции дендритных клеток (DC) и развитие иммунного ответа на различные патогены, аллоантигены, а также принимают участие в процессе опухолевого роста [Fehervari, Sakaguchi, 2005; Beissert et al., 2006]. Супрессорные свойства Tr1-клеток связаны в основном со способностью к секреции IL-10, поскольку их функции могут быть нарушены использованием анти-IL-10 моноклональными антителами (мАТ) [Beissert et al., 2006].

Тh3 также относятся к индуцибельным регуляторным Т-клеткам, но в отличие от Tr1-клеток, Th3-клетки в большом количестве секретируют TGF- β и немного IL-10. Они подавляют развитие аутоиммунных заболеваний как в экспериментальных условиях, так и *in vivo*. Th3-клетки ингибируют пролиферацию и секрецию цитокинов клетками Th1, а также активацию как Th1, так и Th2. Функции Th3-клеток связаны с секрецией TGF- β и могут быть нарушены анти-TGF- β мАТ [Beissert et al., 2006].

К группе iTreg клеток помимо Tr1-клеток и Th3-клеток, экспрессирующих корецептор CD4, относят еще и CD8⁺ регуляторные T-клетки, такие как CD8⁺CD28⁻ клетки, CD8⁺CD122⁺, CD8⁺CD25⁺FOXP3⁺ [Wang, 2008; Zheng et al., 2009].

Основной субпопуляцией CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ регуляторных Т-клеток считаются естественные или натуральные регуляторные Т-клетки (nTreg). Эти клетки формируются в процессе нормальной дифференцировки в тимусе, а не под действием антигенной стимуляции. В результате дифференцировки образуется небольшое количество nTreg клеток, обладающих относительно высоким сродством к аутоантигенам по сравнению с обычными CD4⁺ Т-клетками [Beissert et al., 2006; Sakaguchi et al., 2010]. Хотя незрелые FOXP3⁺ тимоциты найдены у человека, пока немного известно об условиях развития регуляторных Т-клеток в тимусе. На мышиных моделях установлено, что тимические стромальные клетки, включая кортикальные и медуллярные тимические эпителиальные клетки и DC, способствуют дифференциации и селекции Treg клеток. Также в тимическом микроокружении необходимо присутствие IL-2 и IL-7 для развития Treg клеток у мышей [Sakaguchi et al., 2010].

Среди CD4 $^{\circ}$ CD25 $^{\circ}$ FOXP3 $^{\circ}$ Treg клеток могут встречаться возникшие на периферии адаптивные Treg клетки. Показано, что FOXP3 $^{\circ}$ Treg клетки могут индуцироваться *in vitro* из наивных CD4 $^{\circ}$ T-клеток стимуляцией TGF- β или ре-

тиноевой кислотой у мышей и стимуляцией Т-клеточного рецептора (T-cell receptor, TCR) в присутствии TGF- β у человека. Такие FOXP3⁺ iTreg клетки экспрессируют маркеры, ассоциированные с регуляторным фенотипом (такие как CD25, CTLA4 и CD127¹⁰), имеют способность к супрессии, но не проявляют характерного для CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ nTreg профиля генной транскрипции [Sakaguchi et al., 2010].

Таким образом, обе эти субпопуляции – и индуцированные на периферии iTreg, и тимуспроизводные nTreg – экспрессируют FOXP3 и подавляют иммунный ответ. Однако естественные CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg клетки отличаются устойчивостью в отношении поддержания регуляторной функции и экспрессии FOXP3 на периферии [Sakaguchi et al., 2010]. Недавно были установлены признаки, разграничивающие истинные FOXP3⁺ nTreg клетки и FOXP3⁺ iTreg клетки. Во-первых, было найдено, что промоторный регион FOXP3 гена nTreg клеток полностью деметилирован, в отличие от iTreg клеток, для которых был характерен метилированный промоторный регион FOXP3 гена, что, как предполагает Р. С. Janson с соавт. [2008], является причиной нестабильной экспрессии FOXP3 в Т-клетках [Baron et al., 2007; Janson et al., 2008]. Во-вторых, группой Е. М. Shevach [Thornton et al., 2010] описан транскрипционный фактор Helios, член семейства Ikaros, который четко разделяет популяцию FOXP3⁺ Treg клеток на две группы: FOXP3⁺Helios⁺ nTreg и FOXP3[†]Helios iTreg клетки. Было показано, что абсолютно все CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺ тимоциты экспрессировали этот транскрипционный фактор. Ни мышиные, ни человеческие наивные Т-клетки, индуцированные к экспрессии Foxp3 in vitro TCR стимуляцией в присутствии TGF-β, не экспрессировали Helios. Поэтому транскрипционный фактор Helios был предложен в качестве маркера тимус-производных nTreg клеток. B-третьих, для CD25⁺Foxp3⁺ iTreg клеток, индуцированных DC in vivo, отмечается высокий уровень экспрессии транскрипционного кофактора Hopx (или Hop - homeodomain only protein) [Hawiger et al., 2010]. Было установлено, что Норх экспрессируется в 3 раза меньше в nTreg клетках, чем в iTreg клетках, и что Hopxдефицитные iTreg клетки, индуцированные DC, теряли способность к супрессии, в то время как для функционирования nTreg клеток Hopx не требовался.

Таким образом, пул регуляторных Т-клеток весьма гетерогенен, и определение специфического поверхностного маркера является одной из ключевых задач, решение которой позволит более детально изучать

свойства Treg клеток, новые механизмы супрессии, а также возможности использования их в иммунотерапии.

Механизмы иммунной супрессии с участием регуляторных **Т**-клеток

Иммунная супрессия, опосредованная регуляторными Т-клетками, направлена на разные типы иммунокомпетентных клеток. Мишенями для Treg супрессии могут стать CD4⁺ и CD8⁺ Tклетки, В-клетки, DC, макрофаги, тучные клетки, NK- и NKT-клетки [Gri et al., 2008]. Широкий спектр супрессорных механизмов, используемых Treg клетками, E. M. Shevach [2009] делит на две основные группы по действию на клеточные мишени: способы супрессии, направленные на Т-клетки (супрессорные цитокины. потребление IL-2, цитолиз), и способы супрессии, направленные на АРС (понижение костимуляции или снижение антигенной презентации). Также существует другая классификация механизмов супрессии, когда они подразделяются по способу действия. Это клеточно-контактная супрессия (при участии в межклеточном взаимодействии CTLA-4/B7, LAG3, TGF-β, цАМФ или гранзимов), супрессия, опосредованная локальной секрецией ингибиторных цитокинов (TGF-β, IL-10, IL-35), и конкурентное связывание факторов роста [Sojka et al., 2008].

Одним из механизмов опосредованной Treg клетками иммунной супрессии является конкуренция за фактор роста – IL-2, который необходля нормального функционирования ДИМ Т-лимфоцитов. К тому же IL-2 требуется для поддержания субпопуляции nTreg клеток на периферии и индукции iTreg клеток [Long et al., 2010]. Поскольку Treg клетки конститутивно экспрессируют CD25, а также еще два высоко аффинных компонента IL-2R - CD122 и CD132, это позволяет им преобладать в потреблении цитокина над наивными Т-клетками, которые экспрессируют CD25 только после TCR стимуляции. Treg клетки, потребляя IL-2 и конкурируя с Foxp3⁻ Т-клетками, ингибируют тем самым их пролиферацию, что приводит к апоптозу, индуцированному недостатком цитокина и in vitro, и in vivo. Показано, что апоптоз клетокмишеней был Bcl-2-зависимым, но независим от перфорина [Sojka et al., 2008; Shevach, 2009]. Таким образом, IL-2 оказался необходим регуляторным Т-клеткам не только для поддержания их гомеостаза in vivo, но и для выполнения их супрессорной функции in vitro. Однако в исследованиях с добавлением антител CD25 в систему «Тreg клетки человека -Т-эффекторы мыши» было показано, что блокирование связывания IL-2 анти-CD25 не влияет на функционирование Treg клеток человека [Sojka et al., 2008; Shevach, 2009]. Соответственно, конкуренция за IL-2 не может быть основным механизмом Treg-опосредованной супрессии.

Важное место в Тreg супрессии занимают ингибиторные цитокины TGF-β и IL-10. Разные исследования показывали TGF-β- и/или IL-10зависимые пути Treg-опосредованной супрессии. Но использование in vitro нейтрализующих антител или Т-клеток, которые не способны секретировать или отвечать на IL-10 и TGF-β, позволяет предполагать, что эти цитокины могут быть не столь существенны для функционирования Treg клеток. В то же время исследования и in vitro, и in vivo указывают на ключевую роль для Treg мембраносвязанного TGF-β (mTGF-β). Показано, что mTGF-β, продуцируемый Treg клетками, напрямую подавляет эффекторный Т-клеточный иммунный [Vignali et al., 2008]. Определена различная значимость IL-10, продуцируемого Treg клетками при разных патологиях. Удаление IL-10 не приводило к развитию спонтанного системного аутоиммунитета, но являлось причиной осложнения патологии в толстой кишке у старых мышей и в легких у мышей с индуцированной гиперчувствительностью дыхательных путей. Предполагается, что функция IL-10, секретируемого Treg клетками, может быть ограничена контролем воспалительных иммунных ответов, индуцируемых патогенами или повреждениями извне [Vignali et al., 2008].

L. W. Collison с соавт. [2007] показали, что недавно описанный ингибиторный цитокин IL-35 способствует Treg клеточной супрессии. Они установили, что мышиные CD4⁺CD25⁺ Treg клетки конститутивно экспрессируют *Ebi3* и II12a гены, которые совместно кодируют цитокин IL-35. Отмечено, что *Ebi3*^{-/-} и *II12a*^{-/-} Treg клетки значительно снижали регуляторную активность in vitro и не были способны контролировать пролиферацию эффекторных Т-клеток и терапию IBD in vivo. В 2008 г. Е. Bardel с соавт. [2008], изучая экспрессию Ebi3 в некоторых популяциях лимфоцитов человека, показали, что Treg клетки, как покоящиеся, так и активированные, не экспрессируют *Ebi3* и не продуцируют определяемое количество IL-35. Однако недавно V. Chaturvedi с соавт. [2011] установили, что Treg клетки человека экспрессируют IL-35 и нуждаются в нем для проявления максимальной супрессорной активности. Также эти авторы отмечают, что исследуемая ими Treg-опосредованная супрессия была контактнезависимой, обусловлена супрессорным цитокином IL-35 и не нуждалась в IL-10 или ТGF-β. Более того, такая супрессия приводила к конверсии подавляемых Т-эффекторов в iTr35 клетки – IL-35 индуцированная популяция Treg клеток. Таким образом, вопрос об участии IL-35 в Treg-опосредованной супрессии у человека остается не совсем ясным и требует дальнейшего изучения.

Описано участие некоторых галектинов в Treg-опосредованной иммуносупрессии. Показано, что галектин-1 высоко экспрессируется в CD4⁺CD25⁺ Treg клетках, особенно после их активации. Блокада связывания галектина-1 значительно снижает ингибиторные эффекты Treq клеток и у мышей, и у человека. Галектин-1 член семейства лектинов. Он широко распространен в лимфоидных и нелимфоидных тканях и выполняет разнообразные иммунорегуляторные функции. Последствия связывания галектина-1 с его лигандами на Т-клетках проявляются в остановке клеточного цикла и апоптозе, а также в ингибировании продукции провоспалительных цитокинов, таких как IL-2 и IFN-ү [Garin et al., 2007]. Сообщается, что в функционировании регуляторных Т-клеток принимает участие галектин-9, который, возможно, влияет на дифференцировку Treg клеток, усиливая ee [Seki et al., 2008], а также галектин-10, ингибирование которого восстанавливает пролиферативную способность Treg клеток и частичотменяет их супрессорную [Shevach, 2009].

Еще одним механизмом супрессии, опосредованной Treg клетками, может быть цитолиз клеток-мишеней. Исследования *in vitro* показали, что $CD4^{+}CD25^{+}$ Т-клетки экспрессируют гранзим A (у человека) и В (у мышей) [Grossman et al., 2004; Sakaguchi et al., 2010]. Эти клетки проявляют перфорин-зависимую цитотоксичность против аутологичных клетокмишеней, включая активированные $CD4^{+}$ и $CD8^{+}$ Т-клетки, $CD14^{+}$ моноциты, DC [Grossman et al., 2004], а также NK-клетки [Cao et al., 2007].

Известно несколько механизмов Treg супрессии, связанных с презентацией антигена. Наиболее важным из них является снижение костимуляции на DC посредством взаимодействия их с молекулой CTLA-4. Известно, что регуляторные Т-клетки конститутивно экспрессируют эту молекулу и что использование анти-СTLA-4 мАТ отменяет подавление пролиферации эффекторных Т-клеток *in vitro*. Однако исследования *in vivo* с CTLA-4-дефицитными Treg клетками показывают, что супрессия только немного снижается. Предполагают, что взаимодействие CTLA-4 на Treg клетках с его ли-

гандами CD80 и CD86 на DC блокирует последующее увеличение экспрессии CD80 и CD86 или даже снижает их экспрессию, индуцированную антиген-специфичными эффекторными клетками. Таким образом, ингибирование экспрессии CD80 и CD86 Treg клетками ограничивает способность DC стимулировать наивные T-клетки через CD28. Также возможно, что CTLA-4 на Treg клетках может взаимодействовать с CD80 и CD86, которые экспрессируются на активированных Foxp3 T-клетках и тем же способом снижать функции T-эффекторов [Shevach, 2009].

При участии CTLA-4 возможен супрессорный эффект Treg клеток посредством усиления экспрессии DC индоламина 2, 3-диоксигеназы (IDO). Во время взаимодействия CTLA-4 с CD80 и CD86. DC могут экспрессировать фермент IDO, который индуцирует катаболизм триптофана в проапоптотические метаболиты (например, кинуреин), подавляющие активацию эффекторных Т-клеток [Shevach. 2009]. В последнее время к IDO проявляют особый интерес в связи с обнаружением новых аспектов его участия в биологии Treg клеток. Выявлена способность IDO-экспрессирующих DC управлять дифференциацией наивных CD4⁺ T-клеток в Foxp3⁺ iTreg, а также способность IDO-экспрессирующих DC напрямую активировать созревание Treg клеток и предупреждать индуцированную воспалением конверсию Treg клеток провоспалительные Т-хелпер-подобные клетки [Munn, 2011].

Супрессия DC может опосредоваться еще одной молекулой, экспрессируемой Treg клетками – LAG-3 (lymphocyte activation gene3, CD223). Эта молекула LAG-3 может связывать молекулы MHC класса II с очень высокой аффинностью. Связывание LAG-3 с молекулами MHC класса II, которые экспрессируются незрелыми DC, приводит к остановке созревания и снижению иммуностимулирующих свойств DC [Liang et al., 2008].

Описано вовлечение в Treg иммуносупрессию и ряда других молекул, которые экспрессируются Treg клетками. Например, нейропилин-1 (Nrp-1) содействует длительному взаимодействию Treg клеток с незрелыми DC [Sarris et al., 2008]. Функционально-ассоциированный лимфоцитарный антиген-1 (LFA-1) способствует накоплению Treg клеток вокруг незрелых DC, конкурируя с наивными Т-лимфоэкспрессию также понижая цитами, а CD80/CD86 [Onishi et al., 2008]. Фибриногенподобный белок 2 (FGL2) снижает активное функционирование DC [Shalev et al., 2008]. Участвует в Treg иммуносупрессии и гемоксигеназа 1 (HO-1), которая проявляет сильный противовоспалительный и иммунорегулирующий эффект [Choi et al., 2005].

Супрессорное действие Treg клеток связывают также с изменением уровня циклического АМФ (цАМФ), увеличение которого ассоциируется с ингибированием клеточной пролиферации и дифференцировки, а у лимфоцитов еще и селективным подавлением генной экспрессии цитокинов, таких как IL-2, IFN-у. Последние исследования показали, что регуляторные Т-клетки повышают уровень цАМФ, по меньшей мере, двумя путями: прямо поставляя цАМФ в активированные клетки-мишени через щелевой контакт [Sojka et al., 2008] и косвенно, продуцируя местно аденозин, посредством поверхностной экспрессии эктонуклеотидаз CD73 и CD39 [Mandapathil et al., 2010].

Помимо регуляторных Т-клеток супрессорная функция определена для нескольких типов клеток, включая $\gamma\delta$ Т-клетки, CD4⁺CD8⁺-клетки, NKT-клетки [Wang, 2008], NK-клетки [Caumartin et al., 2007] и CD1d^{hi}CD5⁺CD19^{hi} B-клетки [Iwata et al., 2011].

Содержание и локализация регуляторных Т-клеток

Популяция CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Т-клеток считается минорной и содержание Treg в периферической крови составляет около 5-10 % от CD4⁺ Т-клеток у мышей и человека [Yang, Ansell, 2009]. Регуляторные Т-лимфоциты конститутивно присутствуют в лимфоидных тканях, но они могут быть найдены и в большинстве нелимфоидных тканей, даже в отсутствие воспа-К примеру, было показано, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg клетки содержатся не только во вторичных лимфатических тканях, включая селезенку, подкожные периферические лимфоузлы, мезентериальные лимфоузлы, пейеровы бляшки, но и во всех исследуемых нелимфоидных тканях, таких как кожа, легкие, печень, слизистая оболочка кишечника и брюшной полости [Sather et al., 2007].

Экспрессия довольно широкого ряда молекул адгезии и хемотаксических молекул позволяет Тreg клеткам активно распределяться по тканям организма и выполнять свои функции. Например, экспрессия интегрина αΕ (CD103) и хемокинового рецептора CCR4, а также способность продуцировать углеводные лиганды для P- и E-селектинов является важным для миграции и удерживания Treg клеток внутри кожи. Помимо этого, регуляторные Т-клетки экспрессируют целый ряд хоминговых рецепторов, к которым относятся CCR1, CCR2,

ССR4, ССR5, ССR6, ССR8, ССR9, СХСR3, СХСR4, СХСR5, СХСR6, интегрины α 4 β 1(VLA4), α E β 7 и α 4 β 7, предположительно участвующие в привлечении Treg клеток в места воспаления. Комбинация тех или иных рецепторов миграции Treg клеток зависит от ткани, вовлеченной в воспаление, а также типа воспалительного ответа. Например, при Th1 воспалительном ответе IFN- γ индуцирует экспрессию хемокинового рецептора CXCR3 к хемокинам CXCL9, CXCL10, CXCL11, а, следовательно, и миграцию CXCR3 $^+$ Treg клеток в печень в модели гепатита, индуцированного конканавалином A [Campbell, Koch, 2011].

Экспрессия регуляторными Т-клетками хемокиновых рецепторов имеет большое значение в привлечении и накоплении этих клеток в места локализации опухоли. Так, исследования T. J. Curiel с соавт. [2004] показали, что CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg клетки при опухоли яичника экспрессируют ССR4 и мигрируют в направлении CCL22 в опухолевое микроокружение. Авторы считают, что опухолевые клетки и опухоль-ассоциированные макрофаги являются источником CCL22. Эти Treg клетки проявляли супрессорные свойства и были способны блокировать опухоль-специфичный иммунитет, способствуя опухолевому росту и неблагоприятному прогнозу выживаемости пациентов. Миграция ССR4⁺ Treg клеток к ССL22 в места локализации опухоли определена и при других видах рака, например, у пациентов с опухолями молочной железы [Ménétrier-Caux et al., 2009], мозга [Jacobs et al., 2010], желудка [Mizukami et al., 2008]. Также сообщается об участии других хемокинов в привлечении Treg клеток в места опухолевого роста [Yang, Ansell, 20091.

У онкологических больных отмечается увеличенное количество CD4⁺CD25[№] Treg клеток в периферической крови, опухолевом микроокружении, в регионарных лимфатических узлах, в опухолевой ткани, асцитной жидкости. Причем их наибольшее скопление наблюдается именно среди опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов [Curiel et al., 2004; Mizukami et al., 2008]. Показано, что повышенное содержание Treg клеток коррелирует со стадией рака, гистологическим типом и выживаемостью пациентов [Yang, Ansell, 2009].

Что касается аутоиммунных заболеваний, то данные о количестве Treg клеток у пациентов с аутоиммунной патологией сильно варьируют. Ранние анализы содержания Treg клеток при аутоиммунитете с использованием только антител к CD25 показывали значительное сокращение количества CD4⁺CD25⁺ Treg клеток

[Kukreja et al., 2002]. С введением в использование FOXP3 как более специфического маркера Treg клеток исследователи стали получать более противоречивые результаты. Например, у пациентов с диабетом I типа не было найдено значительных различий в количестве CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg клеток по сравнению с контролем [Buckner, 2010]. Также не наблюдалось различий в содержании CD4⁺CD25^{hi} Treq клеток в крови здоровых доноров и пациентов с рассеянным склерозом [Feger et al., 2007; Michel et al., 2008]. Однако некоторые исследования аутоиммунных заболеваний все же выявили изменения в численности Treg клеток. Так, при системной красной волчанке было показано снижение числа Treg клеток [Suen et al., 2009], а у пациентов с ревматоидным артритом, наоборот, увеличение их количества [Нап et al., 2008]. Интересно, что в местах воспаления, таких как цереброспинальная жидкость при рассеянном склерозе, синовиальная жидкость при ревматоидном артрите, в коже при псориазе, содержание Treg клеток увеличено по сравнению с контролем [Buckner, 2010]. Похоже, что Treg клетки мигрируют в места воспаления, но заметного подавления чрезмерной иммунной реакции при этом не наблюдается.

Регуляторные Т-клетки при развитии опухолей. Возможности контроля иммунной супрессии

Известно, что опухоль обладает различными механизмами преодоления иммунологического надзора. Одним из них является формирование иммунологической толерантности к опухолевым клеткам, участие в котором принимают Treg клетки.

Многие исследования связывают увеличенное количество Treg клеток у онкологических пациентов с неблагоприятным прогнозом [Curiel et al., 2004; Ménétrier-Caux et al., 2009; Yang, Ansell, 2009]. Однако не существует прямого доказательства того, что высокое число Treg клеток характерно для неблагоприятного исхода у всех пациентов с онкологией.

Известно, что Treg клетки ингибируют иммунологический ответ на опухолевые клетки, но важным моментом является то, что опухоль сама активно участвует в накоплении Treg в местах ее локализации. Это становится возможным благодаря определенным механизмам. Во-первых, привлечение Treg клеток вызывается продукцией опухолевыми клетками и опухоль-инфильтрующими макрофагами хемокинов, таких как CCL22 и CCL5 [Yang, Ansell, 2009; Nishikawa, Sakaguchi, 2010]. Во-вторых,

накопление опухоль-инфильтрующих Treg клеток возможно благодаря генерации de novo путем конверсии их из CD4⁺CD25⁻ эффекторных Т-клеток или из наивных Т-клеток [Jarnicki et al., 2006; Shafer-Weaver et al., 2009]. Так, например, опухолевые В-клетки (при фолликулярной лимфоме В-клеток) индуцировали Т-клетки к экспрессии FOXP3 и к приобретению регуляторной функции, тогда как нормальные В-клетки не проявляли таких свойств [Ai et al., 2009]. Для индукции Т-клеток в супрессорные опухоль может секретировать TGF-β [Liu et al., 2007; Moo-Young et al., 2009] или использовать DC [Ghiringhelli et al., 2005]. Однако следует учитывать, что конверсия T-клеток в Treg показана in vitro в клеточных культурах или на мышиных моделях, а случается ли она в условиях *in vivo*, не ясно. В-третьих, опухолевые клетки могут способствовать экспансии nTreg клеток в опухолевое микроокружение [Yang, Ansell, 2009; Elkorda et al., 2011]. В экспериментах *in* vitro показано, что супернатант клеточной линии лимфомы Ходжкина значительно увеличивал количество Treg клеток, а при меланоме Ходжкина DC поддерживали и способствовали экспансии CD4⁺FOXP3⁺ Treg клеток [Yang, Ansell, 2009].

О том, как функционируют регуляторные Т-клетки в местах локализации опухоли, известно немного. Так как опухолевые клетки способны индуцировать развитие Treg клеток, можно предположить, что Treg клетки могут распознавать опухолевые антигены и поэтому могут быть опухоль-специфичными [Yang, Ansell, 2009; Nishikawa, Sakaguchi, 2010]. В литературе описываются некоторые механизмы супрессии, которые реализуются регуляторными Т-клетками в опухолевом микроокружении. Так, например, у пациентов с меланомой CD4⁺CD25^hFOXP3⁺ Treg клетки ингибировали пролиферацию CD4⁺CD25⁻ и CD8⁺ Т-клеток контакт-зависимым путем. С другой стороны, на экспериментальной модели карциномы толстого кишечника СТ26 показано, что в местах опухолевого роста присутствуют CD4⁺ и CD8⁺ Treg клетки, секретирующие IL-10 и TGF- β [Jarnicki et al., 2006]. У пациентов с плоскоклеточной карциномой головы и шеи была описана уникальная субпопуляция Treg клеток, продуцирующая и IL-10, и TGF-\(\beta 1 \), которая не нуждалась в межклеточном контакте для ингибирования иммунного ответа [Сорочан и др., 2009]. В исследовании X. Sun с соавт. [2010] на мышиной модели метастатического рака печени было показано, что CD4⁺FOXP3⁺ Treg клетки ингибируют действие NK-клеток и способствуют росту метастазов CD39-зависимым путем.

Одним из способов индукции противоопухолевого ответа является преодоление иммунологической толерантности, и в этом случае Тreg клетки становятся главной мишенью. В иммунотерапии, направленной на регуляторные Т-клетки, можно выделить три основных подхода: удаление Treg клеток, ослабление их супрессорной способности и воздействие на миграцию Treg клеток в места локализации опухоли.

Многие исследования показали, что системное или локальное истощение популяции CD4⁺CD25⁺ Treg клеток у мышей с различными типами опухоли приводит к усилению противоопухолевого иммунного ответа, как естественного, так и индуцированного вакцинацией, и ингибирует опухолевый рост [Nishikawa, Sakaguchi, 2010]. В качестве агентов, истощающих популяцию регуляторных Т-клеток, анти-CD25 мАТ, используются а Denileukin difitox (DAB389IL-2), или Онтак, иммунотоксин, конъюгированный с IL-2, который способен избирательно уничтожать клетки с гиперэкспрессией CD25. Еще одним способом снижения количества CD4⁺CD25⁺ Treg клеток является введение низких доз химиотерапевтического препарата циклофосфамида [Сорочан и др., 2009; Nishikawa, Sakaguchi, 2010].

Снижение супрессорного эффекта наблюдается при воздействии на функционально значимые молекулы Treg клеток. Так, ослабление Treg супрессии показано при связывании СТLА-4 с помощью анти-СТLА-4 мАТ как на мышиных моделях опухолей, так и при лечении больных раком разных типов с использованием моноклональных антител ipilimumab (MDX-010) и tremelimumab (СР-675,206). Также ингибирующий эффект супрессорной функции Treg клеток был продемонстрирован для агонистических анти-GITR мАТ (DTA-1) и агонистических анти-OX-40 мАТ (OX86). Подавление функциональной активности Treg клеток может быть вызвано и с помощью Toll-подобных рецепторов. Так, например, показано, что TLR2 сигнал стимулирует пролиферацию CD25⁺CD4⁺ Treg клеток и индуцирует временную потерю супрессорной активности, что приводит к усилению противоопухолевого иммунного ответа [Сорочан и др., 2009; Nishikawa, Sakaguchi, 2010].

Использование агентов, вызывающих истощение популяции Treg клеток или ослабляющих их супрессорный эффект, показывает положительные, но относительно малоэффективные результаты. Более результативным чаще бывает применение комбинированной терапии. Так, например, использование иммуно-

токсина Онтак совместно с вакциной на основе DC приводило к 1000-кратному усилению иммунного ответа, тогда как одна вакцинация усиливала иммунный ответ в 50 раз у пациентов с метастатической карциномой почек [Dannull et al., 2005]. В другом исследовании подавление роста клеток меланомы у всех мышей отмечали при применении анти-CD25 мАТ в сочетании с внутриопухолевой трансфекцией гена IL-12, а введение только анти-CD25 мАТ было неэффективным [Сорочан и др., 2009].

Следует иметь в виду, что такие подходы могут иметь и негативные эффекты: истощение популяции Treg клеток или ослабление их функциональной активности могут привести к появлению аутоиммунных реакций. Также использование неспецифических для Treg клеток молекул, которые характерны и для активированных Т-лимфоцитов, воздействует на эффекторные Т-клетки, снижая их количество и ослабляя иммунный ответ.

Еще одним направлением в иммунотерапии рака, направленной на Treg клетки, может стать воздействие на хоминг регуляторных Т-клеток. Так, недавнее исследование М. С. В. Тап с соавт. [2009] показало, что блокада миграции CD4⁺FOXP3⁺ Treg клеток в места локализации опухоли за счет нарушения связывания CCR5/CCL5 ингибирует рост аденокарциномы поджелудочной железы.

На содержание и функционирование Treg клеток оказывают действие некоторые противоопухолевые препараты. Так, например, флударабин (FLU) останавливает экспансию Tr1-клеток *in vitro*, леналидомид и помалидомид ингибируют пролиферацию и супрессорное действие Treg клеток, иматиниб мезилат (Гливек, STI571) подавляет экспансию и функциональную активность Treg клеток *in vitro* и *in vivo* [Сорочан и др., 2009].

Регуляторные Т-клетки при аутоиммунных процессах. Возможности индукции иммунной супрессии

Аутоиммунные реакции в организме предполагают нарушение иммунологической толерантности, сопровождающейся избыточным образованием аутоантител и аутореактивных Т-клеток. Поскольку регуляторные Т-клетки непосредственно участвуют в поддержании иммунологической толерантности к собственным антигенам, то развитие аутоиммунных процессов в той или иной степени связано с недостаточностью этих клеток.

Наиболее сильно аутоиммунные реакции проявляются при генетических дефектах, за-

трагивающих развитие Treg клеток. Это, прежде всего, наблюдается у больных с IPEX-синдромом и scurfy мышей, которые развиваются в результате мутации гена FOXP3/Foxp3 и связаны с множественными аутоиммунными поражениями. При генетически обусловленном дефиците IL-2 наблюдаются сходные поражения [Ярилин, Донецкова, 2006; Wing, Sakaguchi, 2010]. Также во многих исследованиях показано, что удаление Treg клеток провоцирует аутоиммунные процессы у экспериментальных мышей [Wing, Sakaguchi, 2010].

Предполагается, что нарушение иммунной регуляции с участием Treg клеток при аутоиммунных болезнях может быть вызвано тремя способами: (1) снижением количества Treg клеток и/или ослаблением их функционирования вследствие врожденных дефектов у склонных к аутоиммунитету людей; (2) подавлением супрессорной функции Treg клеток из-за хронического воспаления, которое развивается при аутоиммунных расстройствах; (3) становятся невосприимчивыми к супрессии аутореактивные эффекторные Т-клетки в результате подавления функционирования Treg клеток или экспрессии молекул, которые обеспечивают их резистентность [Bettini, Vignali, 2009].

Некоторые авторы связывают нарушение супрессорной функции Treg клеток с IL-2, ключевым цитокином для развития и поддержания nTreg клеток. В исследованиях с NOD мышами (non-obese diabetic mice, экспериментальная модель диабета I типа) было продемонстрировано, что ослабление функционирования Treg клеток в местах воспаления связано с пониженным уровнем IL-2 [Bettini, Vignali, 2009]. Другое исследование обнаруживает дефект в сигнальном пути IL-2R у Treg клеток пациентов с диабетом I типа. Это нарушение приводило к уменьшению восприимчивости Treg клеток к IL-2, и вследствие этого снижало его доступность Treg клеткам. Предполагается, что устойчивость Treg клеток у пациентов с аутоиммунным диабетом может быть снижена в местах воспаления в результате уменьшения чувствительности к IL-2, который продуцируется в процессе воспаления, хотя содержание популяции Treg клеток на периферии остается нормальным [Long et al., 2010]. Также на NOD мышах наблюдали недостаток FOXP3 экспрессии у Treg клеток, инфильтрирующих островковые клетки, связанный с ограниченной доступностью IL-2 [Tang et al., 2008].

Описаны случаи, когда в составе популяции Treg клеток в условиях аутоиммунитета идентифицировались субпопуляции, наличие или недостаток которых приводил к отклонениям. Так, B. Fritzsching с соавт. [2011] обнаружили в цереброспинальной жидкости больных рассеянным склерозом субпопуляцию CD45RO^{hi}CD95^{hi} Treg клеток, которая была высокочувствительна к СD95-опосредованному апоптозу. В другом исследовании [Fletcher et al., 2009] у пациентов с той же патологией отмечено пониженное количество CD4⁺FOXP3⁺CD39⁺ Treg клеток в периферической крови, но не CD4⁺FOXP3⁺CD39⁻ Treg клеток. Показано, что субпопуляция, экспрессирующая СD39, была способна подавлять не только пролиферацию эффекторных Т-клеток и продукцию IFN-у, но и продукцию провоспалительного цитокина IL-17, секретируемого Th17 клетками и играющего негативную роль при развитии аутоиммунных заболеваний. Однако CD39⁺ Treg клетки, выделенные из крови аутоиммунных больных, проявляли ослабленную способность к супрессии Th17 иммунного ответа, что, как предполагают авторы, вызывает накопление IL-17 и способствует развитию болезни. Еще одна группа ученых [Swainson et al., 2010] обнаружила, что Treg клетки, но не эффекторные Т-клетки, экспрессируют FcRL3 (Fc receptor-like protein 3), который является продуктом гена FcRL3, восприимчивого к аутоиммунным заболеваниям. Мутации в этом гене связаны с такими аутоиммунными заболеваниями, как ревматоидный артрит, аутоиммунный тиреоидит, системная красная волчанка. Установлено, что FcRL3⁺ Treg клетки в отличие от FcRL3 Treg клеток были менее чувствительны к антигенной стимуляции в присутствии IL-2 и имели сниженную способность к супрессии пролиферации эффекторных Т-клеток in vitro. Эти авторы предполагают, что FcRL3 экспрессия связана с дисфункцией Treg клеток, которая может способствовать потере аутотолерантности и развитию аутоиммунитета.

В ряде исследований сообщалось, что в течение аутоиммунного воспаления причиной ослабленной супрессии являлись не регуляторные Т-клетки, а эффекторные Т-клетки, которые были чрезмерно активны и не поддавались Treg-опосредованной супрессии [Schneider et al., 2008; Buckner, 2010]. Tak, A. Schneider с соавт. показали, что эффекторные Т-клетки пациентов с диабетом I типа были устойчивы к супрессии, опосредованной Treg клетками, выделенными из крови здоровых доноров. Причем эта устойчивость не зависела от источника Treg клеток (nTreg или iTreg клетки). Феномен резистентности эффекторных Т-клеток описан для некоторых экспериментальных моделей аутоиммунных заболеваний мышей, таких как диабет I типа (DO11.10 RIP-mOVA и NOD), рассеянный склероз EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis), модель волчаночного синдрома MRL-lpr. Такая же резистентность Т-эффекторов была обнаружена и при аутоиммунных заболеваниях человека, таких как диабет I типа, системная красная волчанка, болезнь Крона, псориаз, ювенильный идиопатический артрит [Schneider et al., 2008; Buckner, 2010; Wehrens et al., 2011]. Механизмы, с помощью которых эффекторные Т-клетки становятся резистентными к супрессии, не известны. В настоящее время исследуются факпосредством которых патогенные Т-клетки могут избегать Treg-опосредованной супрессии. Описано вовлечение ингибиторной молекулы Smad7 в формирование устойчивости колитогенных CD4⁺ Т-клеток на модели аутоиммунного IBD и в восстановление пролиферации этих клеток [Fantini et al., 2009]. Недавно показано, что гиперактивация протеинкиназы-В в воспалительных эффекторных Т-клетках была причиной потери их восприимчивости к Treaопосредованной супрессии у пациентов с ювенильным идиопатическим артритом [Wehrens et al., 2011]. У больных псориазом сообщалась IL-6-опосредованная устойчивость к Treg клеточной супрессии [Goodman et al., 2009]. Также описано вовлечение в индукцию резистентности недостатка ганглиозида GM1 v патогенных эффекторных Т-клеток NOD мышей [Wu et al., 2011].

Успешные эксперименты по предупреждению развития аутоиммунных заболеваний у трансгенных мышей посредством переноса Treg клеток [Wing, Sakaguchi, 2010] свидетельствуют о возможности использования этих клеток в терапии аутоиммунных заболеваний для индукции иммунной супрессии. Иммунотерапия аутоиммунных процессов направлена на восстановление аутотолерантности с помощью усиления иммуносупрессии и ослабления аутореактивного иммунного ответа. Для достижения этого могут быть использованы следующие направления: антиген-специфичная и/или поликлональная активация и экспансия Treg клеток *in vivo*, снижение числа эффекторных Т-клеток in vivo, экспансия антиген-специфичных Treg клеток in vitro и перенос их обратно пациенту, преодоление резистентности патогенных эффекторных Т-клеток к Treg-опосредованной супрессии.

Поскольку Treg клетки являются функционально отдельной и зрелой популяцией Т-лимфоцитов, с разнообразным репертуаром TCR, то их обычная клональная экспансия через антигенную стимуляцию приводит к индукции антиген-специфичной иммуносупрессии. Было

показано на примере NOD мышей, что Treg клетки, специфичные к островковым клеткам, проявляли более сильную супрессию, чем поликлонально активированные Treg клетки. Также было отмечено, что Treg клеткам для активации супрессии требуется более низкая концентрация антигена, чем для активации наивных Т-клеток. Предполагается, что использование низких доз антигена может активировать Treg клетки, но не наивные или покоящиеся эффекторные Т-клетки [Міуага et al., 2009а].

Недавно было обнаружено, что ретиноевая кислота, метаболит витамина А, способствует дифференцировке FOXP3⁺ Treg клеток из наивных Т-клеток в присутствии TGF-β и отсутствии IL-6. Эти индуцированные ретиноевой кислотой Treg клетки локализуются в пищеварительном тракте, особенно в слизистой кишечника [Ohkura et al., 2011]. Использование ретиноевой кислоты может быть полезно в установлении пищевой толерантности при IBD. В литературе обсуждаются и другие способы увеличения содержания Treg клеток in vivo. Так, предполагается, что введение IL-2 может способствовать экспансии антиген-стимулированных Treg клеток. Однако IL-2 является многофункциональным цитокином и может иметь разные последствия. Поэтому рекомендуют его использование в комбинации с другими стратегиями лечения [Miyara et al., 2009a]. Показано, что рапамицин (Sirolimus), ингибитор Akt-mTOR пути, у человека стимулирует in vitro экспансию nTreg через ингибирование пролиферации Т-эффекторных клеток и не препятствует генерации Treg клеток *de novo* из наивных CD4⁺ Т-клеток. К тому же обработка рапамицином предупреждала диабет I типа у NOD мышей [Ohkura et al., 2011]. В другом исследовании продемонстрировано, что трихостатин А, ингибитор гистонной деацетилазы, допускает ацетилирование FOXP3 и поэтому усиливает функционирование и экспансию FOXP3⁺ Treg клеточной популяции [Wing, Sakaguchi, 2010]. Также было показано, что пролиферация антигенстимулированных Treg клеток in vivo и in vitro более устойчива к блокаде костимуляторов анти-CD4, анти-CD40L (CD154) мАТ. Использование этих молекул в присутствии антигена может снижать количество антиген-специфических эффекторных Т-клеток более значительно, чем антиген-специфичных FOXP3⁺ Treg клеток, приводя к доминированию Treg клеток над эффекторными Т-клетками [Miyara et al., 2009а]. Рапамицин, анти-CD4, анти-CD154 мАТ и другие молекулы, которые увеличивают количество антиген-специфичных Treg клеток, могут использоваться в качестве биологических агентов для создания новых препаратов в лечении аутоиммунных заболеваний.

В настоящее время исследователи также активно пытаются найти подходы к усилению экспансии Treg клеток в условиях *in vitro* с целью введения их обратно в организм на моделях аутоиммунных болезней. Но значительных результатов пока не получено, поскольку это связано с выделением чистой популяции аутологичных Treg клеток, что в настоящее время затруднено в связи с отсутствием специфического маркера.

Заключение

Регуляторные Т-клетки играют важную роль в поддержании гомеостаза. В настоящее время определено несколько субпопуляций Treg клеток, описаны молекулы, с помощью которых можно отличать активированные Treg клетки, отделять FOXP3⁺ nTreg клетки от FOXР3⁺ iTreg клеток. Установлено несколько возможных механизмов Treg клеточной супрессии. Тreg клетки могут подавлять активность других типов клеток экспрессией негативных костимуляторных молекул, индукцией противовоспалительных реакций эффекторных Т-клеток и АРС, их лизисом, потреблением факторов роста или продукцией иммунорегуляторных цитокинов. Все описанные механизмы исследованы в основном in vitro, и пока нет ясности, какие же из этих механизмов Treg клетки реализуют in vivo. Скорее всего, для эффективной иммунной супрессии требуется участие целого ряда сложных межклеточных взаимодействий.

Нарушение баланса между Treg клетками и эффекторными Т-клетками приводит к развитию патологий. Так, элиминация или инактивация CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg клеток вызывает аутоиммунные заболевания, а также усиливает иммунный ответ на аллоантигены и опухолевые клетки. С другой стороны, многие исследователи указывают на повышение содержания Treg клеток в опухолевом микроокружении. Эти Treg клетки участвуют в формировании иммуносупрессии, подавляя противоопухолевый иммунный ответ и тем самым поддерживая опухолевую прогрессию. В настоящее время ведется активный поиск способов воздействия на регуляторные Т-клетки с целью их использования в иммунотерапии. Изучение клеточных и молекулярных основ развития и функционирования Treg клеток поможет созданию принципиально новых подходов в практической иммунологии.

Литература

Сорочан П. П., Громакова И. А., Прохач Н. Э. Регуляторные Т-клетки и новые стратегии противоопухолевой иммунотерапии // Международный медицинский журнал. 2009. № 2. С. 85–90.

Ярилин А. А., Донецкова А. Д. Естественные регуляторные Т-клетки и фактор FOXP3 // Иммунология. 2006. № 3. С. 176–188.

Ai W. Z., Hou J.-Z., Zeiser R. et al. Follicular lymphoma B cells induce the conversion of conventional CD4⁺ T cells to T-regulatory cells // Int. J. Cancer. 2009. Vol. 124. P. 239–244.

Bardel E., Larousserie F., Charlot-Rabiega P. et al. Human CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells do not constitutively express IL-35 // J. Immunol. 2008. Vol. 181. P. 6898–6905.

Baron U., Floess S., Wieczorek G. et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3⁺ conventional T cells // Eur. J. Immunol. 2007. Vol. 37, N 9. P. 2378–2389.

Beissert S., Schwarz A., Schwarz T. Regulatory T cells // J. Invest. Dermatol. 2006. Vol. 126. P. 15–24.

Bettini M., Vignali D. A. A. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity // Curr. Opin. Immunol. 2009.Vol. 21, N 6. P. 612–618.

Buckner J. H. Mechanisms of impaired regulation by CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in human autoimmune diseases // Nat. Rev. Immunol. 2010. Vol. 10. P. 849–859.

Campbell D. J., Koch M. A. Phenotypical and functional specialization of FOXP3* regulatory T cells // Nat. Rev. Immunol. 2011. Vol. 11. P. 119–130.

Cao X., Cai S. F., Fehniger T. A. et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance // Immunity. 2007. Vol. 27. P. 635–646.

Caumartin J., Favier B., Daouya M. et al. Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells // The EMBO Journal. 2007. Vol. 26. P. 1423–1433.

Chaturvedi V., Collison L. W., Guy C. S. et al. Cutting Edge: Human regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance // J. Immunol. 2011. Vol. 186, N 12. P. 6661–6666.

Chen X., Zhou B., Li M. et al. CD4*CD25*Foxp3* regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease // Clin. Immunol. 2007. Vol. 123, N 1. P. 50–59.

Choi B. M., Pae H. O., Jeong Y. R. et al. Critical role of heme oxygenase-1 in Foxp3-mediated immune suppression // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. Vol. 327. P. 1066–1071.

Collison L. W., Workman C. J., Kuo T. T. et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function // Nature. 2007. Vol. 450. P. 566–571.

Curiel T. J., Coukos G., Zou L. et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival // Nat. Med. 2004. Vol. 10. P. 942–949.

Dannull J., Su Z., Rizzieri D. et al. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells // J. Clin. Invest. 2005. Vol. 115, N 12. P. 3623–3633.

Elkorda E., Sharma S., Burt D. J., Hawkins R. E. Expanded subpopulation of FoxP3⁺ T regulatory cells in renal cell carcinoma co-express Helios, indicating they could be derived from natural but not induced Tregs // Clin. Immonol. 2011. URL: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S152 1661611001367.

Fantini M. C., Rizzo A., Fina D. et al. Smad7 controls resistance of colitogenic T cells to regulatory T cell-mediated suppression // Gastroenterology. 2009. Vol. 136. P. 1308–1316.e3

Feger U., Luther C., Poeschel S. et al. Increased frequency of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients // Clin. Exp. Immunol. 2007. Vol. 147. P. 412–418.

Fehervari Z., Sakaguchi S. CD4⁺ regulatory cells as a potential immunotherapy // Phil. Trans. R. Soc. B. 2005. Vol. 360. P. 1647–1661.

Filaci G., Fenoglio D., Fravega M. et al. CD8⁺CD28⁻T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers // J. Immunol. 2007. Vol. 179. P. 4323–4334.

Fletcher J. M., Lonergan R., Costelloe L. et al. CD39⁺Foxp3⁺ regulatory T cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis // J. Immunol. 2009. Vol. 183, N 11. P. 7602–7610.

Fritzsching B., Haas J., König F. et al. Intracerebral human regulatory T cells: analysis of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T cells in brain lesions and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients // PLoS ONE. 2011. Vol. 6, N 3. e17988.

Garin M. I., Chu C.-C., Golshayan D. et al. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4⁺CD25⁺ T cells // Blood. 2007. Vol. 109, N 5. P. 2058–2065.

Ghiringhelli F., Puig P. E., Roux S. et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- β –secreting cells inducing CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ regulatory T cell proliferation // JEM. 2005. Vol. 202, N 7. P. 919–929.

Goodman W. A., Levine A. D., Massari J. V. et al. IL-6 signaling in psoriasis prevents immune suppression by regulatory T cells // J. Immunol. 2009. Vol. 183, N 5. P. 3170–3176.

Gri G., Piconese S., Frossi B. et al. CD4[†]CD25[†] regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction // Immunity. 2008. Vol. 29, N 5. P. 771–781.

Grossman W. J., Verbsky J. W., Barchet W. et al. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death // Immunity. 2004. Vol. 21, N 4. P. 589–601.

Han G. M., O'Neil-Andersena N. J., Zurierb R. B., Lawrence D. A. CD4⁺CD25^{high} T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis // Cell. Immunol. 2008. Vol. 253. P. 92–101.

Hawiger D., Wan Y. Y., Eynon E. E., Flavell R. A. Homeodomain only protein is required for the function of induced regulatory T cells in dendritic cell-mediated peripheral T cell unresponsiveness // Nat. Immunol. 2010. Vol. 11, N 10. P. 962–968.

Iwata Y., Matsushita T., Horikawa M. et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell

subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells // Blood. 2011. Vol. 117, N 2. P. 530–541.

Jacobs J. F. M., Idema A. J., Bol K. F. et al. Prognostic significance and mechanism of Treg infiltration in human brain tumors // J. Neuroimmunol. 2010. Vol. 225. P. 195–199.

Janson P. C., Winerdal M. E., Marits P. et al. FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans // PLoS ONE. 2008. Vol. 3. e1612.

Jarnicki A. G., Lysaght J, Todryk S., Mills K. H. G. Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF-β-producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T cells // J. Immunol. 2006. Vol. 177. P. 896–904.

Kiniwa Y., Miyahara Y., Wang H. Y. et al. CD8⁺FOXP3⁺ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer // Clin. Cancer Res. 2007. Vol. 13. P. 6947–6958.

Kleinewietfeld M., Starke M., Mitri D. D. et al. CD49d provides access to «untouched» human Foxp3⁺ Treg free of contaminating effector cells // Blood. 2009. Vol. 113, N 4. P. 827–836.

Kukreja A., Cost G., Marker J. et al. Multiple immuregulatory defects in type 1 diabetes // J. Clin. Invest. 2002. Vol. 109. P. 131–140.

Liang B. T., Workman C., Lee J. et al. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II // J. Immunol. 2008. Vol. 180. P. 5916–5926.

Liu V. C., Wong L. Y., Jang T. et al. Tumor evasion of the immune system by converting CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ T cells into CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF- β // J. Immunol. 2007. Vol. 178. P. 2883–2892.

Long S. A., Cerosaletti K., Bollyky P. L. et al. Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects // Diabetes. 2010. Vol. 59, N 2. P. 407–415.

Mandapathil M., Hilldorfer B., Szczepanski M. J. et al. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells // Journal of Biological Chemistry. 2010. Vol. 285. P. 7176–7186.

Ménétrier-Caux C., Gobert M., Caux C. Differences in tumor regulatory T-cell localization and activation status impact patient outcome // Cancer Res. 2009. Vol. 69. P. 7895–7898.

Michel L., Berthelot L., Pettré S. et al. Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor α-chain are excluded from the analysis // J. Clin. Invest. 2008. Vol. 118. P. 3411–3419.

Miyara M., Wing K., Sakaguchi S. Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FoxP3⁺ regulatory T-cell activation and expansion // J. Allergy Clin. Immunol. 2009a. Vol. 123, N 4. P. 749–755.

Miyara M., Yoshioka Y., Kitoh A. et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor // Immunity. 2009b. Vol. 30. P. 899–911.

Mizukami Y., Kono K., Kawaguchi Y. et al. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3⁺ regulatory T cells in gastric cancer // Int. J. Cancer. 2008. Vol. 122. P. 2286–2293.

Moo-Young T. A., Larson J. W., Belt B. A. et al. Tumor-derived TGF-beta mediates conversion of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in a murine model of pancreas cancer // Journal of Immunotherapy. 2009. Vol. 32. P. 12–21.

Munn D. H. Indoleamine 2, 3-dioxygenase, Tregs and cancer // Curr. Med. Chem. 2011. Vol. 18, N 15. P. 2240–2246.

Nakamura K., Kitani A., Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by cell surface-bound transforming growth factor beta // J. Exp. Med. 2001. Vol. 194. P. 629–644.

Nishikawa N., Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity // Int. J. Cancer. 2010. Vol. 127. P. 759–767.

Ohkura N., Hamaguchi M., Sakaguchi S. FOXP3⁺ regulatory T cells: control of FOXP3 expression by pharmacological agents // Trends in Pharmacological Sciences. 2011. Vol. 32, N 3. P. 158–166.

Onishi Y., Fehervari Z., Yamaguchi T., Sakaguchi S. Foxp3⁺ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation // PNAS. 2008. Vol. 105, N 29. P. 10113–10118.

Probst-Kepper M., Geffers R., Kröger A. et al. GARP: a key receptor controlling FOXP3 in human regulatory T cells // J. Cell. Mol. Med. 2009. Vol. 13, N 9b. P. 3343–3357.

Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M. et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases // J. Immunol. 1995. Vol. 155. P. 1151–1164.

Sakaguchi S., Miyara M., Costantino C. M., Hafler D. A. FOXP3 $^{\scriptscriptstyle +}$ regulatory T cells in the human immune system // Nat. Rev. Immunol. 2010. Vol. 10. P. 490–500.

Salama P., Phillips M., Grieu F. et al. Tumor-infiltrating FOXP3'T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer // J. Clin. Oncol. 2009. Vol. 27. P. 186–192.

Sarris M., Anderson K. G., Randow F. et al. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition // Immunity. 2008. Vol. 28. P. 402–413.

Sather B. D., Treuting P., Perdue N. et al. Altering the distribution of Foxp3⁺ regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease // JEM. 2007. Vol. 204, N 6. P. 1335–1347.

Schneider A., Rieck M., Sanda S. et al. The effector T cells of diabetic subjects are resistant to regulation via CD4⁺FOXP3⁺ regulatory T cells // J. Immunol. 2008. Vol. 181, N 10. P. 7350–7355.

Seki M., Oomizu S., Sakata K. et al. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis // Clin. Immunol. 2008. Vol. 127. P. 78–88.

Shafer-Weaver K. A., Anderson M. J., Stagliano K. et al. Cutting edge: Tumor-specific CD8⁺T cells infiltrating prostatic tumors are induced to become suppressor cells // J. Immunol. 2009. Vol. 183. P. 4848–4852.

Shalev I., Liu H., Koscik C. et al. Targeted deletion of fgl2 leads to impaired regulatory T cell activity and development of autoimmune glomerulonephritis // J. Immunol. 2008. Vol. 180, N 1. P. 249–260.

Shevach E. M. Mechanisms of Foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression // Immunity. 2009. Vol. 30. P. 636–645.

Sojka D. K., Huang Y., Fowell D. J. Mechanisms of regulatory T-cell suppression – a diverse arsenal for a moving target // Immunology. 2008. Vol. 124. P. 13–22.

Stockis J., Colau D., Coilie P. G., Lucas S. Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on surface of activated human Treg // Eur. J. Immunol. 2009. Vol. 39. P. 3315–3322.

Suen J., Li H., Jong Y. et al. Altered homeostasis of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cell subpopulations in systemic lupus erythematosus // Immunology. 2009. Vol. 127. P. 196–205.

Sun X., Wu Y., Gao W. et al. CD39/ENTPD1 expression by CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells promotes hepatic metastatic tumor growth in mice // Gastroenterology. 2010. Vol. 139, N 3. P. 1030–1040.

Swainson L. A., Mold J. E., Bajpai U. D., McCune J. M. Expression of the autoimmune susceptibility gene FcRL3 on human regulatory T cells is associated with dysfunction and high levels of programmed cell death-1 // J. Immunol. 2010. Vol. 184, N 7. P. 3639–3647.

Tan M. C. B., Goedegebuure P. S., Belt B. A. et al. Disruption of CCR5-dependent tumor growth in a murin model of pancreatic cancer // J. Immunol. 2009. Vol. 182. P. 1746–1755.

Tang Q., Adams J. Y., Penaranda C. et al. Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction // Immunity. 2008. Vol. 28, N 5. P. 687–697.

Thornton A. M., Korty P. E., Tran D. Q. et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells // J. Immunol. 2010. Vol. 184, N 7. P. 3433–3441.

Tran D. Q., Andersson J., Hardwick D. et al. Selective expression of latency-associated peptide

(LAP) and IL-1 receptor type I/II (CD121a/CD121b) on activated human FOXP3+ regulatory T cells allows for their purification from expansion cultures // Blood. 2009a. Vol. 113. P. 5125–5133.

Tran D. Q., Andersson J., Wang R. et al. GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009b. Vol. 106. P. 13445–13450.

Vignali D. A. A., Collison L. W., Workman C. J. How regulatory T cells work // Nat. Rev. Immunol. 2008. Vol. 8, N 7. P. 523–532.

Wang R. F. CD8⁺ regulatory T cells, their suppressive mechanisms, and regulation in cancer // Hum. Immunol. 2008, Vol. 69, N 11. P. 811–814.

Wang R., Wan Q., Kozhaya L. et al. Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces Foxp3 expression // PLoS ONE. 2008. Vol. 3, N 7. e2705

Wehrens E. J., Mijnheer G., Duurland C. L. et al. Functional human regulatory T cells fail to control autoimmune inflammation due to PKB/c-akt hyperactivation in effector cells // Blood. 2011. URL: http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/early/2011/08/08/blood-2010-12-328187.abstract.

Wing K., Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity // Nat. Immunol. 2010. Vol. 11, N 1. P. 7–13.

Wu G., Lu Z. H., Gabius H. J. et al. Ganglioside GM1 deficiency in effector T cells from NOD mice induces resistance to regulatory T-cell Suppression // Diabetes. 2011. URL: http://diabetes.diabetesjournals.org/content/early/2011/07/20/db10-1309.abstract.

Yang G., Liu A., Xie Q. et al. Association of CD4[†]CD25[†]Foxp3[†] regulatory T cells with chronic activity and viral clearance in patients with hepatitis B // Int. Immunol. 2007. Vol. 19, N 2. P. 133–140.

Yang Z. Z., Ansell S. M. The role of Treg cells in the cancer immunological response // Am. J. Immunol. 2009. Vol. 5, N 1. P. 17–28.

Zheng J., Liu Y., Qin G. et al. Efficient induction and expansion of human alloantigen-specific CD8 regulatory T cells from naïve precursors by CD40-activated B cells // J. Immunol. 2009. Vol. 183. P. 3742–3750.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Жулай Галина Анатольевна

аспирант Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910 эл. почта: zhgali-111@rambler.ru тел.: (8142) 769810

Олейник Евгения Константиновна

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

тел.: (8142) 769810

Zhulaj, Galina

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences 11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia e-mail: zhgali-111@rambler.ru tel.: (8142) 769810

Oleinik, Evgenia

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences 11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia e-mail: ole@krc.karelia.ru tel.: (8142) 769810 УДК 577.115.3: 591.524.1: 597.2/.5 (98)

ВЛИЯНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ (МАРКЕРОВ ПИЩЕВЫХ ИСТОЧНИКОВ РЫБ) НА МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ В УСЛОВИЯХ ВЫСОКИХ ШИРОТ (Обзор)

С. А. Мурзина, З. А. Нефедова, Н. Н. Немова

Институт биологии Карельского научного центра РАН

В обзоре представлены собственные и литературные данные жирнокислотного состава липидов морских гидробионтов высоких широт, связанных пищевыми отношениями. Установлена отличительная особенность мальков от взрослых рыб люмпена (*Leptoclinus maculatus*) накапливать в течение короткого арктического лета в жировом мешке и мышцах специфические жирные кислоты в составе запасных липидов. Такое запасание энергетических липидов является отражением одного из физиолого-биохимических механизмов адаптации рыб, определяющих дальнейшую жизненную стратегию и оптимальное существование личинок люмпена в условиях Арктики.

Ключевые слова: жирные кислоты, липиды, биохимическая адаптация, морские гидробионты.

S. A. Murzina, Z. A. Nefyodova, N. N. Nemova. EFFECTS OF FATTY ACIDS (BIOMARKERS OF FOOD SOURCES) ON THE MECHANISMS OF FISH ADAPTATION IN HIGH LATITUDES

The review summarizes both the authors' own and published data on the fatty acid composition of lipids in high latitude marine aquatic organisms connected by food relations. Special attention was paid to the content of specific fatty acids in *Leptoclinus maculatus* larvae, distinguishing them from adults. Fry accumulated specific fatty acids, derived from food over the short Arctic summer, in the neutral lipids stored in the lipid sac and muscles. The storage of energy lipids by larvae represents a physiological and biochemical mechanism of fish adaptation, which predetermines the life strategy and guarantees the survival of the larvae in the Arctic.

Key words: fatty acids, lipids, biochemical adaptation, marine aquatic organisms.

Исследования липидного состава организмов, связанных пищевыми отношениями, позволяют проследить пути трансформации и передвижения липидов и их жирнокислотных компонентов по звеньям пищевой цепи, а также определить значение организмов начальных трофических уровней в накоплении липидов. Пищевые цепи в пелагических морских

экосистемах берут начало от фитопланктона (первичных продуцентов), и далее передача и трансформация вещества и энергии осуществляется путем поглощения фитопланктона растительноядными организмами – зоопланктоном – рыбами – до млекопитающих более высоких трофических уровней [Falk-Petersen et al., 1990]. Основным источником, определяю-

щим спектр жирных кислот (ЖК) липидов рыб, является жирнокислотный состав организмов предыдущих трофических уровней [Graeve et al., 1997; Mayzaud et al., 2007]. Качественное и количественное содержание ЖК в тканевых липидах тех или иных видов рыб и их пищевых объектов зависит от ряда физиологических и трофо-экологических факторов среды.

Водные беспозвоночные составляют основную массу питания рыб и поставляют им незаменимые полиненасыщенные ЖК (ПНЖК), такие как линолевая, линоленовая и арахидоновая кислоты, а также отдельные мононенасыщенные ЖК (МНЖК), которые не могут синтезироваться в организме рыб de novo [Falk-Petersen et al., 2001]. Основную часть ПНЖК беспозвоночные зоопланктона (в частности, Calanus spp.) получают с триацилглицеринами (ТАГ) фитопланктона и переводят их в насыщенные, моноеновые ЖК и жирные спирты, которые депонируются в составе ТАГ и восковых эфиров в их теле [Sargent, Henderson, 1986]. Известно, что после полного расходования ТАГ зоопланктоном (в период голодания) в их организме активируются восковые липазы, в результате чего становится возможным потребление эфиров восков [Sargent et al., 1977; Lee et al., 2006]. В организме рыб эфиры восков, поступающие с зоопланктоном, могут вновь трансформироваться в ТАГ.

Длинноцепочечные мононенасыщенные ЖК и спирты (20:1(n-9) и 22:1(n-11)) синтезируются de novo только растительноядными видами Calanus (Calanus glacialis, Calanus finmarchicus и др.), поэтому их можно считать биомаркерами этих организмов [Falk-Petersen et al., 1990; Lee et al., 2006; Graeve et al., 2008]. Для морского зоопланктона незаменимыми считаются 20:5(n-3), 22:6(n-3) кислоты, которые они получают при питании фитопланктоном, и поэтому повышение транспорта энергии (в форме ЖК) от первичных продуцентов к консументам (молодь рыбы) может быть связано с высоким содержанием этих ЖК в фитопланктоне [Muller-Navarra, 2000; Møller, 2006]. В арктических водах в составе фитопланктона доминируют диатомовые водоросли и динофлагелляты. В первой группе водорослей жирные кислоты представлены, в основном, 16:1(n-7) и 20:5(n-3), во второй - 18:4(n-3) и 22:6(n-3) ПНЖК, которые являются биомаркерами этих водорослей [Kattner et al., 1989; Scott et al., 2000, 2002; Lee et al., 2006; Wold et al., 2007; Graeve et al., 2008]. Значительное количество этих кислот обычно накапливается в теле копепод при весеннем цветении фитопланктона [Kattner et al., 1989; Graeve et al., 2008]. Жирные кислоты по пищевой цепи (фитопланктон – зоопланктон) поступают в организм рыб, где они депонируются до момента снижения биопродуктивности фитопланктона (осенью). Накопление специфических жирных кислот такой структуры является одной из главных особенностей рыб арктического региона.

У пелагических рыб синтез жирных кислот С20 и С22 не выявлен, поэтому считается, что в организм рыб они поступают только с пищей [Sargent et al., 1989; Falk-Petersen et al., 1990]. Показано, что рыбы и некоторые животные Арктики накапливают липиды в течение небольшого срока (несколько недель в году), чтобы поддерживать метаболические процессы на оптимальном уровне в течение продолжительного зимнего периода (Kosobokova, 1978; Mumm et al., 1998; Ashjian et al., 2003]. Особенно это относится к депонированию и использованию запасных липидов - ТАГ и эфиров восков. Установлено, что в летний сезон у мальков люмпена из нескольких биотопов северо-западного Шпицбергена в мышцах и липидном мешке преобладали моноеновые ЖК (до 58 и 69 % суммы ЖК, соответственно), среди которых доминировали 20:1(n-9) и 22:1(n-11), а также 16:1(n-7) ЖК, причем уровень первой превалировал в мышцах, а второй - в липидном мешке [Мурзина, 2010]. Основным объектом питания мальков люмпена пятнистого являются растительноядные виды Calanus, в которых ЖК синтезируются de novo [Falk-Petersen et al., 1986b; Graeve et al., 2008]. Отличительной особенностью пелагических мальков люмпена является эффективное накопление (в течение короткого арктического лета) в жировом мешке и мышцах специфических ЖК 20:1(n-9) и 22:1(n-11) в составе ТАГ и восковых эфиров, что свидетельствует о биохимической адаптации на уровне этих специфических кислот. Следует заметить, что жировой мешок мальков – уникальное адаптивное образование тела, в котором накапливаются высокоэнергетические липидные компоненты пищи для последующего использования в течение долгой и продолжительной арктической зимы.

Моноеновые 20:1(n-9), 22:1(n-11) ЖК у мальков крайне слабо используются как структурные компоненты по сравнению с их запасной функцией из-за их физико-химических свойств. Включение этих ЖК в образование липидной матрицы сильно понижает жидкостность мембраны вследствие более высокой температуры плавления кислот. В условиях Арктики при низкой температуре воды наличие данных ЖК в липидном бислое мембраны крайне невыгодно для организма малька [Коупоva,

Caffrey, 1998]. Для тканей антарктических рыб показано, что моноеновые ЖК в составе ТАГ в первую очередь подвергаются окислению по сравнению с длинноцепочечными насыщенными ЖК, и их рассматривают как основной источник энергии в метаболических процессах [Sidell, 1991; Sidell et al., 1995; Sidell, Hazel, 2002]. Специфика окисления жирных кислот, которые входят в состав ТАГ жировой ткани рыб, сводится к их избирательному использованию в отдельные периоды жизни и при разных условиях среды. Как уже отмечалось, корреляция между температурой и жирнокислотным составом липидов проходит через всю пищевую цепь рыб и выражается в увеличении ненасыщенности липидов при более низких температурах [Cossins, Prosser, 1978; Falk-Petersen et al., 1990; Сущик, 2008; Velansky, Kostetsky, 2008]. Высокий уровень липидов у гидробионтов коррелирует с повышенным поступлением кислорода в клетку [Pörtner et al., 2005; Brodte et al., 2008]. Существенная доля пищевых ЖК поступает в запасные липиды -ТАГ или воска в неизменном виде, однако имеются некоторые характерные различия в составе ЖК у отдельных групп рыб, связанные в основном с разным спектром питания. Мальки люмпена из трех биотопов различались уровнем МНЖК в данных органах, что связано с разными биотическими и абиотическими условиями их поступления и расходования.

Пищевые объекты глубоководных гидробионтов по сравнению с пелагическими характеризуются неравномерным распределением. Иногда решающим может стать фактор их доступности. Донные виды рыб, в том числе люмпен пятнистый, отличаются особенностью максимально переваривать и усваивать компоненты, поступающие с пищей, для более полного получения энергии [Drazen et al., 2007] в связи с суровыми условиями среды - низкой температурой, пониженной освещенностью, коротким периодом пищевой обеспеченности. Ранее было показано, что основными объектами питания взрослых рыб семейства Стихеевые, к которому относится люмпен пятнистый, являются донные виды беспозвоночных (в основдекаподы, полихеты **Phyllodoce** groenlandica, P. citrine) и донные литоральные водоросли [Markevich, 2004], а в питании молоди люмпена, в основном, присутствуют копеподы Calanus spp. [Falk-Petersen et al., 1986b; Meyer Ottesen, pers. comm.]. Установлено, что ЖК 18:1(n-9), 18:1(n-7) и 16:1(n-7) – это маркеры для некоторых видов донных организмов: бактерии как один из компонентов донных осадков являются главным источником раз-

ветвленных n-1 моноеновых 18:1(n-9), 18:1(n-7) кислот, образующихся за счет элонгации 16:1(n-7) кислоты [Латышев и др., 2001]. Эти моноены от бактерий и фитопланктона по пищевой цепи переходят к декаподам и полихетам, которые являются основным источником питания взрослого донного люмпена [Sargent, Falk-Petersen, 1981]. Установлено, что у полихет преобладают МНЖК 18:1(n-7), 16:1(n-7), 20:1(n-11). Некоторые виды полихет (Alvinella pompejana, A. caudata) могут десатурировать и удлинять полученные из бактериальной пищи жирные кислоты (например, 18:1(n-7)) для синтеза эссенциальных ЖК (арахидоновой и эйкозапентаеновой), необходимых для организма [Phleger et al., 2005]. Кормовые объекты мальков и взрослого люмпена являются источником специфичного состава ЖК. В жирнокислотном спектре мышц и липидном мешке пелагических мальков доминируют специфические 20:1(n-9), 20:1(n-7), 22:1(n-11), а в мышцах донных взрослых рыб - 18:1(n-9), 18:1(n-7) и 16:1(n-7) ЖК, что указывает на разные кормовые источники (в основном копеподы и полихеты, соответственно). Таким образом, у люмпена пятнистого сформировался ряд биохимических адаптаций, одной из которых является запасание специфических ЖК для поддержания оптимального уровня липидного метаболизма в условиях Арктики.

Несмотря на неспособность синтезировать de novo высоконенасыщенные ЖК, рыбы могут преобразовывать их путем элонгации и десатурации (при активации ферментов). У пресноводных рыб, включая Salmonidae, в большей степени пищевые 18:2(n-6) и 18:3(n-3) кислоты превращаются в более длинноцепочечные 20:4(n-6), 20:5(n-3), 22:6(n-3) кислоты по сравнению с морскими рыбами [Sargent et al., 1995; Peng et al., 2003]. При этом пресноводные рыбы отличаются от морских более низким соотношением (n-3)/(n-6) ПНЖК [Сущик, 2008]. В пресной воде молодой лосось использует в пищу большое число беспозвоночных, богатых 18:2(n-6) и 18:3(n-3) кислотами, но с низким содержанием 20:5(n-3) и 22:6(n-3). В наших исследованиях установлено повышение уровня 20:4(n-6), 20:5(n-3) и 22:6(n-3) кислот у молоди лосося (пестряток 2+ и смолтов) по сравнению с пестрятками 1+, что связано с модификацией жирнокислотного состава пресноводного типа на морской [Pavlov et al., 2009]. Обычно это происходит при подготовке к скату в море [Peng et al., 2003]. Известно, что смолты имеют повышенный уровень длинноцепочечных ПНЖК, что типично для морских рыб [Sheridan et al., 1985; Ogata, Murai, 1989]. Жирные кислоты, несмотря на высокую вариабельность, находятся под контролем генетической программы [Крепс, 1981]. После миграции лосося в море рацион питания сменяется на другие виды беспозвоночных, которые богаты 20:5(n-3) и 22:6(n-3) кислотами [Bell et al., 2001]. Смена рациона питания лососевых рыб при миграции в море влияет на биохимические показатели, в том числе жирнокислотный состав, что можно рассматривать как мобилизацию адаптивных реакций организма для нормального существования рыбы в новых условиях среды.

Из литературы известно, что в условиях низких температур у холодноводных рыб в составе отдельных ФЛ повышается уровень моноеновых 18:1 ЖК, что указывает на их важную роль при температурных адаптациях [Забелинский и др., 1995]. Как показано в других исследованиях, низкая температура среды способствует увеличению степени ненасыщенности липидов, в частности - 22:6(n-3) ЖК в местах локализации мембраносвязанных ферментов. Включение этой кислоты в мембраны представляет один из основных способов быстрого реагирования на любое изменение окружающей температуры и стабилизации липид-белковых взаимодействий в биомембранах жизненно важных систем в течение непродолжительного периода [Рабинович, Рипатти, 1990; Рабинович, 20081.

Имеются сведения, что с увеличением глубины обитания рыб повышается относительное содержание 18:1 ЖК в составе липидов (главным образом ТАГ и ВЭф), а также показатель соотношения моноеновых и полиеновых ЖК [Лапин, Шатуновский, 1981; Petursdottir et al., 2008], что подтверждается и нашим исследованием [Мурзина, 2010]. В мышцах и печени люмпена пятнистого из биотопов, где были отмечены наибольшие глубины, уровень 18:1(n-9) ЖК был достоверно выше (в 1,5 раза), чем у таковых из биотопов с меньшими глубинами. Также установлены вариации в отношении и других моноеновых ЖК (16:1(n-7), 18:1(n-7)). Изменение спектров МНЖК в органах донного люмпена, возможно, связано с влиянием комплекса факторов: абиотических - повышенное давление, малая освещенность, особенности газового режима и солености; биотических качественный и количественный состав пищевых объектов, их доступность. Однако ведущим из них, по нашему мнению, является пищевой фактор.

Рядом исследователей показано, что рыбы холодных вод содержат больше кислот семейства (n-3), которые удовлетворяют их потреб-

ность в незаменимых жирных кислотах в большей степени, чем (n-6) и (n-9) жирные кислоты, уровень которых больше у рыб из теплых вод [Cejas et al., 2004; Villalta et al., 2008]. В исследованных органах взрослого люмпена среди основных полиеновых ЖК семейства (n-3) превалировали две кислоты семейства (n-3) -22:6(n-3) и 20:5(n-3) [Мурзина, 2010], которые являются для морских гидробионтов эссенциальными и поступают с пищей, обеспечивая адаптационные функции клеткам [Забелинский и др., 1995]. При этом установлено, что уровень 20:5(n-3) и 22:6(n-3) ЖК был выше в мышцах, печени и гонадах взрослого люмпена из биотопов с более низкой температурой, повышенной соленостью и давлением [Мурзина, 2010]. Согласно ряду работ [Рабинович, Рипатти, 1994; Рабинович, 2008], одна из основных функций 22:6(n-3) и других ПНЖК состоит в термостабилизации «липидной рубашки» встроенных в мембрану ферментов, способствующей поддержанию условий их оптимального функционирования. В некоторых исследованиях показано, что уровень 22:6(n-3) ЖК в гонадах рыб в меньшей степени зависит от ЖК состава пищи, а связан в основном с развитием ооцитов [Castell, Baghen, 1979; Castell et al., 1994]. В литературе имеются сведения о тесной корреляции между содержанием 22:6(n-3) в липидах половых продуктов производителей и выживаемостью развивающейся икры и личинок рыб [Kaitaranta, Linko, 1984; Tocher, 2003].

Другим фактором, влияющим на уровень ПНЖК в липидах рыб, является естественная подвижность рыб, причем воздействие его менее значительно, чем температурные вариации Шульман, 1981; Юнева, Kanazava, 1997]. По мнению этих авторов, самой метаболически активной из полиеновых кислот является докозагексаеновая 22:6(n-3) ЖК. ее называют «кислотой адаптации». Увеличение количества 22:6(n-3) ЖК в липидах мышц рыб некоторые ученые связывают с усилением двигательной активности [Крепс, 1981; Шульман, Яковлева, 1983; Забелинский и др., 1995]. Например, повышенное содержание 22:6(n-3) кислоты отмечено у тунцов и летучих рыб (до 20,8 % от суммы ЖК), а также в мышцах скумбриевых [Zaboukas et al., 2006], обладающих высокой двигательной активностью. У молоди люмпена Leptoclinus maculatus из разных фьордов в мышцах установлен относительно высокий уровень 22:6(n-3), а также 20:5(n-3), по сравнению с другими ПНЖК, что, возможно, связано с их повышенной двигательной активностью в условиях специфического гидрологического режима акваторий (течение, глубина)

[Мурзина, 2010]. У менее подвижных форм (морские угри, угольная рыба, скорпена, палтус) доля 22:6(n-3) кислоты не превышала 5,8-7,8 % суммы ЖК [Шульман, Юнева, 1990]. В литературе показано также влияние солености и давления на содержание 22:6(n-3) кислоты у рыб [Daikoku et al., 1982; Leray et al., 1984]. Воздействие второго фактора на спектр ЖК, в основном, испытывают глубоководные рыбы, совершающие вертикальные миграции в толще воды. Известно, что пелагические и глубоководные рыбы различаются качеством запасных липидов, которые накапливаются в теле этих рыб, так, пелагические рыбы аккумулируют ТАГ, а донные рыбы – преимущественно восковые эфиры [Falk-Petersen et al., 1986a]. В литературе имеются данные о накоплении значительного количества пишевых 22:6(n-3) ЖК (25-30 % суммы ЖК), а также 20:5(n-3) в мышцах окуня-клювача Sebastes mentella, одного из самых глубоководных видов рыб Северной Атлантики. Эти кислоты поступают в составе ТАГ фитопланктона и в организме окуня-клювача аккумулируются ТАГ мышц [Petursdottir et al., 2008]. Эти авторы также отмечают, что долгоживущие рыбы (Sebastes mentella) с возрастом накапливают 22:6(n-3) ЖК. В более ранних работах было показано, что с возрастом у рыб происходит накопление нейтральных липидов повышается уровень длинноцепочечных ПНЖК [Пашкова, Попова, 1970]. В своих исследованиях мы установили повышение уровня 22:6(n-3) кислоты в ФЛ мышц взрослых люмпенов из биотопов с большими глубинами, соленостью и влиянием течений. Эти изменения могут быть направлены на регуляцию вязкости биомембраны и, соответственно, функциональную активность мембраносвязанных ферментов [Шульман, Юнева, 1990]. Также показано, что 22:6(n-3) и 20:4(n-6) кислоты играют существенную роль в регуляции активности нервных клеток, в формировании зрительной системы у рыб, при их дефиците наблюдаются аномалии в поведенческих реакциях [Bell et al., 1995; Hwang, 2000]. Например, малькам люмпена, обитающим в поверхностных слоях, очень важно быстро реагировать на вероятное приближения хищников, осуществлять поиск пищи, а также ориентировать свое тело в условиях течения и ледового покрова. При этом в условиях высокой солености повышается и уровень 20:4(n-6) ЖК, которая является предшественником биологически активных метаболитов - эйкозаноидов и простагландинов, влияющих на гормональный уровень организма [Гершанович и др., 1991; Сергеева, Варфоломеева, 2006]. Основным путем, обеспечи-

вающим организм арахидоновой 20:4(n-6) кислотой, является ее биосинтез из алиментарного предшественника линолевой 18:2(n-6) кислоты в реакциях элонгации и десатурации. Эффективность этого биосинтеза зависит от количества 18:2(n-6) кислоты в пищевых объектах и от активности участвующих в десатурации и элонгации ферментов [Крутецкая, Лебедев, 1993; Tocher, 2003].

Таким образом, изменение спектров жирных кислот – их качественное и количественное содержание в липидах рыб и их пищевых объектах высоких широт - может быть вызвано рядом факторов: абиотических (температурой, фотопериодом, давлением, соленостью, течением, топографическими особенностями дна), биотических (видовым составом, количеством и доступностью пищи), физиологических (стадией развития, двигательной активностью и др.), степень воздействия которых может различаться в онтогенезе. Среди прочих экологических факторов качественный состав пиши является ведущим параметром, определяющим жирнокислотный состав липидов гидробионтов высших трофических уровней. Специфичность состава жирных кислот - пример компенсаторной адаптации в условиях изменяющихся факторов среды, обеспечивающей нормальную работу всех метаболических процессов. При этом действие факторов среды на организм ослабляется.

Изучение биохимии люмпена пятнистого Leptoclinus maculatus североатлантических и арктических вод проводилось в рамках программы «Ice Edge Programme», которая была поддержана компанией Statoil, the Statoil-ARCTOS Arctic Research Programme (SAARP), a также the University Centre in Svalbard. Norwegian Polar Institute и Scottish Association for Marine Science. Работа поддержана Программой Президента РФ «Ведущие научные школы» (проект НШ - 1642.2012.4), Программой Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых - кандидатов наук (проект МК - 666.2011.4), РФФИ № 11-04-00167_a.

Литература

Гершанович А. Д., Лапин В. И., Шатуновский М. И. Особенности обмена липидов у рыб // Усп. соврем. биологии. 1991. Т. 3, № 2. С. 207–219.

Забелинский С. А., Чеботарева М. А., Бровцына Н. Б., Кривченко А. И. Об «адаптационной специализации» состава и конформационных состояний жирных кислот в мембранных липидах жабр рыб // Журн. эволюц. биохим. физиол. 1995. Т. 31, № 1. С. 28–37.

Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов / Ред. Е. М. Крепс. Л.: Наука, 1981. 339 с.

Крутецкая З. И., Лебедев О. Е. Арахидоновая кислота и ее продукты: пути образования и метаболизма в клетках // Цитология. 1993. Т. 35, № 11/12. С. 3–27.

Лапин В. И., Шатуновский М. И. Особенности состава, физиологическое и экологическое значение липидов рыб // Усп. соврем. биологии. 1981. Т. 92, № 6. С. 380–394.

Латышев Н. А., Хардин А. С., Кияшко С. И. Жирные кислоты как маркеры пищевых источников морских звезд // Докл. АН. 2001. Т. 380, № 5. С. 1–3.

Мурзина С. А. Роль липидов и их жирнокислотных компонентов в биохимических адаптациях люмпена пятнистого Leptoclinus maculatus северо-западного побережья о. Шпицберген: Дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 2010. С. 184.

Пашкова А. А., Попова Л. Я. Липиды и липидный обмен в онтогенезе // Молекулярные и функциональные основы онтогенеза. М.: Наука, 1970. С. 16–21.

Рабинович А. Л. Температурная зависимость конформационных свойств олигомерных цепей природных липидов: компьютерное моделирование // Биофизика. 2008. Т. 53, вып. 3. С. 426–433.

Рабинович А. Л., Рипатти П. О. О конформационных свойствах и функциях докозагексаеновой кислоты // Докл. АНССР. 1990. Т. 314, № 3. С. 752–756.

Рабинович А. Л., Рипатти П. О. Полиненасыщенные углеводородные цепи липидов: структура, свойства, функции // Усп. соврем. биологии. 1994. Т. 114, вып. 5. С. 581–594.

Сергеева М. Г., Варфоломеева А. Т. Каскад арахидоновой кислоты. М.: Народное образование, 2006. 256 с.

Сущик Н. Н. Роль незаменимых жирных кислот в трофометаболических взаимодействиях в пресноводных экосистемах (обзор) // Журн. общ. биол. 2008. Т. 69, № 4. С. 299–316.

Шульман Г. Е., Юнева Т. В. Роль докозагексаеновой кислоты в адаптациях рыб (обзор) // Экол. физиол. биохим. вод. жив. 1990. Т. 26, № 4. С. 43–51.

Шульман Г. Е., Яковлева К. К. Гексаеновая кислота и естественная подвижность рыб // Журн. общей биол. 1983. Т. 44, № 4. С. 529–540.

Ashjian C. J., Campbell R. G., Welch H. T. et al. Annual cycle in abundance, distribution, and size in relation to hydrography of important copepod species in the western Arctic Ocean // Deep-Sea Res. PT I. 2003. Vol. 50. P. 1235–1261.

Bell M. V., Batty R. S., Dick J. R. et al. Dietary deficiency of docosahexaenoic acid impairs at low light intensities in juvenile herring (*Clupea harengus* L.) // Lipids. 1995. Vol. 30, N 5. P. 443–449.

Bell M. V., Dick J. R., Porter A. E. A. Biosynthesis and tissue deposition of docosahexaenoic acid (22:6n-3) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Lipids. 2001. Vol. 36, N 10. P. 1153–1159.

Brodte E., Graeve M., Jacob U. et al. Temperature-dependent lipid levels and components in polar and temperate eelpout (Zoarcidae) fish // Physiol. Biochem. 2008. Vol. 34. P. 261–274.

Castell J. D., Bell J. G., Tocher D. R., Sargent J. R. Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic and docosahexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) // Aquaculture. 1994. Vol. 128. P. 315–333.

Castell J. D., Boghen A. Fatty acid metabolism in juvenile lobsters (Homarus americanus) fed a diet low in methionine and histidine // Proc. 10th Ann. Workshop. World Maricult. Soc. 1979. 10. P. 720–727.

Cejas J. R., Almansa E., Jerez S. et al. Changes in lipid class and fatty acid composition during development in white seabream (*Diplodus sargus*) eggs and larvae // Comp. Biochem. Physiol. Part B. 2004. Vol. 139. P. 209–216.

Cossins A. R., Prosser C. L. Evolutionary adaptation of membranes to temperature // Proc. Natl. Acad. of Sci. USA. 1978. Vol. 75, N 4. P. 2040–2043.

Daikoku T., Yano I., Masuf M. Lipid and fatty acid composition and their changes in the different organs and tissues of guppy *Poceilia reticulate* on sea water adaptation // Comp. Biochem. Physiol. 1982. Vol. 73A, N 2. P. 167–174.

Drazen J. C., Reisenbichler K. R., Robison B. H. A comparison of absorption and assimilation efficiencies between four species of shallow-and deepliving fishes // Mar. Biol. 2007. Vol. 151, N 4. P. 1551–1558.

Falk-Petersen I. B., Falk-Petersen S., Sargent J. R. Nature, Origin and Possible Roles of Lipid Deposits in Maurolicus muelleri (Gmelin) and Benthosema glaciale (Reinhart) from Ullsfjorden, Northern Norway // Polar Biol. 1986a. Vol. 5, N 4. P. 235–240.

Falk-Petersen S., Falk-Petersen I. B., Sargent J. R. Structure and function of an unusal lipid storage organ in the Arctic fish *Lumpenus maculatus* FRIES // Sarsia. 1986b. Vol. 71, N 1. P. 1–6.

Falk-Petersen S., Hopkins C. C. E., Sargent J. R. Trophic relationships in the pelagic, arctic food web // Proc. 24th Europ. Mar. Biol. Symp. 1990. P. 315–333.

Falk-Petersen S., Sargent J. R., Kwasniewski S. et al. Lipids and fatty acids in Clione limacina and Limacina helicina in Svalbard waters and the Arctic Ocean: Trophic implications // Polar Biol. 2001. Vol. 24, N 3. P. 163–170.

Graeve M., Kattner G., Piepenburg D. Lipids in Arctic benthos: does the fatty acid and alcohoi composition reflect feeding and trophic interactions? // Polar Biol. 1997. Vol. 18, N 1. P. 53–61.

Graeve M., Lundberg M., Boer M. et al. The fate of dietary lipids in the Arctic ctenophore Mertensia ovum (Fabricius 1780) // Mar. Biol. 2008. Vol. 153, N 4. P. 643–651.

Hwang D. Fatty acids and immune responses – a new perspective in searching for clues to mechanisms // Annu. Rev. Nutr. 2000. Vol. 20. P. 431–456.

Kaitaranta J. K., Linko R. R. Fatty acids in the roe lipids of common food fishes // Comp. Biochem. Physiol. 1984. Vol. 79B, N 3. P. 331–334.

Kanazawa A. Effects of docosahexaenoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish // Aquaculture. 1997. Vol. 155, N 1–4. P. 129–134.

Kattner G., Hirche H. J., Krause M. Spatial variability in lipid composition of calanoid copepods from Fram Strait, the Arctic // Mar. Biol. 1989. Vol. 102, N 4. P. 473–480.

Kosobokova K. N. Diurnal vertical distribution of Calanus hyperboreus Kroyer and Calanus glacialis Jaschnov in the Central Polar basin // Oceanology. 1978. Vol. 18. P. 476–480.

Koynova R., Caffrey M. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines // Biochim. et Biophys. Acta. 1998. Vol. 1376. P. 91–145.

Lee R. F., Hagen W., Kattner G. Lipid storage in marine zooplankton // Mar. Ecol. Prog. Ser. 2006. Vol. 307. P. 273–306.

Leray C., Chapelia S., Duportail G., Florentz A. Changes in fluidity and 22:6(n-3) content in phospholipids of trout in testinal brush-border membrane as related to environmental salinity // Biochim. et Biophys. Acta: Biomembranes. 1984. Vol. 778 (M124), N 2. P. 233–238.

Markevich A. I. Pattern of night activity in the Prickleback fish *Enrogrammus hexagrammus //* Russ. J. Mar. Biol. 2004. Vol. 30, N 3. P. 204–208.

Mayzaud P., Boutoute M., Perissinotto R., Nichols P. Polar and Neutral Lipid Composition in the Pelagic Tunicate Pyrosoma atlanticum // Lipids. 2007. Vol. 42, N 7. P. 647–657.

Møller P. Lipids and staible isotopes in marine food webs in West Greenland. Trophic relations and heath implications. PhD thesis. Tromso, 2006. 216 p.

Muller-Navarra D. C., Brett M. T., Liston A. M., Goldman C. R. A highly unsaturated fatty acid predicts carbon transfer between primary producers and consumers // Nature. 2000. Vol. 403. P. 74–77.

Mumm N., Auel H., Hanssen H. et al. Breaking the ice: large-scale distribution of mesozooplankton after a decade of arctic and transpolar cruises // Polar biol. 1998. Vol. 20. P. 189–197.

Ogata H., Murai T. Effects of dietary fatty acid composition on growth and smolting of underyearling Masu salmon, Oncorhynchus masu // Aquaculture. 1989. Vol. 82, N 1–4. P. 181–190.

Pavlov D. S., Nefedova Z. A., Veselov A. E. et al. Age dynamics of lipid status of juveniles of Atlantic salmon (Salmo salar L.) from the Varzuga river // J. Ichthyol. 2009. Vol. 49, N 11. P. 1073–1080.

Peng J., Larondelle Y., Pham D. et al. Polyunsaturated fatty acid profiles of whole body phospholipids and triacylglycerols in anadromous and landlocked Atlantic salmon (Salmo salar L.) fry // Comp. Biochem. Phys. B. 2003. Vol. 134. P. 335–348.

Petursdottir H., Gislason A., Falk-Petersen S. Lipid classes and fatty acid compositions of muscle, liver and skull oil in deep-sea redfish Sebastes mentella over the Reykjanes Ridge // J. Fish Biol. 2008. Vol. 73, N 10. P. 2485–2496.

Phleger C. F., Nelson M. M., Groce A. K. et al. Lipids, fatty acid and sterol composition of the deep sea hydrothermal vent polychaete annelids – Alvinella pompejana, A. caudate, Paralvinella grasslei and Hesiolyra bergii // Deep sea Res. PT I. 2005. Vol. 52. P. 2333–2352.

Pörtner H.-O., Lucassen M., Storch D. Methabolic biochemistry: Its role in thermal tolerance and in the capacities of physiological and ecological function / Eds. Steffensen J. F., Farrell A. P., Hoar W. S. et al. San Diego: Elsevier/Academic Press, 2005. P. 79–154.

Sargent J. R., Falk-Petersen S. Ecological investigations on the zooplankton community in Balsfjorden, northen Norway: Lipids and fatty acids in Meganyctiphanes norvegica, Thysanoessa raschi and T. inermis during mid-water // Mar. Biol. 1981. Vol. 62, N 2–3. P. 131–137.

Sargent J. R., Henderson R. J. Lipids // Eds. E. D. S. Corner, S. O'Hara. Biological chemistry of marine copepods. Oxford: University Press, 1986. P. 59–108.

Sargent J. R., Gatten R. R., Corner E. D. S., Kilvington C. C. On the nutrition and metabolism of zooplankton. XI. Lipids in Calanus helgolandicus grazing Biddulphia sinensis // J. Mar. Biol. Ass. 1977. Vol. UK 57. P. 525–533.

Sargent J. R., Henderson J. R., Tocher D. R. The Lipids // Ed. J. E. Halver. Fish Nutrition. N. Y.: Acad. Press, 1989. P. 154–218.

Sargent J. R., Bell J. G., Bell M. V. et al. Dietary origins and functions of long-chain (n-3) polyunsaturated fatty acids in marine fish // J. Mar. Biotechnol. 1995. Vol. 3. P. 26–28.

Scott C. L., Kwasniewski S., Falk-Petersen S. et al. Lipids and life strategies of Calanus finmarchicus, Calanus glacialis and Calanus hyperboreus in late autumn, Kongsfjorden, Svalbard // Polar Biol. 2000. Vol. 23, N 7. P. 510–516.

Scott C. L., Kwasniewski S., Falk-Petersen S. et al. Species differences, origins and functions of fatty alcohols and fatty acids in the wax esters and phospholipids of Calanus hyperboreus, C. glacialis and C. finmarchicus from Arctic waters // Mar. Ecol. Prog. Ser. 2002. Vol. 235. P. 127–134.

Sheridan M. A., Allen W. V., Kersteller T. H. Changes in the fatty acid composition of steelhead trout Salmo gairdneri Richardson associated with parr smolt transformation // Comp. Biochem. Physiol. 1985. N 80 B. P. P. 671–676.

Sidell B. D. Physiological roles of high lipid content in Tissues of Antarctic fish species // Eds. G. di Prisco, B. Maresca, B. Tota. Biology of Antarctic fish. N. Y.; Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1991. P. 220–231.

Sidell B. D., Hazel J. R. Triacylglycerol lipase actives in tissue of Antarctic fishes // Polar Biol. 2002. Vol. 25, N 7. P. 517–522.

Sidell B. D., Crockett E. L., Driedzic W. R. Antarctic fish preferentially catabolize monoenoic fatty acids // J. Expt. Zool. 1995. Vol. 271, N 2. P. 73–81.

Tocher D. R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in Teleost fish // Reviews in Fisheries Science. 2003. Vol. 12, N 2. P. 107–182.

Velansky P. V., Kostetsky E. Ya. Lipids of marine cold-water fishes // Russ. J. Mar. Biol. 2008. Vol. 34, N 1. P. 51–56.

Villalta M., Estevez A., Bransden M. P., Bell J. G. Effects of dietary eicosapentaenoic acid on growth, survival, pigmentation and fatty acid composition in

Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the *Artemia* feeding period // Aquacul. Nutr. 2008. Vol. 14, N 4. P. 232–241.

Wold A., Leu E., Walkusz W., Falk-Petersen S. Lipids in copepodite stages of *Calanus glacialis //* Polar Biol. 2007. Vol. 30, N 5. P. 655–658.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Мурзина Светлана Александровна

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

эл. почта: murzina.svetlana@gmail.com

тел.: (8142) 571879

Нефедова Зинаида Анатольевна

ведущий научный сотрудник, к. б. н. Институт биологии Карельского научного центра 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, чл.-корр. РАН, д. б. н. Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: nemova@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 783615

Zaboukas N., Miliou H., Megalofonou P., Moraitou-Apostolopoulou M. Biochemical composition of the Atlantic bonito Sarda sarda the Aegean Sea (eastern Mediterranean Sea) in different stages of sexual maturity // J. Fish Biol. 2006. Vol. 69. P. 347–362.

Murzina, Svetlana

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

Nefyodova, Zinaida

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

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.9: 502.172: 502.11 (470.22)

ВЛИЯНИЕ ТОКСАСКАРИДОЗНОЙ ИНВАЗИИ НА ХОЗЯЙСТВЕННО-ПОЛЕЗНЫЕ ПРИЗНАКИ ПЕСЦОВ (ALOPEX LAGOPUS) КЛЕТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ

Л. В. Аникиева, Н. Н. Тютюнник, В. С. Аниканова

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Изучено влияние нематоды *Toxascaris leonina* на массу тела и качество шкурок песцов. Показано, что при дозах заражения песцов 10 и 100 яйцами *T. leonina* средние значения массы подопытных и контрольных зверей достоверно не отличаются. Повышение дозы заражения до 1 тыс. яиц нарушает сложившиеся отношения и сдвигает равновесие паразито-хозяинной системы во вред хозяину. Уменьшение массы тела у зверей отрицательно сказывается на размерах шкурок, их качестве и реализационной цене. Сделан вывод о том, что система «паразит *T. leonina* – хозяин *Alopex lagopus*» в условиях клеточного содержания песцов обладает широкими адаптационными возможностями.

Ключевые слова: нематода *Toxascaris leonina*, доза заражения, песец, масса тела, качество шкурок.

L. V. Anikieva, N. N. Tyutyunnik, V. S. Anikanova. EFFECT OF THE TOXASCARIS INFECTION ON THE COMMERCIAL VALUES OF CAGED POLAR FOXES (*ALOPEX LAGOPUS*)

We investigated the effect of the nematode *Toxascaris leonina* on the body weight and pelt quality of Arctic foxes. When the infective dose was 10 and 100 *T. leonina* eggs the average weight of the animals in the treatments and the control did not differ significantly. Increase of the infective dose to 1000 eggs upsets the existing relationships and shifts the balance in the host-parasite system to the detriment of the host. Loss in the body weight tells negatively on the skin dimensions, quality, and commercial value. Our conclusion is that the host-parasite system of *Alopex lagopus – T. leonina* in cage rearing of Arctic foxes has an extensive adaptation potential.

 ${\sf Keywords:}$ nematode ${\it Toxascaris leonina},$ infective dose, Artic fox, body weight, pelt quality.

Введение

Паразитарные инвазии плотоядных животных - одна из актуальных проблем современности. У плотоядных животных зарегистрировано более 80 видов гельминтов, из которых 32 патогенны для человека и 26 - для живот-Наиболее распространены нематоды ных Toxocara canis. Toxascaris leonina. Uncinaria stenocephala. цестоды Dipylidium caninum, Echinococcus granulosus, Spirometra, Taenia milticeps, трематоды Fasciola hepatica gigantica, Opisthorchis felineus [Дубина, 2003]. В трансформированных биоценозах сохраняются источники инвазии, факторы передачи и восприимчивые к паразитарным инвазиям животные. Распространению паразитарных заболеваний, в том числе и передаваемых от животных к человеку, способствует наблюдающееся в последние десятилетия увеличение численности домашних животных (собак и кошек). По данным В. В. Горохова [1996]. А. Н. Воличева и В. В. Горохова [1999], в Москве обитает свыше 250 тыс. собак, объем фекалий от них превышает более 54 т в день, в 1 г фекалий инвазированных животных может находиться до 40 тыс. яиц гельминтов. Детские песочницы в городе на 10-11 % заражены яйцами гельминтов. Заносом неспецифичных паразитов, которые могут явиться источником заражения ценных видов пушных зверей, сопровождается акклиматизация и интродукция животных. Вместе с акклиматизированной енотовидной собакой, естественный ареал которой ограничен Уссурийским краем, в европейскую часть России занесена нематода Molineus patens (Матевосян, 1964). Одомашнивание диких собачьих (лисицы, песца, енотовидной собаки) и разведение их на фермах приводит к появлению устойчивых ассоциаций паразитов, которые вызывают заболевания с атипичным течением, невыраженными клиническими признаками и даже гибель животных [Шустрова, 20031.

Токсаскаридоз является одним из важнейших гельминтозов плотоядных животных. В течение длительного времени его традиционно связывали с домашними собаками и кошками. Становление звероводства привело к распространению токсаскаридоза среди пушных зверей, содержащихся в неволе. В литературе накоплено большое количество данных, отражающих различные аспекты изучения этого заболевания. Возбудителем токсаскаридоза является нематода *Тохаscaris leonina* Leiper 1907, которая паразитирует в тонком отделе кишечника животных. Нематода развивается по аска-

ридиоидному типу: яйца дозревают во внешней среде, из проглоченных яиц в двенадцатиперстной кишке выходят личинки, которые внедряются в слизистую оболочку кишечника, дважды линяют, а затем выходят в просвет кишечника и там достигают половой зрелости [Мозговой, 1953]. Заболевание распространено почти повсеместно. Кошки болеют в возрасте 3-6 месяцев и старше. Собаки подвержены инвазии в возрасте 6-12 месяцев. В зверохозяйствах нематода наиболее часто встречается у молодняка (до 95 %). Зараженность зверей основного стада значительно ниже и не превышает 30 %. Интенсивность инвазии у животных колеблется от 1 до 39 гельминтов, в среднем на 1 зверя составляет 7-9 экз. [Токсаскаридоз песцов, 1984]. Изучены патогенное влияние и клинические признаки заболевания [Берестов. Родюков, 1981; Токсаскаридоз песцов, 1984; Акимова, 2006; Дементьев, Казанина, 2009 и др.], неспецифические факторы иммунитета [Аникиева и др., 2009]. Выявлены экологические адаптации Toxascaris leonina к обитанию в искусственных условиях содержания хозяина [Аникиева, Аниканова, 2004]. Сведения о влиянии токсаскаридозной инвазии на хозяйственно-полезные признаки плотоядных животных немногочисленны. Они имеют в основном описательный характер и ограничиваются сообщениями о том, что «болезнь приводит к исхуданию, ослаблению организма и соответственно к понижению ценности мехового сырья» [Дементьев, Казанина, 2009]. Некоторые данные содержатся в книге «Токсаскаридоз песцов» [1984]. Специальные работы отсутствуют.

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение влияния нематоды *Т. leonina* на продуктивные качества песцов.

Материал и методы

Опыт поставлен на щенках голубых песцов в возрасте трех месяцев. Из 40 щенков, взятых из родственных пометов, были сформированы 4 группы. Первой группе щенков было задано по 10 инвазионных яиц нематоды, второй - по 100, третьей – по 1 тыс. яиц, четвертая группа служила контролем. Животные находились на общехозяйственном рационе и содержались индивидуально в условиях, исключающих возможность спонтанной инвазии. Щенков взвешивали перед заражением, затем через 1 и 2 месяца после заражения. Оценку качества опушения, окраски и размеров проводили в период полного созревания опушения - в октябре. В бонитировочном ключе учитывали требования по всем оцениваемым признакам. Товароведческую оценку шкурок проводили после забоя зверей (ГОСТ 7907-69). Шкурки подразделяли по сортам, дефектности, цвету и размеру. По окраске волосяного покрова шкурки делили на 3 цвета: экстра, первый и второй. По размерам шкурки делили на 2 группы: отборный (длина шкурки 80 см и более, ширина не менее 12,5 см) и первый (длина от 79 см и менее, ширина не менее 12,5 см). По дефектам в пределах каждого сорта шкурки делили на три группы: «малый дефект», «средний дефект» и «большой дефект».

Определение степени влияния токсаскаридозной инвазии на аномальное протекание беременности (прерывание беременности, каннибализм) проводилось на взрослых самках, отобранных из общего стада. Прерывание беременности зарегистрировано у 150 зверей, из которых 23 % были заражены нематодами *Т. leonina*. Связь проявления каннибализма песцов с зараженностью аскаридами рассмотрена на 100 зверях, 50 из которых воспитали потомство, а 50 съели помет полностью или частично. Экстенсивность заражения нематодой Т. leonina составила 14 %. Материал обработан статистически методом качественного дисперсионного анализа [Плохинский, 1960]. Выбор данного метода обусловлен тем, что дисперсионный анализ позволяет устанавливать не только достоверность, но и силу влияния как гельминтозов, так и неучитываемых факторов.

Результаты

В начале эксперимента масса тела контрольных и подопытных самцов была сходной. Через месяц после заражения средние значения массы тела самцов были на 1-10 % ниже, чем в контроле. Минимальная масса обнаружена у самцов с дозой заражения 1 тыс. яиц. Через 2 месяца после заражения у подопытных самцов отклонения от контроля были менее выражены, а средние показатели массы тела щенков с дозой заражения 10 яиц были даже немного выше, чем у контрольных (рис. 1). Анализ значений прироста массы тела показал, что зараженные животные отличались от контрольных. В течение первого месяца наблюдений их привес был на 5-37 % ниже, чем у контрольных. В течение второго месяца привес у опытных щенков превышал привес у контрольных на 30-60 %. Наибольшие отклонения от контроля наблюдались у щенков с дозой заражения 100 и 1 тыс. яиц (рис. 2).

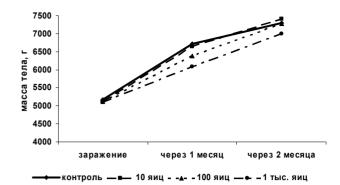


Рис. 1. Влияние токсаскаридозной инвазии на массу тела самцов песцов

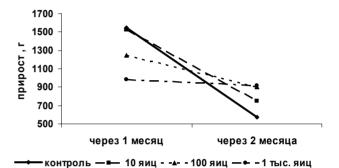


Рис. 2. Показатели прироста массы тела опытных и контрольных самцов, г

Средние значения массы тела контрольных и подопытных самок в начале эксперимента различались на 4 %. Через месяц после заражения различия составили от 1 до 9 %. Наиболее близкие показатели к контролю были у самок с дозой 100 яиц. Минимальная масса обнаружена у щенков с дозой 1 тыс. яиц. Отклонения от контроля у подопытных самок, так же как и у самцов, были менее выражены через 2 месяца после заражения. Средние показатели массы тела были выше у самок с дозой заражения в 100 яиц, чем у контрольных (рис. 3). Показатели прироста зараженных самок по сравнению с контролем за первый месяц наблюдений варьировали от +12 % (вторая группа щенков с дозой 100 яиц) до -29 % (третья группа щенков с дозой 1 тыс. яиц). В течение второго месяца привес у опытных щенков превышал привес у контрольных на 17-38 %. Наибольшие отклонения от контроля, так же как и у самцов, наблюдались у самок с дозой заражения 100 и 1 тыс. яиц (рис. 4).

Оценка товарного качества шкурок показала, что шкурки зверей с дозами 10 и 100 яиц имели высокие значения цвета (экстра) и крупные размеры. Звери с дозой заражения 1 тыс. яиц отличались от контроля самым низким процентом шкурок с цветом «экстра» и меньшими размерами шкурок (рис. 5, 6).

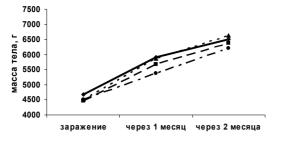


Рис. 3. Влияние токсаскаридозной инвазии на массу тела самок

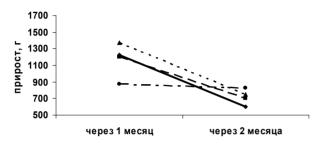


Рис. 4. Показатели прироста массы тела опытных и контрольных самок, г

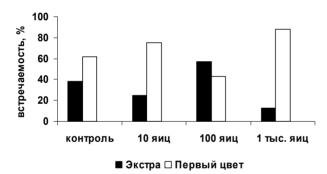


Рис. 5. Влияние токсаскаридозной инвазии на окраску волосяного покрова песцов

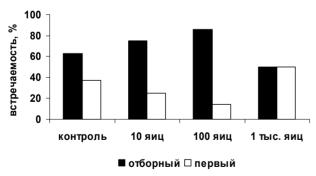
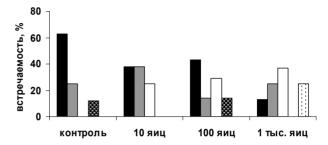


Рис. 6. Влияние токсаскаридозной инвазии на размер шкурок песцов

Дефекты опушения (потертость, неразвитость ости) обнаружены как в контрольной, так и в опытных группах песцов. Однако шкурки зараженных зверей имели большее число дефектиру править пражения п

тов. Звери с дозой заражения 10 яиц имели малые и средние дефекты шкурок, с дозой 100 яиц – малые, средние и большие дефекты. Самую низкую качественную оценку получили шкурки зверей с дозой заражения 1 тыс. яиц, которые имели плохое опушение и отсутствие ости по хребту (рис. 7). Шкурки контрольных и подопытных зверей с дозами заражения 10 и 100 яиц имели высокую реализационную цену. Шкурки, полученные от зверей с дозой заражения 1 тыс. яиц, были оценены на 25 % ниже, чем контрольные.



■ без дефектов 🗎 малый 🗆 средний 🛭 большой 🖸 брак

Рис. 7. Влияние токсаскаридозной инвазии на дефекты опушения песцов

На основании дисперсионного анализа степени влияния T. leonina на аномальное протекание беременности самок установлено, что из общей суммы факторов, прерывающих беременность, токсаскаридоз составляет 5%, а вызывающих каннибализм -9% (P>0,99).

Обсуждение

В течении токсаскаридоза выделяют два периода: острый и хронический. Острый период совпадает тканевой фазой развития С T. leonina. Его продолжительность составляет около одного месяца. Хронический период связан с паразитированием взрослых нематод в просвете кишечника животных. Клиническими признаками токсаскаридоза чаще всего являются изменения со стороны желудочно-кишечного тракта: рвота, поносы, сменяющиеся запорами. В крови больных животных уменьшается концентрация гемоглобина, эритроцитов, общего белка, альбуминов, в кишечнике падает активность ферментов энтерокиназы и щелочной фосфатазы [Токсаскаридоз песцов, 1984; Акимова, 2006]. Повреждение слизистой оболочки кишечника приводит к нарушению всасывания питательных веществ, нарушается минеральный обмен, снижается усваиваемость фосфора. Снижение поедаемости корма связано с общим понижением пищеварения, ослаблением секреторной деятельности кишечника, а также моторно-эвакуаторной функции пищеварительного тракта [Дементьев, Казанина, 2009]. При интенсивной инвазии отмечают истощение, симптомы поражения нервной системы. Опасно протекает токсаскаридоз у беременных и лактирующих самок [Краткий справочник зверовода, 1974; Берестов, Родюков, 1981].

Проведенные нами исследования позволили получить новые данные, расширяющие существующие представления о токсаскаридозе как заболевании плотоядных животных. Нами установлено, что токсаскаридозная инвазия влияет на хозяйственно-полезные признаки песцов - массу тела, качество волосяного покрова и продуктивность. Показано, что наибольшие отклонения в приросте массы тела песцов соответствуют острому периоду заболевания. В хронический период темп прироста массы зараженных щенков выше, чем у свободных от токсаскаридоза животных, однако отставание в массе тела может сохраняться и в этот период. Наиболее остро реагируют на токсаскаридоз и более подвержены влиянию нематоды самцы. Реакция самок более разнообразна, но размах отклонений от нормы менее выражен, чем у самцов. Наличие токсаскаридозной инвазии в зверохозяйствах является одним из факторов, снижающих воспроизводство песцов.

Использование градуально повышающихся доз позволило выделить уровень заражения, при котором снижается масса тела и качество волосяного покрова песцов. Нами установлено, что при дозах заражения песцов 10 и 100 яйцами *Т. leonina* средние значения массы тела подопытных и контрольных зверей близки. Шкурки контрольных и подопытных зверей с низкой и средней дозами заражения имеют высокую реализационную цену. Минимальный привес обнаружен у щенков с дозой 1 тыс. яиц. Шкурки этой группы отличаются более мелкими размерами, имеют плохое опушение и низкую реализационную цену.

Полученные нами данные показывают, что система «паразит *T. leonina* – хозяин *Alopex lagopus*» в условиях клеточного содержания песцов обладает широкими адаптационными возможностями. При низкой интенсивности заражения *T. leonina* не оказывает выраженного патологического действия на массу тела и качество пушнины песцов. Повышение дозы заражения до 1 тыс. яиц нарушает сложившиеся отношения и сдвигает равновесие паразитохозяинной системы во вред хозяину. Уменьшение живой массы тела у зверей отрицательно сказывается на размерах шкурок и их качестве.

Известно, что воздействие паразита на хозяина зависит от вида гельминта, его морфофизиологических особенностей и вирулентности. Кроме того, оно определяется видовой спецификой хозяина и высотой его организации. Характер взаимоотношений устанавливается в пределах определенной исторически сложившейся системы «паразит - хозяин» [Догель, 1962; Шульц, Гвоздев, 1972]. Нематода T. leonina - паразит хищных млекопитающих семейств собачьих и кошачьих. Широкий набор адаптивных приспособлений к обитанию в разнообразных условиях определяет всесветное распространение нематоды. Среди важнейших из них - способность к длительному продуцированию яиц, их относительно быстрое развитие до инвазионного состояния по сравнению с другими видами аскарид и высокая устойчивость к действию неблагоприятных факторов. Эти особенности создают возможность постоянной циркуляции паразита как в природе, так и в условиях искусственного содержания хозяев [Аникиева, Аниканова, 2004]. В организме хозяина инвазия сохраняется как в пассивной форме (латентные личинки), так и в активной (взрослые гельминты, продуцирующие яйца). В регуляции паразито-хозяинных отношений при токсаскаридозе песцов ведущую роль играет хозяин, который ограничивает численность нематод, замедляет или прекращает развитие мигрирующих личинок. Напряженность ответных реакций хозяина определяется дозой заражения и стадией развития нематоды. При заражении песцов 10 яйцами система сохраняет относительную сбалансированность. У хозяина повышены показатели естественной защиты организма. При дозе заражения 100 яиц равновесие нарушается, за счет угнетения паразитов сохраняется гомеостаз хозяина. Доза 1000 яиц является пороговым значением, при котором обостряются как межвидовые отношения между паразитом и хозяином, так и внутривидовые отношения *T. leonina* [Аникиева и др., 1990, 2009].

В повышении эффективности производства важное место занимает разработка принципов, методов и механизмов реализации интегрированной системы ветеринарного контроля. Особенностью гельминтозов является чрезвычайное разнообразие клинических проявлений от бессимптомного (субклинического) течения до тяжелых проявлений с летальным исходом. Изучение паразито-хозяинных отношений на примере системы «Т. leonina – Alopex lagopus» показывает, что знание особенностей биологии паразита, уровня и интенсивности заражения хозяина занимает ключевые позиции в

оценке патогенеза паразитарных заболеваний, а также в разработке и применении мер профилактики и лечения.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.

Литература

Акимова С. А. Токсокароз и токаскаридоз плотоядных в Нижнем Поволжье. Эпизоотология, патогенез и лечение: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Иваново, 2006. 25 с.

Аникиева Л. В., Аниканова В. С. Экологические адаптации паразитов к обитанию в условиях искусственного содержания хозяев // Проблемы экологической физиологии пушных зверей. Вып. 3. Петрозаводск, 2004. С. 161–170.

Аникиева Л. В., Аниканова В. С., Осташкова В. В. Паразито-хозяинные отношения при токсаскаридозе песцов // Паразитология. 1990. Т. 24, вып. 3. С. 225–231.

Аникиева Л. В., Тютюнник Н. Н., Аниканова В. С. Роль гуморальных факторов естественной защиты при токсаскаридозе песцов // Труды Карельского НЦ РАН. 2009. № 3. С. 4–7.

Берестов А. А., Родюков А. П. Возрастная динамика и некоторые вопросы патогенеза токсаскаридоза песцов // Биология и патология пушных зверей: Тез. докл. к III Всесоюз. конф. (23–26 июня 1981 г.). Петрозаводск, 1981. С. 259.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Аникиева Лариса Васильевна

ведущий научный сотрудник, д. б. н. Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: anikieva@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 762706

Тютюнник Николай Николаевич

главный научный сотрудник, д. с.-х. н., профессор Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: tyutyunnik@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 573107

Аниканова Валентина Семеновна

к. б. н.

Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

тел.: (8142) 762706

Воличев А. Н., Горохов В. В. Гельминты и простейшие плотоядных в мегаполисе Москвы // Ветеринар. 1999. № 11. С. 7–9.

Горохов В. В. Проблемы паразитарных болезней в современных условиях // Ветеринар. 1996. № 7. С. 8–17.

Дементьев Е. П., Казанина М. А. Изменение обмена веществ у плотоядных при гельминтозах // Успехи современного естествознания. 2009. № 2. С. 80-81.

Догель В. А. Общая паразитология. Л.: ЛГУ, 1962. 463 с.

Дубина И. Н. Дифференциальная диагностика гельминтозов у собак // Ветеринар. 2003. № 5. С. 10–16.

Краткий справочник зверовода / Под ред. В. А. Берестова. Петрозаводск: Карелия, 1974. 459 с.

Матевосян Е. М. К познанию гельминтофауны енотовидной собаки Myctereutes procyonoides // Труды Мордовского заповедника. 1964. Вып. 2. С. 274–277.

Мозговой А. А. Аскаридаты животных и человека и вызываемые ими заболевания // Основы нематологии. Т. 2. М.: Изд-во АН СССР, 1953. 351 с.

Плохинский Н. А. Дисперсионный анализ. Новосибирск: Сиб. отд. АН СССР, 1960. 124 с.

Токсаскаридоз песцов / Под ред. В. А. Берестова. Петрозаводск: Карелия, 1984. 109 с.

Шульц Р. С., Гвоздев Е. В. Основы общей гельминтологии. Т. II. М.: Наука, 1972. 512 с.

Шустрова М. В. Отношения в системе хозяин – паразит при некоторых микстинвазиях плотоядных животных // Материалы IX Московского ветеринарного конгресса. 2003. С. 42–43.

Anikieva, Larisa

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

Tyutyunnik, Nikolai

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

Anikanova, Valentina

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences 11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia tel.: (8142) 762706 УДК 581.1: 633.16: 546.48

НАКОПЛЕНИЕ КАДМИЯ И ЕГО РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПО ОРГАНАМ У РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

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

Институт биологии Карельского научного центра РАН

В условиях лабораторного опыта изучено накопление кадмия и его распределение по органам у растений ярового ячменя (Hordeum vulgare L.) в зависимости от их возраста. Установлено, что содержание кадмия в органах 7-, 14- и 21-дневных растений после 4 суток воздействия металла в концентрации 100 мкМ заметно различается. С увеличением возраста растений возрастает содержание кадмия в корнях и стеблях, в то время как в листьях не изменяется или даже несколько снижается. Помимо этого, у более взрослых растений уменьшается доля кадмия, поступающего из корней в побеги, что свидетельствует об усилении их барьерной функции. Несмотря на значительное усиление поступления кадмия в растения ячменя с увеличением их возраста, существенных различий в ответной реакции на действие металла не обнаружено. Высказано предположение, что возрастные изменения в клетках и тканях корней, приводящие к усилению их поглотительной способности, сопровождаются увеличением эффективности работы механизмов, обеспечивающих иммобилизацию избыточного количества ионов кадмия в подземных органах растений. способствуя тем самым их адаптации к повышенным концентрациям этого металла в корнеобитаемой зоне.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare* L., возраст, кадмий, накопление, распределение.

Yu. V. Batova, A. F. Titov, N. M. Kaznina, G. F. Laidinen. CADMIUM ACCUMULATION AND DISTRIBUTION IN BARLEY PLANTS DEPENDING ON THEIR AGE

Cadmium uptake and distribution in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) plants were studied in relation to their age. After 4 days of treatment with a solution with 100 μM cadmium the metal content in organs of 7-, 14- and 21- day-old plants was notably different. The concentration of cadmium in roots and stems increased with plant age, whereas in leaves it either did not change or even decreased somewhat. Furthermore, the proportion of cadmium transported from roots to shoots decreased in older plants, which testifies their barrier function strengthened. Although cadmium supply to barley plants increased considerably with age no significant distinctions were revealed in the response of the plants to the metal. It is supposed that age-related changes in plant cells and tissues, which accelerated cadmium uptake from the solution, go along with more effective operation of the mechanisms facilitating immobilization of excess quantities of cadmium ions in underground organs, thus promoting plant adaptation.

Key words: Hordeum vulgare L., age, cadmium, accumulation, distribution.

Введение

Кадмий является одним из наиболее токсичных металлов для всех живых организмов, включая растения [Wagner, 1993]. В отличие от ряда других тяжелых металлов он не относится к числу необходимых для жизнедеятельности растений элементов, но они достаточно активно поглощают и аккумулируют его в различных органах [Verkleij et al., 2009]. Накопление кадмия в клетках и тканях приводит к многочисленным структурно-функциональным нарушениям, оказывает отрицательное влияние на многие физиологические процессы, что ведет не только к снижению продуктивности растений, но в отдельных случаях даже к их гибели [Prasad, 1995; Sanità di Toppi, Gabbrielli, 1999; Серегин, Иванов, 2001; Clemens, 2006; Титов и др., 2007; Wahid et al., 2009].

К настоящему времени установлено, что поступление ионов кадмия в растения осуществляется с помощью ионтранспортных систем (транспортных белков, ионных каналов), обеспечивающих поглощение необходимых растению элементов, таких как железо, цинк, кальций и др. [Hall, Williams, 2003; Clemens, 2006; Krämer et al., 2007]. Показано также, что скорость накопления, а также характер распределения этого металла по органам растений зависят от условий выращивания и биологических особенностей вида (сорта) [Baker, Walker, 1990; Ильин, 1991; Wagner, 1993; Башмаков, Лукаткин, 2009; Hassan, Aarts, 2011 и др.]. Кроме того, некоторые авторы отмечают, что способность растений аккумулировать кадмий изменяется в ходе онтогенеза [Prasad, 1995; Sanità di Toppi, Gabbrielli, 1999; Regvar, Vogel-Mikuš, 2008]. Однако экспериментальных данных, однозначно подтверждающих это, в литературе пока недостаточно.

В связи с этим основная цель нашего исследования состояла в изучении накопления кадмия и его распределения по органам у растений ячменя в зависимости от их возраста.

Материал и методы

Для проведения эксперимента растения ярового ячменя (Hordeum vulgare L.) сорта Зазерский 85 выращивали в течение 7 дней в вегетационных условиях в сосудах с песком до достижения ими фазы всходов, фазы 2-х листьев (14 дней) или фазы 3-х листьев (21 день). Затем растения переносили в лабораторные условия и выращивали в пластиковых контейнерах объемом 2 литра на половинном питательном растворе Кнопа при температуре воз-

духа 20–22 °C, освещенности 10 клк и фотопериоде 14 ч. В опытных вариантах к питательному раствору добавляли 100 мкМ кадмия в форме сульфата.

Анализ растений проводили на 4-е сутки от начала экспозиции. О влиянии кадмия на растения судили по изменению накопления сырой биомассы надземных и подземных органов. Содержание металла определяли в корнях, стеблях (укороченный стебель и влагалища листьев) и листовых пластинках. Разложение растительных образцов осуществляли в смеси ${\rm HNO_3}$ и ${\rm H_2O_2}$ в соотношении ${\rm 4:1}$ с использованием микроволновой системы пробоподготовки MC-6 (Вольта, Россия). Определение содержания кадмия проводили методом инверсионной вольтамперометрии на полярографе ABC-1.1 (Вольта, Россия).

Биологическая повторность при анализе биомассы органов составляла 20 растений. Определение содержания кадмия проводили в 2-кратной биологической и 3–5-кратной аналитической повторностях.

Результаты и обсуждение

Проведенные опыты показали, что реакция растений разного возраста на воздействие кадмия оказалась однотипной. В присутствии металла у них снижалась (по отношению к контролю) сырая биомасса побега, причем примерно в равной степени у разновозрастных растений, тогда как биомасса корней оставалась на уровне контроля (табл. 1). Такую же ответную реакцию ячменя на кадмий наблюдали и другие авторы при использовании аналогичной [Puertas-Mejía et al., 2010] или более высокой концентрации (500 мкМ) этого металла [Demirevska-Kepova et al., 2006]. Отсутствие влияния кадмия на биомассу корней в нашем опыте, возможно, объясняется сравнительно короткой экспозицией, в течение которой у растений, уже имевших к началу эксперимента достаточно хорошо развитую корневую систему, существенного изменения биомассы корней не происходило.

Химический анализ растений контрольного варианта показал, что содержание кадмия в корнях составляет 0,23–0,29 мкг/г сырой массы, тогда как в надземных частях растений он обнаружен не был.

У опытных растений после экспозиции на растворе с кадмием содержание металла в корнях значительно превышало его уровень в стеблях и листовых пластинках (табл. 2), что является типичным для видов, относящихся к группе исключателей [Grant et al., 1998; Wójicik,

Таблица 1. Влияние 4-суточной экспозиции растений ячменя разного возраста на растворе с кадмием (100 мкМ) на накопление биомассы надземных и подземных органов

Розрост растоний	Сырая биома	асса побега, мг	Сырая биомасса корня, мг		
Возраст растений	контроль	ОПЫТ	контроль	опыт	
7-дневные + 4 сут экспозиции с кадмием	$167,8 \pm 4,5$	$134,9 \pm 4,8* (80)$	154,7 ± 13,2	141,9 ± 7,5 (92)	
14-дневные + 4 сут экспозиции с кадмием	254,9 ± 16,1	$182,9 \pm 4,0* (72)$	$268,9 \pm 24,4$	246,5 ± 16,7 (92)	
21-дневные + 4 сут экспозиции с кадмием	393,5 ± 15,7	325,8 ± 12,8* (83)	$273,0 \pm 21,8$	325,1 ± 24,6 (119)	

Примечание. * – различия между контролем и опытом достоверны при P < 0,05; в скобках – % от контроля.

Таблица 2. Содержание кадмия в органах растений ячменя разного возраста после 4-суточной экспозиции на растворе с кадмием (100 мкМ)

Розрост постоинй	Содержание кадмия, мкг/г сырой массы					
Возраст растений	корни	стебли	1-й лист	2-й лист	3-й лист	
7-дневные + 4 сут экспозиции с кадмием	16,19 ± 0,48	$3,41 \pm 0,09$	$3,02 \pm 0,12$		_	
14-дневные + 4 сут экспозиции с кадмием	23,89 ± 0,46*	$6,02 \pm 0,10*$	$0,66 \pm 0,01*$	$1,73 \pm 0,08$	_	
21-дневные + 4 сут экспозиции с кадмием	42,80 ± 1,41*	$7,59 \pm 0,16*$	$1,22 \pm 0,05$ *	$0,70 \pm 0,03*$	$1,45 \pm 0,03$	

Примечание. * - различия между вариантами опыта достоверны при P < 0,05; прочерк - отсутствие данного листа.

Тикiendorf, 1999; Vassilev, 2002], и рассматривается как один из основных механизмов их металлоустойчивости [Baker, 1981; Серегин, Иванов, 2001; Wahid et al., 2009]. Обнаружено также, что содержание кадмия в корнях разновозрастных растений заметно различается. Так, у 21-дневных растений после 4-суточного воздействия металла оно было в 1,8 раза выше, чем у 14-дневных растений, и в 2,6 раза выше, чем у 7-дневных. Подобные различия отмечали ранее и другие исследователи, изучавшие накопление кадмия у ячменя [Smýkalová, Zámečníková, 2003] и поглощение цинка у кукурузы [Рудакова и др., 1987].

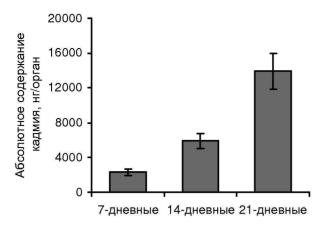
В результате анализа надземных органов растений было выявлено, что с увеличением возраста содержание кадмия в стебле, так же как и в корнях, возрастало, а в листовых пластинках не изменялось или даже несколько снижалось (табл. 2).

Оценка накопления кадмия в органах показала, что 21-дневные растения аккумулируют за время экспозиции в 2,4 раза больше кадмия, чем 14-дневные, и в 5,6 раза больше, чем 7-дневные. При этом с увеличением возраста растений количество металла в корнях и стеблях значительно возрастает, общее же количество кадмия, поступившего в листья, остается неизменным, несмотря на увеличение их числа (рис. 1).

Обнаруженные нами возрастные различия в накоплении металла растениями ячменя свидетельствуют об увеличении с возрастом поглотительной способности корневой системы. Действительно, известно, что скорость поглощения растениями элементов минерального питания может изменяться в зависимости от фазы их развития [Кларксон, 1978; Рудакова и др., 1987]. У однолетних злаков поступление в органы основных питательных

элементов наиболее активно происходит в первые недели вегетации [Петербургский, 1971; Полевой, 1989]. Этому способствуют структурно-функциональные изменения, происходящие в корневой системе. В частности, в этот период наблюдается значительное увеличение поглощающей поверхности корней [Berkelaar, Hale, 2000; Chaney et al., 2007], катионообменная способность возрастает клеточных оболочек [Mane et al., 1970; Мейчик, 2007], усиливается гидравлическая проводимость [Кузнецов, Дмитриева, 2006], изменяется интенсивность работы ионтранспортных систем [Кларксон, 1978; Полевой, 1989; Marschner, 1995]. Поскольку поступление токсичных ионов в корни осуществляется с помощью тех же механизмов, что и ионов, необходимых для жизнедеятельности растений [Clemens, 2006], отмеченные выше возрастные изменения корневой системы могут способствовать и усилению поглощения кадмия более взрослыми растениями ячменя.

С увеличением возраста растений и усилением поглощения кадмия корнями возрастало и количество металла, поступившего в стебель, при этом в листьях оно оставалось низким (рис. 1), что, очевидно, связано со скоростью и особенностями передвижения ионов металла по органам. Например, в опытах с растениями риса было обнаружено, что ионы кадмия достаточно быстро (через 1 час от начала воздействия) проникают в основание стебля, в то время как их перемещение в листовые пластинки в значительной степени затруднено из-за наличия на поверхности клеточных стенок сосудов ксилемы большого количества отрицательно заряженных групп, способных связывать и задерживать катионы, находящиеся в ксилемном соке [Fujimaki et al., 2010].



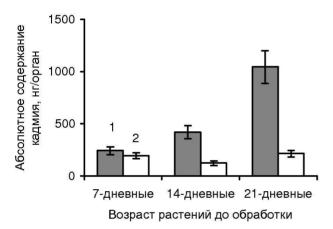


Рис. 1. Накопление кадмия в подземных (A) и надземных (Б) органах у растений ячменя разного возраста:

1- стебли, 2 - листья

Анализ распределения кадмия по органам растений ячменя показал, что несмотря на некоторое возрастание количества металла в побегах у 14- и 21-дневных растений по сравнению с 7-дневными, относительная доля металла, поступившего в надземные органы у более взрослых растений, заметно снижается (рис. 2), что свидетельствует об усилении барьерной функции корневой системы. Сходные изменения в распределении кадмия с увеличением возраста растений наблюдали у Vigna radiata [Šimonová et al., 2007]. Как известно, у растений, относящихся к группе исключателей, металлоустойчивость зависит от эффективности работы механизмов, обеспечивающих иммобилизацию ионов металлов в корнях, что позволяет защитить от их негативного действия надземные органы. К числу таких механизмов относят связывание ионов в апопласте клеток корня, хелатирование в цитоплазме и компартментацию в вакуоли [Clemens, Verbruggen et al., 2009; Verkleij et al., 2009; Lux et al., 2011]. Кроме того, поступление ионов металлов в надземные органы может регулироваться на этапе загрузки в ксилему путем изменения активности транспортных белков [Clemens, 2006; Van der Vliet et al., 2007; Verbruggen et al., 2009]. Высказано также предположение, что уменьшение содержания кадмия в надземных органах может достигаться путем их перемещения по флоэме из побегов обратно в корни [Van Belleghem et al., 2007]. Однако в литературе практически отсутствуют сведения, позволяющие сравнить эффективность работы этих механизмов у растений разного возраста. Можно лишь предположить, что увеличению иммобилизации ионов кадмия в корнях могут способствовать такие возрастные изменения, как усиление суберинизации клеточных стенок эндодермы и экзодермы [Schreiber et al., 1999; Hose et al., 2001], а также увеличение «емкости апопласта» клеток коры корня - основной ткани, накапливающей ионы кадмия, у растений группы исключателей [Серегин, 20091.

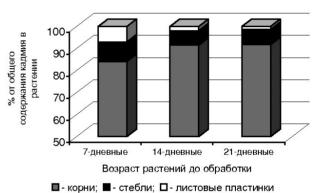


Рис. 2. Распределение кадмия по органам у растений ячменя разного возраста

Не исключено также, что существуют определенные возрастные различия и в эффективности работы механизмов, обеспечивающих связывание ионов металла внутри клеток корня. Например, недавно нами получены данные, показывающие, что у более взрослых растений ячменя содержание фитохелатинов (пептидов, участвующих в связывании ионов тяжелых металлов в цитоплазме) в клетках корня после экспозиции на растворе с кадмием увеличивается в большей степени, чем у более молодых [Казнина и др., в печати]. Последнее указывает на возможное участие данного механизма в усилении барьерной функции корней с увеличением возраста растений.

О более высокой эффективности функционирования механизмов детоксикации ионов металла в корнях у более взрослых растений говорит и тот факт, что несмотря на значительное усиление поступления кадмия в растения ячменя с увеличением их возраста, существенных различий в ответной реакции на действие металла обнаружено не было. Однако для выявления конкретных причин возрастных различий в накоплении и иммобилизации кадмия в корнях у ячменя необходимы специальные исследования.

Заключение

В целом результаты нашего исследования показали, что реакция разновозрастных растений на действие кадмия была однотипной, хотя содержание металла в органах существенно различалось. В частности, с увеличением возраста растений содержание кадмия в корнях и стеблях у ячменя заметно возрастало, в то время как в листьях не изменялось или даже несколько снижалось. Кроме того, у более взрослых растений отмечено уменьшение доли кадмия, поступающего из корневой системы в побеги. Вероятно, возрастные изменения в клетках и тканях корней, приводящие к усилению их поглотительной способности, сопровождаются увеличением эффективности работы механизмов, обеспечивающих иммобилизацию избыточного количества ионов металла в подземных органах. Это позволяет защитить надземные органы и, прежде всего, листья от негативного воздействия кадмия, способствуя тем самым адаптации растений к повышенным концентрациям металла в корнеобитаемой среде.

Литература

Башмаков Д. И., Лукаткин А. С. Эколого-физиологические аспекты аккумуляции и распределения тяжелых металлов у высших растений. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2009. 236 с.

Ильин В. Б. Тяжелые металлы в системе почва – растение. Новосибирск: Наука, 1991. 150 с.

Казнина Н. М., Титов А. Ф., Топчиева Л. В. и др. Влияние возрастных различий на реакцию растений ячменя на действие кадмия // в печати.

Кларксон Д. Транспорт ионов и структура растительной клетки. М.: Мир. 1978. 368 с.

Кузнецов Вл. В., Дмитриева Г. А. Физиология растений. Изд. 2-е. М.: Высшая школа, 2006. 742 с.

Мейчик Н. Р. Ионный обмен и диффузия в клеточных стенках растений: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 2007. 48 с.

Петербургский А. В. Агрохимия и физиология питания растений. М.: Россельхозиздат, 1971. 334 с.

Полевой В. В. Физиология растений. М.: Высшая школа, 1989. 464 с.

Рудакова Э. В., Каракис К. Д., Сидоршина Т. Н. Микроэлементы: поступление, транспорт и физио-

логические функции в растениях / Ред. Л. К. Островская. Киев: Наукова думка, 1987. 184 с.

Серегин И. В. Распределение тяжелых металлов в растениях и их действие на рост: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 2009. 53 с.

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

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

Baker A. J. M. Accumulators and excluders strategies in the response of plants to heavy metals // Journal of Plant Nutrition. 1981. Vol. 3, N 1/4. P. 643–654.

Baker A. J. M., Walker P. M. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants // Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects. Boca Raton: CRC Press, Fl. 1990. P. 155–177.

Berkelaar E., Hale B. The relationship between root morphology and cadmium accumulation in seedlings of two durum wheat cultivars // Canadian Journal of Botany. 2000. Vol. 78. P. 381–387.

Chaney R. L., Angle J. S., Broadhurst C. L. et al. Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies // Journal of Environmental Quality. 2007. Vol. 36. P. 1429–1443.

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

Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants // Biochimie. 2006. Vol. 88. P. 1707–1719.

Demirevska-Kepova K., Simova-Stoilova L., Petrova Stoyanova Z., Feller U. Cadmium stress in barley: growth, leaf pigment and protein composition and detoxification of reactive oxygen species // Journal of Plant Nutrition. 2006. Vol. 29. P. 451–468.

Fujimaki S., Suzui N., Ishioka N. S. et al. Traising cadmium from culture to spiklet: noninvasive and quantitative characterization of absorption, transport and accumulation of cadmium in an intact rice plant // Plant Physiology. 2010. Vol. 152. P. 1796–1806.

Grant C. A., Buckley W. T., Bailey L. D., Selles F. Cadmium accumulation in crops // Canadian Journal of Plant Science. 1998. Vol. 78. P. 1–17.

Hall J. L., Williams L. E. Transition metal transporters in plants // Journal of Experimental Botany. 2003. Vol. 54, N 393. P. 2601–2613.

Hassan Z., Aarts M. G. M. Opportunities and feasibilities for biotechnological improvement of Zn, Cd, or Ni tolerance and accumulation in plants // Environ. Exp. Bot. 2011. Vol. 72. P. 53–63.

Hose E., Clarkson D. T., Steudle L., Hartung W. The exodermis: a variable apoplastic barrier // Journal of Experimental Botany. 2001. Vol. 52. P. 2245–2264.

Krämer U., Talke I. N., Hanikene M. Transition metal transport // FEBS Letters. 2007. Vol. 581. P. 2263–2272.

Lux A., Martinka M., Vaculik M., White P. J. Root responses to cadmium in the rizosphere: a review // Journal of Experimental Botany. 2011. Vol. 62. P. 21–37.

Mane V. B., Savant N. K., Shingte A. K. Relationship between cation exchange capacity of roots and mineral composition of plants tops as influenced by age // Plant and Soil. 1970. Vol. 33. P. 113–119.

Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. London: Academic Press, 1995. 674 p.

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

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

Regvar M., Vogel-Mikuš K. Recent advances in understanding of plant responses to excess metals: exposure, accumulation and tolerance // Sulfur assimilation and abiotic stress in plants / Ed. N. A. Khan. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2008. P. 227–251.

Sanità di Toppi L., Gabbrielli R. Response to cadmium in higher plants // Environ. Exp. Bot. 1999. Vol. 41. P. 105–130.

Schreiber L., Hartmann K., Skrabs M., Zeier J. Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls // Journal of Experimental Botany. 1999. Vol. 50. P. 1267–1280.

Šimonová E., Henselová M., Masarovičová E., Kohanová J. Comparison of tolerance of Brassica juncea and Vigna radiata to cadmium // Biologia Plantarum. 2007. Vol. 51. P. 488–492.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Батова Юлия Валерьевна

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

эл. почта: batova@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 762706

Титов Александр Федорович

председатель КарНЦ РАН, чл.-корр. РАН, д. б. н. Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: krcras@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 769710

Казнина Наталья Мстиславовна

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

эл. почта: kaznina@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 762706

Лайдинен Галина Федоровна

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

эл. почта: laidinen@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 762706

Smýkalová I., Zámečniková B. The relationship between salinity and cadmium stress in barley // Biologia Plantarum. 2003. Vol. 46, N 2. P. 269–273.

Van Belleghem F., Cuypers A., Semane B. et al. Subcellular localization of cadmium in roots and leaves of *Arabidopsis thaliana* // New Phytologist. 2007. Vol. 173. P. 495–508.

Van der Vliet L., Peterson C., Hale B. Cd accumulation in roots and shoots of durum wheat: the roles of transpiration rate and apoplastic bypass // Journal of Experimental Botany. 2007. Vol. 58. P. 2939–2947.

Vassilev A. Phisiological and agroecological aspects of cadmium interactions with barley plants: an overview // Journal of Central European Agriculture. 2002. Vol. 4, N 1. P. 65–74.

Verbruggen N., Hermans C., Schat H. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants // Current Opinion in Plant Biology. 2009. Vol. 12. P. 364–372.

Verkleij J. A. C., Golan-Goldhirsh A., Antosiewisz D. M. et al. Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to upper plant parts // Environ. Exp. Bot. 2009. Vol. 67. P. 10–22.

Wahid A., Arshad M., Farooq M. Cadmium phytotoxicity: responses, mechanisms and mitigation strategies // Organic farming, pest control and remediation of soil pollutants / Ed. E. Lichtfouse. Springer Science+Business Media B.V. 2009. P. 371–403.

Wagner G. J. Accumulation of cadmium in crop plants and consequences to human health // Advances in Agronomy. 1993. Vol. 51. P. 173–212.

Wyjcik M., Tukiendorf A. Cd-tolerance of maize, rye and wheat seedlings // Acta Physiologia Plantarum. 1999. Vol. 21, N 2. P. 99–107.

Batova, Yulia

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

Titov, Alexandr

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

Kaznina, Natalia

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

Laidinen, Galina

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences 11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia e-mail: laidinen@krc.karelia.ru tel.: (8142) 762706 УДК 591.1, 577.13, 504.5, 57.017.3

МИДИЯ MYTILUS EDULIS L. БЕЛОГО МОРЯ КАК БИОИНДИКАТОР ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РАСТВОРЕННЫХ НЕФТЕПРОДУКТОВ

И. Н. Бахмет, Н. Н. Фокина, З. А. Нефедова, Т. Р. Руоколайнен, Н. Н. Немова

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Исследовались особенности адаптации двустворчатого моллюска мидии съедобной *Mytilus edulis* L. Белого моря к присутствию растворенных нефтепродуктов. Оценивалось физиологическое состояние животных по сердечной активности и биохимический статус моллюсков по липидному составу. Сердечный ритм регистрировали при помощи неинвазивной методики. После добавления нефтепродуктов наблюдался резкий рост частоты сердечных сокращений при концентрациях 8,0 и 38,0 мг/л. В случае низких концентраций поллютанта (0,4 и 1,9 мг/л) достоверное понижение сердечной ритмики было отмечено только на 4 день экспозиции. Выраженные флуктуации сердечной активности были отмечены во всех экспериментальных группах. После 6-дневной экспозиции мягкие ткани мидий были взяты для оценки липидного состава. При повышенных концентрациях нефтепродуктов (38,0 мг/л) снижалось содержание холестерина и арахидоновой кислоты, что, по-видимому, является специфическим компенсаторным ответом моллюсков на действие высоких доз нефтепродуктов в морской воде.

Ключевые слова: мидия съедобная, *Mytilus edulis* L., сердечный ритм, липиды, фосфолипиды, жирные кислоты, нефтепродукты.

I. N. Bakhmet, N. N. Fokina, Z. A. Nefyodova, T. R. Ruokolainen, N. N. Nemova. BLUE MUSSELS *MYTILUS EDULIS* L. IN THE WHITE SEA AS BIOINDICATORS UNDER DILUTED OIL IMPACT

The adaptation characteristics of the White Sea blue mussels *Mytilus edulis* L. were investigated under the effect of oil products. The physiological condition was estimated by the heart activity, and the biochemical status – by the lipid composition. The heart rate was registered by a non-invasive technique. An increase in HR was observed at oil concentrations of 8.0 and 38.0 mg/l. In treatments with low concentrations (0.4 & 1.9 mg/l) a reliable decrease in the mussel HR occurred on the 4th day of the experiment. Strong fluctuations of the cardiac activity were noted under all concentrations. After 6 days of oil treatment, organs of the mussels (distal and saggital parts of the mantle, foot) were sampled to determine total lipid composition. Low concentrations of oil products caused no significant changes in the lipid composition. Under high concentrations the content of cholesterol and arachidonic acid decreased. This was apparently a specific compensatory response of blue mussels to heavy oil contamination.

Key words: blue mussel, *Mytilus edulis* L., heart rate, lipids, phospholipids, fatty acids, oil products.

Введение

Особенности воздействия нефтепродуктов на морские организмы в последнее время привлекают все больше внимания в связи с участившимися случаями техногенных катастроф и, соответственно, нефтяных разливов [АМАР, 2002; Albaigés et al., 2006; Loureiro et al., 2006]. В будущем эти проблемы могут только возрасти в связи с потеплением в северном полушарии и отступлением льдов в арктических морях. Данные климатические изменения приведут к разработке новых нефтяных месторождений и увеличению морских грузоперевозок по Северному морскому пути [АСІА, 2004]. Это вызывает интерес к изучению особенностей реакций морских животных высоких широт на нефтепродукты.

При исследовании результатов воздействия нефтепродуктов на экологию прибрежных вод наиболее интенсивно в последние десятилетия использовали двустворчатого моллюска мидию съедобную [Bayne, 1985; Choiseul et al., 1998; Dyrynda et al., 2000; El Nemr et al., 2004 и др.]. Это связано, прежде всего, с особенностями распределения мидии. Кроме того, являясь седентарным организмом и фильтратором, моллюск способен накапливать загрязняющие вещества и, таким образом, служить модельным объектом при оценке экологического статуса данной территории.

Следует учитывать, что определение накопленных поллютантов не позволяет своевременно реагировать на появление загрязняющих веществ в окружающей среде. Известно же, что при проведении биомониторинга наиболее эффективно использование долговременных наблюдений за какой-либо интегральной (дыхание, сердечная активность и т. д.) функцией организма-биоиндикатора [Handy et al., 2003]. Однако мидии не применялись в подобных мониторингах в связи с методическими трудностями [Depledge et al., 1992; Taylor et al., 2000]. К примеру, использование такого информативного показателя, как сердечная ритмика, было невозможно из-за артефактов, вызванных имплантацией электродов и, соответственно, повреждающим воздействием [Segal, 1961]. В 1990-х гг. этот недостаток был преодолен благодаря разработке новой методики дистантной регистрации частоты сердечных сокращений (ЧСС) [Depledge, Andersen, 1990]. Применение данного метода в различных экспериментах показало наличие достоверной корреляции между изменениями сердечной ритмики морских беспозвоночных и варьирофакторов ванием природных [Marshall, МсQuaid, 1993, 1994; Santini et al., 2000; Вакhmet et al., 2005]. В дальнейших работах была установлена высокая чувствительность сердечной активности моллюсков к тяжелым металлам [Marchan et al., 1999; Curtis et al., 2000] и аммиаку [Bloxham et al., 1999]. На этом фоне обращает на себя внимание отсутствие работ по изучению влияния на физиологию мидий таких токсичных веществ, как нефтепродукты.

Использование метода регистрации сердечной активности позволяет отслеживать реакцию морских беспозвоночных на поллютанты on-line. В то же время данные по реакции сердечной системы не позволяют оценить изменения в организме на клеточном уровне, поскольку это интегральный показатель. Для понимания тонких механизмов реакции организма животных необходимо применение биохимических методов. Изменения биохимических показателей отражают состояние обмена веществ и зачастую свидетельствуют о развитии компенсаторного ответа организма на воздействие загрязняющих веществ [Немова, Высоцкая, 2004]. Важную роль в адаптациях организма к изменяющимся факторам среды обитания играют липиды клеточных мембран [Крепс, 1981]. Стрессовые воздействия влияют на состав мембранных липидов, что вызывает изменения в физических свойствах мембран (главным образом микровязкости), направленные на поддержание их оптимальной структуры [Nechev et al., 2006]. У двустворчатых моллюсков показано изменение некоторых липидных показателей при влиянии загрязняющих веществ, однако такие работы выполнены на уровне целого организма [Capuzzo, Leavitt, 1988; Leavitt et al., 1990]. Ответ целого организма на различные виды загрязнений является интегральным и состоит из совокупного ответа различных органов. В то же время стратегии реакций на загрязнение клеток каждого отдельного органа могут отличаться между собой.

В связи с вышеизложенными фактами был проведен эксперимент по исследованию реакции мидий на водорастворенные нефтяные продукты. В работе оценивалось изменение сердечного ритма моллюсков и качественный и количественный липидный состав разных органов. Следует отдельно остановиться на объекте исследования – беломорской мидии. Нахождение в высоких широтах привело к развитию уникальных адаптивных возможностей моллюсков данной популяции. В частности, даже в зимних условиях при температуре воды –1,5 °С животные не впадают в анабиоз и продолжают активно питаться. Об этом свидетельствует

относительно высокий уровень сердечной активности – 6–8 сердечных сокращений в минуту (сс/мин) [Бахмет, Здоровенов, 2010]. Таким образом, мидии именно беломорской популяции могут являться организмом-биоиндикатором в условиях Крайнего Севера.

Материал и методы

Для проведения опытов была выбрана Беломорская биологическая станция «Картеш» ЗИН РАН, расположенная на Карельском берегу Белого моря. Размер мидий, выбранных для эксперимента, варьировал от 60 до 70 мм. Для акклимации к лабораторным условиям моллюски были помещены на 7 дней в аквариумы с морской водой с постоянной продувкой при температуре 10 °C. Ежедневно осуществлялась частичная смена воды. Кормление мидий не производилось, чтобы избежать специфического динамического действия пищи. За один день до эксперимента к раковинам моллюсков были приклеены оптические сенсоры CNY-70, после чего мидии были помещены в 5 аквариумов (по 20 экземпляров). Регистрация сердечной активности проводилась каждые 2 часа в течение первых суток перед добавлением нефтепродуктов и далее в течение 6 суток. Использовалась модифицированная методика. описанная в работе М. Н. Depledge, В. В. Andersen [1990]. Обработка данных по сердечной активности производилась при помощи программы FlukeView 3.0 [Santini et al., 2000]. Рассчитывались количество сокращений сердца в одну минуту и средняя арифметическая ошибка. При сравнении использовали непараметрический метод Колмогорова-Смирнова, поскольку распределение значений ЧСС не подчинялось нормальному закону. Для построения графиков средние значения сердечной активности моллюсков, подвергшихся воздействию нефтепродуктов, были стандартизованы по отношению к ЧСС контрольных моллюсков. Сердечная ритмика контрольных индивидуумов была взята за 100 %.

В качестве нефтепродуктов использовалось тяжелое дизельное топливо. Для исключения гравитационного расслоения к 900 мл морской воды предварительно добавляли 100 мл дизельного топлива и затем энергично перемешивали в течение 10 мин, после чего в три аквариума добавляли по 15, 50 и 150 полученной смеси. Таким образом, получали три различных концентрации топлива (табл. 1). Концентрации нефтепродуктов были выбраны с учетом всего спектра – от минимальной до сублетальной. Добавление дизельного топлива про-

изводилось ежедневно сразу после смены воды. Использовали два контроля: четвертый аквариум - без добавления нефтепродуктов; пятый аквариум - также без добавления нефтепродуктов, но расположенный в отдельном помещении, с целью исключения возможной адсорбции нефтепродуктов из окружающего воздуха. Часть нефтепродуктов после добавления испарялась, часть - оседала на стенках аквариума и раковинах мидий и часть - поглощалась моллюсками. В связи с этим перед каждой сменой воды брались пробы для определения истинной концентрации дизельного топлива. Использовался эксирационно-фотометрический метод с колоночной хроматографией на АІ,О, с последующей спектрометрией (РД 52.24.476-95).

Концентрация нефтепродуктов в аквариумах

	1	2	3	4	Контроль
Рассчитанные, мл/л	1,0	0,3	0,1	0	0
Рассчитанные, мг/л	700	210	70	0	0
Действительные, мг/л	38,0	8,0	1,9	0,4	0,02

Для биохимического анализа после шестидневного постоянного воздействия нефтепродуктов на мидий отбирались следующие органы моллюсков: дистальная и сагиттальная части мантии, нога. Экстракцию липидов проводили в смеси хлороформ: метанол (соотношение по объему 2:1) по методу J. Folch et al. [1957]. Разделение общих липидов выполняли на пластинах «Silufol». Количественное содержание общих липидов, отдельных фракций фосфолипидов и жирнокислотный спектр определяли методами хроматографии (ТСХ, ВЭЖХ и ГЖХ) и спектрофотометрии [Сидоров и др., 1972; Endelbrecht, 1974; Arduini et al., 1996]. Изменения в липидном составе оценивались с помощью непараметрического критерия Уилкоксона-Манна-Уитни [Гублер, Генкин, 1969].

Результаты и обсуждения

ЧСС моллюсков до воздействия составила в среднем 11.5 ± 0.4 сс/мин и достоверно не различалась между экспериментальными группами.

После добавления нефтепродуктов в высокой концентрации (38,0 мг/л) ЧСС мидий резко возрастала (рис. 1). На 2-й день эксперимента сердечная активность падала и снова возрастала на 4-е сутки. Далее до конца опыта ЧСС моллюсков оставалась достоверно выше контрольного уровня (рис. 1). Таким образом, наблюдались циклические изменения сердечной активности с периодом в 2 суток. При добавлении нефтепродуктов в концентрации 8,0 мг/л были получены сходные флуктуации ЧСС (рис. 1).

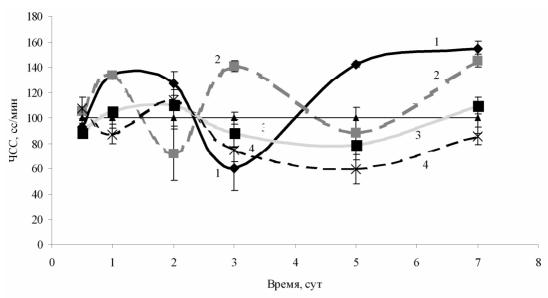


Рис. 1. Относительное изменение ЧСС мидий при воздействии растворенных нефтепродуктов (контроль принят за 100 %):

1 - концентрация 38,0 мг/л; 2 - концентрация 8,0 мг/л; 3 - концентрация 1,9 мг/л; 4 - концентрация 0,4 мг/л; тонкая прямая линия - контроль

При более низких концентрациях нефтепродуктов (0,4 и 1,9 мг/л) только на 4-е сутки опыта было обнаружено достоверное понижение ЧСС мидий. К концу эксперимента сердечная активность мидий в данных группах возвращалась к контрольным значениям (рис. 1). Флуктуации ЧСС, регистрируемые у мидий, находящихся в условиях влияния низкой концентрации нефтепродуктов, были сходны с изменениями сердечной активности у моллюсков из аквариумов с высокими концентрациями нефтепродуктов (8,0 и 38,0 мг/л).

Рост ЧСС при действии высоких концентраций нефтепродуктов (8,0 и 38,0 мг/л) позволяет сделать вывод о повышении потребления кислорода и, соответственно, уровня метаболизма. Эти данные согласуются с отмеченной тахикардией у мидий при кратковременном воздействии бензопирена (основной повреждающий элемент нефти) [Halldorsson et al., 2008].

Необходимо учитывать, что мидия является активным фильтратором, поэтому более высокий уровень потребления кислорода может быть связан с активным выведением нефтепродуктов из организма моллюсков. Кроме того, дополнительное количество кислорода необходимо для окисления загрязняющего агента. Ранее было показано окисление полиароматических углеводородов (ПАУ) в различных тканях мидии с последующим выведением [Dyrynda et al., 2000]. Следует отметить, что мидии и другие представители Bivalvia сравнительно устойчивы к действию нефтепродуктов и выживают в условиях, когда остальные виды

погибают [Goldberg, 1986]. Высокая адаптивная способность мидий была показана при оценке реакции этих животных на тяжелые металлы [Nechev et al., 2006], липофильное загрязнение [McDowell et al., 1999] и на воздействие ПАУ.

Дополнительная интерпретация изменений ЧСС может быть обнаружена в связи с влиянием некоторых нейротрансмиттеров. Возможно, что в нашем случае может иметь место выброс таких нейротрансмиттеров, как 5-ГТ, ФМРФи/или кардиоактивных амилов пептидов [McMahon et al., 1997]. Особенно следует обратить внимание на такой нейромедиатор, как ФМРФ-амид, поскольку его концентрация растет под воздействием стрессовых факторов [Yamagishi et al., 2004]. Также нельзя исключить участие в регуляции сердечной активности ацетилхолина как одного из основных тормозных агентов [Deaton et al., 2001]. Было показано, что тяжелые металлы влияют на внешний холинэргический контроль сердечной активности, в результате чего понижается циркуляция гемолимфы [Bini et al., 2006].

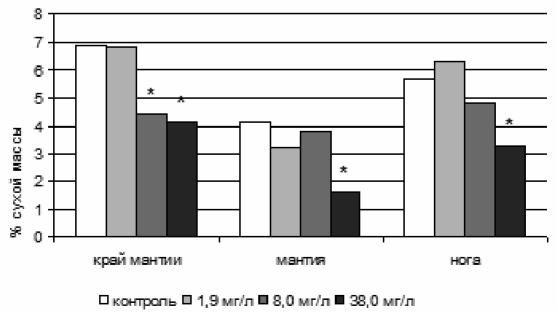
Общепризнанно, что процесс адаптации имеет колебательный характер, что связано с определенной инерцией адаптационных механизмов [Бергер, 1986; Berger, Kharazova, 1997]. Возможно, колебательный характер сердечной ритмики, отмеченный в настоящей работе у сублиторальных мидий при влиянии различных концентраций нефтепродуктов, свидетельствует об акклимации моллюсков к данному воздействию.

В исследуемых органах беломорских мидий (край мантии, мантия и нога) при влиянии нефтепродуктов в высоких концентрациях (38,0 мг/л) наблюдалось значительное падение концентрации холестерина (ХС) - основного структурного компонента мембран (рис. 2). Наряду с этим происходило повышение содержания общих фосфолипидов (ФЛ) и их отдельных (фосфатидилэтаноламина фракций (ФЭА), фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилинозитола (ФИ)), что, в свою очередь, отразилось на соотношении ХС/ФЛ. Этот показатель является одним из основных параметров, характеризующих физическое состояние биологических мембран, которое определяет проницаемость липидного бислоя для ионов, а также активность встроенных в него ферментов и рецепторов [Еляков, Стоник, 1988; Hall et al., 2002]. Кроме того, XC является предшественником для синтеза гормонов [Кандюк, 2006; Lavado et al., 2006]. Значительное снижение концентрации данного стерина может быть вызвано ингибирующим действием высоких доз нефтепродуктов на активность ферментов, участвующих в его синтезе. Низкий уровень ХС, в свою очередь, может не только изменить вязкость и проницаемость клеточных мембрам, но и повлиять на гормональный статус мидий.

Обращает на себя внимание значительное повышение концентрации фосфатидилинозитола (ФИ) в краевой части мантии и ноге в результате воздействия высокой концентрации нефтепродуктов (38,0 мг/л) на беломорских

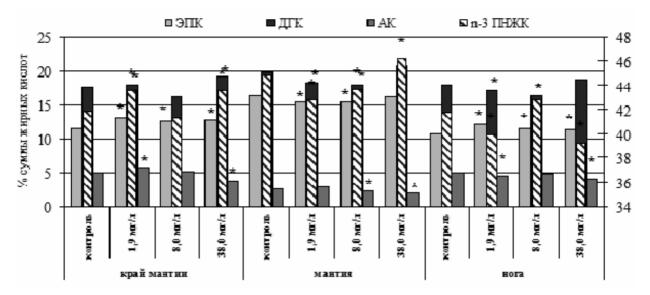
мидий. Данный фосфолипид является минорным компонентом клеточных мембран, участвующим в таких важных физиологических процессах, как сигнальная трансдукция на поверхности клетки, регуляция мембранного транспорта, проницаемость мембран [Кучеренко, Блюм, 1986; Di Paolo, de Camilli, 2006]. Повышение его количества в краевой части мантии и ноге, вероятно, свидетельствует об участии данного фосфолипида в компенсаторной реакции мидий на действие высоких доз нефтепродуктов.

В жирнокислотном спектре беломорских мидий, подверженных влиянию нефтяного загрязнения, были отмечены модификации (рис. 3), свидетельствующие о развитии компенсаторных перестроек на уровне метаболизма жирных кислот в ответ на данное негативное влияние. Особенностью ответной реакции мантийной ткани (краевой части и собственно мантии) на действие высоких концентраций нефтепродуктов (38,0 мг/л) явилось повышение уровня n-3 полиеновых жирных кислот, главным образом, эйкозапентаеновой 20:5n-3 (ЭПК) и докозагексаеновой 22:6n-3 кислот (ДГК). Выявленный эффект возможен в результате либо активации ферментов синтеза данных жирных кислот (в частности, десатураз и элонгаз) у моллюсков при неблагоприятном воздействии нефтепродуктов, либо активного потребления фитопланктона, богатого данными кислотами. Отмеченный у моллюсков рост ЧСС при воздействии высоких концентраций нефтепродуктов (38,0 мг/л) свидетельствует



 $\mathit{Puc.}\ 2.\ \mathsf{Cogepxahue}\ \mathsf{xoлectepuha}\ (\mathsf{XC},\ \%\ \mathsf{cyxo}\ \mathsf{M}\ \mathsf{acc}\ \mathsf{ы})$ в органах $\mathit{Mytilus}\ \mathit{edulis}$

* – различия достоверны при сравнении с контролем $(0,4 \,\mathrm{Mr/n}), \,\mathrm{p} < 0,05$



Puc. 3. Содержание некоторых полиеновых жирных кислот (% суммы жирных кислот) в исследуемых органах *Mytilus edulis* при влиянии различных концентраций нефтепродуктов:

ЭПК – эйкозапентаеновая 20:5n-3 кислота; ДГК – докозагексаеновая 22:6n-3 кислота; АК – арахидоновая 20:4n-6 кислота; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты. * – различия достоверны при сравнении с контролем (0,4 мг/л), р < 0,05

об активации процессов фильтрации. Повышенные концентрации данных полиеновых кислот обеспечивают защиту клеточных мембран мантийной ткани от окислительного разрушения. поскольку известно, что увеличение уровня ненасыщенности жирных кислот возникает в случае повышенного риска окислительного повреждения [Abele, Puntarulo, 2004]. Необходимо отметить, что при влиянии данной концентрации нефтепродуктов (38,0 мг/л) во всех исследуемых органах мидий наблюдалось снижение содержания арахидоновой 20:4n-6 кислоты (АК), при этом повышался уровень ее метаболического предшественника - линолевой 18:2n-6 кислоты. Это, вероятно, указывает на угнетение процессов синтеза АК в результате воздействия высоких концентраций нефтепродуктов на мидий. Однако при влиянии нефтепродуктов в низкой концентрации (1,9 мг/л) в краевой части мантии, наоборот, наблюдался рост уровня данной жирной кислоты. Вероятно, участие АК в процессах адаптации моллюска к нефтяному загрязнению зависит от концентрации нефтепродуктов в морской воде. Известно, что АК является предшественником для синтеза эйкозаноидов (простагландинов, лейкотриенов и др.) - биологически активных веществ, способствующих развитию приспособительных реакций организма с участием иммунной системы [Stanley-Samuelson, 1987].

В мантии и ноге при воздействии нефтепродуктов в концентрации 1,9 и 8,0 мг/л наблюдалось пониженное содержание n-3 полиеновых

кислот (в основном, ЭПК и ДГК), что указывает на недостаточное поступление этих кислот извне или на угнетение процессов их синтеза. Отмеченные модификации в количестве данных жирных кислот возможны в результате снижения физиологических функций моллюска: ЧСС, потребления кислорода и фильтрации.

Таким образом, при влиянии различных концентраций нефтепродуктов (1,9, 8,0 и 38,0 мг/л) у беломорских мидий установлена ответная реакция на уровне структурных липидов (ФЭА, ФХ, ФИ и ХС) и полиеновых жирных кислот во всех исследуемых органах. Липидный состав Mytilus edulis характеризовался пониженными концентрациями холестерина и арахидоновой кислоты, что, по-видимому, является специфическим компенсаторным ответом моллюсков на действие высоких концентраций (38,0 мг/л) нефтепродуктов в морской воде. Кроме того, колебания в содержании n-3 ПНЖК у мидий, подвергнутых воздействию нефтяного загрязнения, свидетельствуют о перераспределении метаболизма данных жирных кислот между исследуемыми органами, а именно: краевой частью мантии, мантией и ногой. Изменения в количественном составе структурных липидов и жирных кислот у беломорских мидий могут оказывать влияние на активность мембранно-связанных ферментов, а также на метаболизм всего организма, что позволяет им адаптироваться к различным концентрациям нефтепродуктов в морской воде.

Заключение

В заключение необходимо подчеркнуть ряд выводов, которые следуют из результатов наших исследований:

- 1. Мидии Белого моря обладают высокой чувствительностью к присутствию нефтепродуктов, что доказывается изменением сердечной активности при концентрациях поллютанта ниже ПДК;
- 2. Моллюски способны адаптироваться к воздействию нефтепродуктов;
- 3. Липидный состав мидий менее чувствителен к данному воздействию, однако изменения соотношения структурных липидов и модификации жирнокислотного спектра беломорских моллюсков, подверженных влиянию нефтяного загрязнения, помогают понять механизм реагирования животных на клеточном уровне.

По-видимому, необходимы дальнейшие исследования для установления механизмов развития компенсаторных реакций у мидий в ответ на действие нефтепродуктов. На следующем этапе предполагается оценить не только изменения липидного состава, но и реакцию активности ферментов углеводного и белкового обмена. По изменению активности ферментов можно судить о возникающих перестройках в клеточном метаболизме, которые направлены на компенсацию неблагоприятного влияния окружающей среды, в том числе действия нефтепродуктов.

Авторы выражают признательность заведующему гидрохимической лабораторией Института водных проблем Севера д. х. н. П. А. Лозовику и сотруднику данной лаборатории С. В. Басовой. Авторы благодарны сотрудникам Беломорской биологической станции ЗИН РАН и особенно д. б. н. В. Я. Бергеру и д. б. н. В. В. Халаману за предоставленную возможность проводить исследования на станции.

Работа была выполнена при поддержке гранта Президента РФ «Ведущие научные школы РФ» № 1642.2012.4 и программы Президиума РАН «Биоразнообразие».

Литература

Бахмет И. Н., Здоровенов Р. Э. Вариабельность сердечной активности у двустворчатых моллюсков *Mytilus edulis* и *Modiolus modiolus* // Биол. моря. 2010. Т. 36, № 3. С. 228–232.

Бергер В. Я. Адаптации морских моллюсков к изменению солености. Л.: Наука, 1986. 214 с.

Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрического статистического критерия для определения разницы двух групп в медико-биологических исследованиях. М.: Медицина, 1969. 29 с.

Еляков Г. Б., Стоник В. А. Стеролы морских организмов. М.: Наука, 1988. 207 с.

Кандюк Р. П. Стерины моллюсков и их функциональная роль (Обзор) // Гидробиол. журн. 2006. Т. 42, № 1. С. 62–74.

Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адаптационные функции липидов. Л., 1981. 365 с.

Кучеренко Н. Е., Блюм Я. Б. Роль мембранных фосфоинозитидов в регуляции гормональных эффектов // Укр. биохим. 1986. Т. 58, № 1. С. 86–101.

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

РД 52.24.476-95. Методическая инструкция. Метод выполнения измерений массы нефти ИК-фотометрическим методом / Гидрохимический институт. Ростов-на-Дону, 1995. 14 с.

Сидоров В. С., Лысенко Е. И., Болгова О. М., Нефедова П. Ф. Липиды рыб. І. Методы анализа. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР, 1972. С. 150–162.

Abele D., Puntarulo S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish // Comp. Biochem. Physiol. 2004. Vol. 138A. P. 405–415.

ACIA (Arctic Climate Impact Assessment). Impacts of a warming Arctic. Cambridge University Press, 2004. 1042 p.

Albaigés J., Morales-Nin B., Vilas F. The Prestige oil spill: a scientific response // Mar. Pollut. Bull. 2006. Vol. 53. P. 205–207.

AMAP (Arctic Monitoring and Assessment Programme). Arctic pollution 2002. Oslo: Norway, 2002. 112 p.

Arduini A., Peschechera A., Dottori S. et al. High performance liquid chromatography of long-chain acylcarnitine and phospholipids in fatty acid turnover studies // J. of Lipid Res. 1996. Vol. 37. P. 684–689.

Bakhmet I. N., Berger V. Ja., Khalaman V. V. The effect of salinity change on the heart rate of *Mytilus edulis* specimens from different ecological zones // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2005. Vol. 318, N 2. P. 121–126.

Bayne B. L. Responses to environmental stress: tolerance, resistance and adaptation // Marine Biology of Polar Regions and Effects of Stress on Marine Organisms. J. S. Gray, Christiansen, M. E. Wiley, Chichester, UK 1985. P. 331–349.

Berger V. J., Kharazova A. D. Mechanisms of salinity adaptations in marine mollusks // Hydrobiol. 1997. Vol. 355. P. 115–126.

Bini G., Williams G. A., Chelazzi G. Neuronal cholinergic control is involved in the modification of cardiac activity and circulation induced by waterborne copper in the chiton Acanthopleura japonica // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2006. Vol. 338, N 1. P. 43–49.

Bloxham M. J., Worsfold P. J., Depledge M. H. Integrated biological and chemical monitoring: in situ physiological responses of freshwater crayfish to fluctuations in environmental ammonia concentrations // Ecotoxicol. 1999. Vol. 8, N 3. P. 225–237.

Capuzzo J. M., Leavitt D. F. Lipid composition of the digestive glands of Mytilus edulis and Carcinus maenas

in response to pollutant gradients // Mar. Ecol. Prog. Ser. 1988. Vol. 46. P. 139–145.

Choiseul V., Wilson J. G., Nixon E. The distribution of hydrocarbons on the east and south-west Irish costs and in the Liffe estuary // Biol. Env. Proc. RIA. 1998. Vol. 98B, N 2. P. 75–86.

Curtis T. M., Williamson R., Depledge M. H. Simultaneous, long-term monitoring of valve and cardiac activity in the blue mussel *Mytilus edulis* exposed to copper // Mar. Biol. 2000. Vol. 136, N 5. P. 0837–0846.

Deaton L. E., Felgenhauer B. E., Duhon D. W. Bulbus arteriosus of the bivalve mollusc *Mercenaria mercenaria*: Morphology and pharmacology // J. Morph. 2001. Vol. 250, N 2. P. 185–195.

Depledge M. H., Andersen B. B. A computer-aided physiological monitoring system for continuous, long-term recording of cardiac activity in selected invertebrates // Comp. Biochem. Physiol. 1990. Vol. 96. P. 474–477.

Depledge M. H., Amaral-Mendes J. J., Daniel B. et al. The conceptual basis of the biomarker approach // D. B. Peakall, L. R. Shugart (eds.). Biomarkers: Research and application in the assessment of the environmental health. NATO ASI Series H: Cell Biology. 1992. 86. P. 15–29.

Di Paolo G., de Camilli P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics // Nature. 2006. Vol. 443, N 7112. P. 651–657.

Dyrynda E. A., Law R. J., Dyrynda P. E. J. et al. Changes in immune parameters of natural mussel Mytilus edulis populations following a major oil spill ('Sea Em-press', Wales, UK) // Mar. Ecol. Prog. Ser. 2000. Vol. 206. P. 155–170.

El Nemr A., El-Sikaily A., Khaled A. et al. Determination of hydrocarbons in mussels from the Egyptian Red Sea coast // Env. Monit. Assess. 2004. Vol. 96. P. 251–261.

Endelbrecht F. M., Mari F., Anderson J. T. Cholesterol determination in serum. A rapid direction method // SA Med. J. 1974. Vol. 48, N 7. P. 250–256.

Folch J., Lees M., Sloan-Stanley G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids animal tissue (for brain, liver and muscle) // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226. P. 497–509.

Goldberg E. D. The mussel watch concept // Environ. Monitor. Assess. 1986. Vol. 7. P. 91–103.

Hall J. M., Parrish C. C., Thompson R. J. Eicosapentaenoic acid regulates scallop (*Placopecten magellanicus*) membrane fluidity in response to cold // Biol. Bull. 2002. Vol. 202. P. 201–203.

Halldorsson H. P., De Pirro M., Romano C. et al. Immediate biomarker responses to benzo[a]pyrene in polluted and unpolluted populations of blue mussels (*Mytilus edulis* L.) at high-latitudes // Environ. Int. 2008. Vol. 34. P. 483–489.

Handy R. D., Galloway T. S., Depledge M. H. A proposal for the use of biomarkers for the as-sessment of chronic pollution and in regulatory toxicology // Ecotox. 2003. Vol. 12. P. 331–343.

Lavado R., Janer G., Porte C. Steroid levels and steroid metabolism in the mussel Mytilus edulis: the modulating effect of dispersed crude oil and alkylphenols // Aquatic Toxicology. 2006. Vol. 78S. P. S65–S72.

Leavitt D. F., Lancaster A. S., Capuzzo J. M. Changes in the biochemical composition of a subtropical bivalve, *Arca zebra*, in response to contaminant gradient in Bermuda // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1990. Vol. 138. P. 85–98.

Loureiro M. L., Ribas A., Lypez E., Elena O. Estimated costs and admissible claims linked to the Prestige oil spill // Ecol. Econ. 2006. Vol. 59. P. 48–63.

Marchan S., Davies M. S., Fleming S., Jones H. D. Effect of copper and zinc on the heart rate of the limpet Patella vulgata L. // J. Comp. Biochem. Physiol. 1999. A. 123, 89–93.

Marshall D. J., McQuaid C. D. Effects of hypoxia and hyposalinity on the heart beat of the in-tertidal limpets Patella granularis (Prosobranchia) and Siphonaria capensis (Pulmonata) // Comp. Biochem. Physiol. 1993. A. Vol. 106. P. 65–68.

Marshall D. J., McQuaid C. D. Seasonal and dial variations of in situ heart rate of the intertidal limpet Siphonaria oculus Kr. (Pulmonata) // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1994. Vol. 179, N 1. P. 1–9.

McDowell J. E., Lancaster B. A., Leavitt D. F. et al. The effects of lipophilic organic contaminants on reproductive physiology and disease processes in marine bivalve mollusks // Limnol. Oceanogr. 1999. Vol. 44, N 3. P. 903–909.

McMahon B. R., Wilkens J. L., Smith P. J. S. Invertebrate circulatory systems. Section 13 // Handbook of Physiology, Comparative Physiology, 1997. Vol. II. NY, Oxford. P. 931–1008.

Nechev J., Stefanov K., Popov S. Effect of cobalt ions on lipid and sterol metabolism in the marine invertebrates *Mytilus galloprovincialis* and *Actinia equine* // Comp. Biochem. Physiol. A. 2006. Vol. 144, N 1. P. 112–118.

Santini G., Williams G. A., Chelazzi G. Assessment of factors affecting heart rate of the limpet *Patella vulgata* on the natural shore // Mar. Biol. 2000. Vol. 137, N 2. P. 291–296.

Segal E. Acclimation in mollusks // Amer. Zoologist. 1961. Vol. 1, N 2. P. 235–244.

Stanley-Samuelson D. W. Physiological roles of prostaglandins and other eicosanoids in invertebrates // Biol. Bull. 1987. Vol. 173. P. 92–109.

Taylor L. N., McGeer J. C., Wood C. M., McDonald D. G. Physiological effects of chronic cooper exposure to rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) in hard and soft water: evaluation of chronic indicators // Environ. Toxicol. Chem. 2000. Vol. 19. P. 2298–2308.

Yamagishi H., Takano S., Tanaka K. Dual effects of dopamine on the adult heart of the isopod crustacean *Ligia exotica* // Zool. Sci. 2004. Vol. 21. P. 15–21.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Бахмет Игорь Николаевич

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

эл. почта: igor.bakhmet@gmail.com

тел.: (8142) 769810

Фокина Наталья Николаевна

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

эл. почта: fokinann@gmail.com

тел.: (8142) 769810

Нефедова Зинаида Анатольевна

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

Руоколайнен Татьяна Рудольфовна

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

тел.: (8142) 769810

Немова Нина Николаевна

директор ИБ КарНЦ РАН, чл.-корр. РАН, д. б. н. Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: nemova@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 769810

Bakhmet, Igor

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

Fokina, Natalia

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

Nefyodova, Zinaida

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

Ruolokainen, Tatiana

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

Nemova, Nina

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences 11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia e-mail: nemova@krc.karelia.ru tel. (8142) 769810 УДК 631.811.98: 635.63 (631.234)

ВЛИЯНИЕ ЭПИНА ЭКСТРА – СИНТЕТИЧЕСКОГО АНАЛОГА 24-ЭПИБРАССИНОЛИДА НА СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТЬ И ПРОДУКТИВНОСТЬ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА (*CUCUMIS SATIVUS* L.)

Н. П. Будыкина, Т. Г. Шибаева, А. Ф. Титов

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Показано, что эпин экстра – синтетический аналог стероидного фитогормона 24-эпибрассинолида – при предпосевной обработке семян или рассады растений огурца индуцирует повышение холодоустойчивости и позволяет осуществлять упреждающее антистрессовое воздействие на растения перед наступлением периода наибольшей опасности низких положительных температур и заморозков – после высадки рассады в пленочные теплицы. Кроме того, препарат оказывает защитное действие против возбудителей корневой гнили. Благодаря стимуляции роста и генеративного развития, а также повышению стрессоустойчивости растений эпин экстра значительно увеличивает ранний и общий урожай плодов. Показана также эффективность совместного применения эпина экстра с цитовитом.

Ключевые слова: *Cucumis sativus* L., эпин экстра, эпибрассинолид, холодоустойчивость, корневая гниль, урожай.

N. P. Budykina, T. G. Shibaeva, A. F. Titov. EFFECTS OF EPIN EXTRA, A SYNTHETIC ANALOGUE OF 24-EPIBRASSINOLIDE, ON STRESS RESISTANCE AND PRODUCTIVITY OF CUCUMBER PLANTS

Treatments of cucumber seeds and plants with EPIN-extra (a synthetic analogue of a steroid phytohormone 24-epibrassinolide) induced an increase of cold resistance and enhanced plant resistance to fungal pathogens causing root rot. Early and total yield of the plants treated with EPIN-extra was significantly higher compared to non-treated plants. Efficiency of combined treatment of plants with EPIN-extra and citovit has been demonstrated. The results suggest that exogenous application of EPIN-extra stimulates internal potentials of cucumber plants promoting survival under stressful conditions, enhancing the quality, and diminish disease damage. This is applicable in non-heated greenhouse cucumber production under the conditions of cool spring and early summer in northwestern Russia.

 ${\sf Keywords:}\ {\it Cucumis\ sativus\ L.},\ {\sf EPIN-extra},\ {\it 24-epibrassinolide},\ {\it cold\ resistance},\ {\it root\ rot},\ {\it fruit\ yield}.$

Введение

Защита растений, как правило, строится на непосредственном воздействии или на пато-генный (или другой неблагоприятный) фактор,

или на сам растительный организм с целью активизации его защитных реакций. Во втором случае, как показывают литературные данные, ключевую роль в устойчивости растений к таким стрессам, как засуха, затопление,

засоление, экстремальные температуры, тяжелые металлы, фитопатогены и повреждения гербицидами, играют брассиностероиды [Ikekawa, Zhao, 1991; Sasse et al., 1995; Li, Van Staden, 1998; Dhaubhadel et al., 1999; Sasse, 1999; Bajguz, 2000; Khripach et al., 2000; Krishna, 2003; Janeczko et al., 2005; Bhardwaj et al., 2007; Kagale et al., 2007; Bajguz, Hayat, 2009].

Брассиностероиды (БС) - группа стероидных фитогормонов, которые в очень малых концентрациях $(10^{-12}-10^{-7}M)$ регулируют деление и растяжение клеток, фотосинтез, прорастание семян, ризогенез, фотоморфогенез, старение, синтез этилена, активность ферментов, экспрессию генов, синтез белков и нуклеиновых кислот [Хрипач и др., 1993; Kauschmann et al., 1996; Прусакова и др., 1999; Clouse, 2002; Müssig et al., 2002; Castle et al., 2003; Leubner-Merzger, 2003; Pereira-Netto et al., 2003; Sasse, 2003]. Чрезвычайно высокая биологическая активность БС привлекла к ним внимание ученых, занимающихся синтезом и выделением природных соединений, изучением их биологических свойств и разработкой новых препаратов для сельского хозяйства. В настоящее время препараты на основе брассинолида (БЛ), 24эпибрассинолида (ЭБЛ), 28-гомобрассинолида (ГБЛ), 28-норбрассинолида и других БС под разными торговыми названиями производятся в Китае, Японии, Индии, Беларуси и России [Ikekawa, Zhao, 1991; Nippon Kayaku Co., 1998; Kamuro, Takatsuto, 1999; Khripach et al., 1999; Hayat et al., 2003b; Zhao, Chen, 2003]. В России в 1995 г. был зарегистрирован препарат эпин, содержащий ЭБЛ, а в 2003 г. - препарат эпин экстра (ННПП «НЭСТ-М»), содержащий в качестве действующего вещества высокоочищенный ЭБЛ, синтезированный по оригинальной методике с использованием нанотехнологий [Чепраков и др., 2006]. Данный препарат является одним из немногих современных препаратов нового поколения, созданных с целью повышения урожайности и качества продукции, из числа зарегистрированных и доведенных до стадии практического применения.

Как известно, в пленочных теплицах в условиях северо-запада России стрессовая реакция у растений может быть вызвана низкими температурами весной и в начале лета. Например, на широте г. Петрозаводска понижения температуры воздуха до 7–10 °C, а нередко и заморозки до –2...–3 °C бывают почти до середины июня. Резкие перепады температуры воздуха, повторное использование и недостаточное обеззараживание почвогрунтов способствуют развитию корневой гнили у растений

огурца. В результате заболевания урожай огурцов может снижаться на 23–38 % [Гринько, 2002].

Задачей данного исследования было изучение влияния препарата эпин экстра – синтетического аналога ЭБЛ на продуктивность и устойчивость растений огурца (в тепличной культуре) к действию низких температур и возбудителям корневой гнили.

Материал и методы

Семена огурца (Cucumis sativus L., гибрид Королек) замачивали в растворе эпина экстра (2,5·10⁻⁶ % (д. в. ЭБЛ 0,025 г/л) в течение 8 ч. Концентрации эпина экстра были выбраны на основе рекомендаций фирмы-разработчика препарата ННПП «НЭСТ М» (г. Москва) и более ранних собственных исследований. Контрольные семена замачивали в дистиллированной воде. Спустя 8 ч семена промывали водой и часть семян (эксперимент 1) проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге в климатических камерах при температуре 15 и 25 °C. Другую часть контрольных и обработанных эпином экстра семян (эксперимент 2) проращивали методом почвенной культуры в контейнерах в контролируемых условиях при температуре 25/18 °C (день/ночь), относительной влажности воздуха 70-80 %, освещенности 10 клк и фотопериоде 14 ч. В возрасте 20 дней (2-3 настоящих листа) одну группу растений опрыскивали дистиллированной водой, другую - раствором эпина экстра (5·10-6 % д. в.). Далее часть растений разделили еще на две группы и в течение 10 сут выращивали при температуре 7 или 15 °C. Другую часть контрольных и обработанных эпином экстра растений (эксперимент 3) в возрасте 30 дней (4-5 настоящих листьев) высаживали в грунтовую пленочную теплицу (2,5 раст./м²) на территории Агробиологической станции ИБ КарНЦ РАН (расположенной в пригороде г. Петрозаводска, Республика Карелия) и выращивали в весенне-летнем обороте с выполнением всех агротехнических мероприятий.

В фазе 25–28 листьев (в среднем на 55-й день) и повторно через 7 сут на части делянок в теплице в почву вносили раствор эпина экстра (0,001 %). Доза препарата при двухкратной обработке составила 0,208 мг д. в./м², или 0,083 мг д. в./раст. У части растений корневую обработку совмещали с внекорневой подкормкой растений цитовитом – хелатированным комплексом микроэлементов. Контрольные растения поливали водой.

Энергию прорастания семян учитывали на третьи сутки после замачивания, а всхожесть – на седьмые. На седьмые сутки определяли также длину корня и сырую массу проростков.

В возрасте 30 дней (через 10 дней после опрыскивания растений эпином экстра) растения извлекали из контейнеров, корни отмывали. Определяли сырую массу корней, стеблей и листьев. О холодоустойчивости растений судили по температуре гибели 50 % клеток палисадной паренхимы листьев (ЛТ₅₀ °C), высечки из которых промораживали в термоэлектрическом холодильнике в течение 40 мин с последующей оценкой жизнеспособности клеток под световым микроскопом. Оценку устойчивости растений к заморозкам проводили путем прямого воздействия искусственных заморозков интенсивностью -2,2 и -3 °C на испытуемые растения в установках искусственного климата [Дроздов и др., 1976]. Скорость снижения и повышения температуры составляла 1-2 °С в час. Минимальная температура выдерживалась в течение 0,5 ч. Описание повреждений надземных органов заморозком проводили через 2 дня после заморозка, используя 100%-ную шкалу. При этом за 100 % принимали полностью погибшие растения, 0 % - без видимых повреждений.

В эксперименте 3 через 30 дней после посадки (в возрасте 60 дней) определяли соотношение тычиночных и пестичных цветков. Ранний урожай учитывали в течение первых 20 дней плодоношения, а общий урожай — за весь период плодоношения. Ликвидировали растения в возрасте в среднем 105 сут.

Учеты поражения растений корневой гнилью (Fusarium spp., Rhizoctonia spp.) проводили дважды в период вегетации: через 7 сут после первой корневой обработки растений эпином экстра (в среднем через 37 дней от посадки) и через 14 сут после второй корневой обработки (в среднем через 58 дней от посадки). Определяли распространение корневой гнили (% заболевших растений) и интенсивность поражения (долю пораженных листьев нижнего яруса и прикорневой части стебля).

Эксперимент 1 проводили в 2-кратной биологической повторности, в каждой по 50 семян. Эксперименты 2 и 3 проводили в 4–6-кратной биологической и 10-кратной аналитической повторности. При учете урожая площадь каждой делянки составляла 5 м². На рисунках и в таблицах приведены средние арифметические величины типичных опытов (2007–2009 гг.) и их стандартные отклонения.

Результаты

Эксперимент 1

Эпин экстра увеличивал энергию прорастания семян и активизировал рост проростков как в условиях оптимальной температуры (25 °C), так и при 15 °C (табл. 1). Так, энергия прорастания семян, обработанных эпином экстра при температурах 15 и 25 °C, увеличилась на 35 и 18 %, соответственно. Длина корня и масса проростков возрастала соответственно в 12 и 3 раза при 15 $^{\circ}$ С и в 2 раза при 25 $^{\circ}$ С. При 15 °C в контроле наблюдался замедленный рост дефектного на вид корня и задержка в развитии гипокотиля, в то время как у семян, обработанных эпином экстра, проклевывание не задерживалось, а корень достигал размеров контрольного варианта при температуре 25 °C. Влияние эпина экстра на всхожесть семян проявилось только при 15 °C увеличением на 33 %, а при 25 °C всхожесть семян была одинаково высокая у обработанных эпином экстра и контрольных семян.

Таблица 1. Влияние эпина экстра на энергию прорастания и всхожесть семян, длину корня и биомассу проростков огурца при 15 и 25 °C

	Энергия	Всхо-	Длина	Биомасса				
Вариант	прорас-	жесть,	корня,	пророст-				
	тания, %	%	СМ	ков, г				
Температура 15 °C								
Контроль	33	46	$0,3 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,2$				
Эпин экстра	68*	79*	$3,7 \pm 0,2*$	$9,8 \pm 0,6*$				
Температура 25 °C								
Контроль	71	95	$3,5 \pm 0,1$	$10,5 \pm 0,7$				
Эпин экстра	89*	98	$7,5 \pm 0,3*$	$21,3 \pm 1,5*$				

Примечание. Здесь и в табл. 2–3: * – статистически достоверные отличия ($P \le 0,05$).

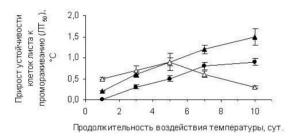
Эксперимент 2

Растения, дважды обработанные эпином экстра (в фазе семян и 2–3 листьев), перед высадкой в теплицу имели большую (на 22 %) биомассу по сравнению с контролем (табл. 2). Кроме того, они характеризовались несколько большей долей листьев и корней в структуре биомассы растения (табл. 2).

Таблица 2. Влияние эпина экстра на накопление и распределение биомассы по органам растений огурца в возрасте 30 дней (4–5 листьев, рассада перед посадкой в теплицу)

		Отно-				
Вари- ант	Листья	Стебли	Корни	Целое растение	шение корни/ побеги	
Конт- роль Эпин	14,9 ± 1,1	18,3 ± 1,5	15,9 ± 0,8	49,1 ± 4,3	0,47	
экстра	$20,0 \pm 0,8*$	$18,6 \pm 0,9$	$21,8 \pm 0,7^*$	$60,4 \pm 5,2$	0,59	

В условиях постоянного действия температуры 15 °C эпин экстра вызывал дополнительный прирост холодоустойчивости растений огурца (рис. 1). Так, дополнительный прирост устойчивости растений, двухкратно обработанных эпином экстра (в фазе семян и 2-3 листьев), по сравнению с контролем составил 0.3 °C на третьи и 0,6 °C на десятые сутки эксперимента. В условиях постоянного действия повреждающей температуры 7 °С в контрольном варианте (данные не приводятся) через сутки отмечались явные признаки повреждения, а через трое суток – гибель растений. Растения, обработанные эпином экстра, демонстрировали прирост холодоустойчивости с максимумом на пятые сутки (0,9 °C), затем устойчивость снижалась. В итоге растения без видимых повреждений перенесли охлаждение до 7 °C в течение 7 суток.



— Контроль 15°C — Эпин экстра 15°C — Эпин экстра 7°C

Рис. 1. Влияние эпина экстра на динамику холодоустойчивости клеток листьев 30-дневных растений огурца при различных температурах (15 и 7 °C). Контроль 7 °C – гибель растения на третьи сутки (данные не приводятся)

После действия на растения искусственных заморозков интенсивностью -2.2 и -3 °C со льдообразованием в тканях повреждение листьев в контроле составило 2 и 73 %, соответственно, в то время как у растений, обработанных эпином экстра, -0 и 11 %, соответственно.

Эксперимент 3

Эпин экстра оказал стимулирующее действие на образование цветков, увеличив их общее количество более чем на 60 %, в том числе пестичных – почти в 2 раза по сравнению с контролем (табл. 3). При этом количество обработок эпином экстра (однократная в фазе семян или двухкратная в фазе семян и 2–3 листьев) не влияло достоверно на количество цветков и соотношение их половых форм (табл. 3).

Обработка семян, опрыскивание листьев рассады и корневая обработка растений эпином экстра существенно снизили развитие корневых гнилей у растений огурца по сравнению с контролем (без обработки) (табл. 4).

Таблица 3. Влияние эпина экстра на образование цветков и соотношение их половых форм у растений огурца (через 30 сут после посадки растений в теплицу)

	Число ці	ветков, шт.	Соотношение
Вариант	общее	пестичных	пестичных и тычи-
	ООЩЕЕ	Пестичных	ночных цветков
Контроль	31 ± 2	21 ± 1	2,1
Эпин экстра			
(семена)	$50 \pm 5*$	39 ± 2*	3,5*
Эпин экстра			
(семена и фаза			
2-3 листьев)	54 ± 5*	42 ± 3*	4,0*

Таблица 4. Влияние эпина экстра на пораженность растений огурца корневой гнилью, %

	Перв	ый учет	Второй учет		
Вариант	Интен- сивность пора- жения	Распро- странение поражения	Интен- сивность поражения	Распро- странение поражения	
Контроль	17	12	35	37	
Эпин экстра Эпин	7	9	15	20	
экстра + цитовит	1	6	2	12	

Примечание. Первый учет проведен через неделю после первой корневой обработки эпином экстра, второй – через две недели после второй корневой обработки.

Снижались и интенсивность, и распространение поражения растений в первом учете (через неделю после первой корневой обработки) и во втором учете (через 2 недели после второй корневой обработки). Причем защитное действие эпина экстра против корневой гнили оказалось более эффективным при совместном применении с микроэлементным комплексом цитовит (табл. 4).

Обработка эпином экстра семян и рассады ускорила начало плодоношения на 3-5 дней по сравнению с контролем. Ранний урожай (за первые 20 дней плодоношения) растений, обработанных эпином экстра в фазе семян и рассады, был на 35 % выше, чем у контрольных растений (рис. 2). Анализ общего урожая (за оборот) показал, что комплексная обработка семян, рассады и вегетирующих растений эпином экстра обеспечила наиболее высокий урожай (на 23 % выше, чем у контрольных растений). Рост урожайности обеспечивался увеличением числа плодов. Необходимо отметить, что эпин экстра способствовал повышению продуктивности огурца наиболее эффективно в вегетационный период, когда наблюдались понижения температуры после высадки рассады в грунт теплицы и перегревы воздуха в период массового плодоношения.

При совместном применении эпина экстра с цитовитом общий урожай плодов был на 41 % выше, чем в контроле, и на 11 % выше по сравнению с растениями, обработанными только эпином экстра (рис. 2). Прибавка в урожае обеспечивалась не только большим числом плодов, но и большей средней массой плодов.

Обсуждение

Совокупность данных, полученных нами в лабораторных, фитотронных и вегетационных (в весенних пленочных теплицах) экспериментах, свидетельствует о том, что эпин экстра оказывает многофункциональное действие на растения огурца. В частности, обработка им семян огурца повышает их энергию прорастания и всхожесть, стимулирует рост корней и приводит к увеличению биомассы проростка (табл. 1). Стимулирующее действие БС на всхожесть семян показано ранее для других сельскохозяйственных культур и дикорастущих растений [Gregory, 1981; Yamaguchi et al., 1987; Chang, Cai, 1988; Dong et al., 1989; Sasse et al., 1995; Jones-Held et al., 1996; Sairam et al., 1996; Vardhini, Rao, 1997, 2000; Будай, 2000; Hayat et al., 2003a; Zhao, Chen, 2003]. Анализ механизмов стимуляции прорастания семян на арабидопсисе, табаке и ряде других растений позволил предположить, что БС непосредственно увеличивают ростовой потенциал зародыша [Takeuchi et al., 1991, 1995; Leubner-Metzger, 2001; Steber, McCourt, 2001]. Интересно, что в нашем случае наибольший стимулирующий эффект эпина экстра на всхожесть семян и рост проростков проявился в условиях действия субоптимальных температур (табл. 1). Это согласуется с наблюдениями других авторов, показавших, что условия среды существенно влияют на результат воздействия препаратов синтетических аналогов БС на отклик растения, проявляясь сильнее в стрессовых условиях [Castle et al., 2003].

Изучение холодоустойчивости растений огурца после обработки эпином экстра показало, что в условиях низких положительных температур (типичная ситуация в весенних необогреваемых теплицах на северо-западе РФ) эпин экстра вызывал заметное повышение холодостойкости огурца. Важно, что эффективность препарата проявлялась не только при закаливающей, но и при повреждающей температуре (рис. 1). Подобное действие препарата в условиях низких температур было выявлено нами на томате (Lycopersicon esculentum Mill.), редисе (Raphanus sativus L.), салате листовом (Lactuca sativa L.), моркови (Daucus carota L.) и цветной капусте (Brassica oleracea L. var. botrytis L.) [Будыкина и др., 2006, 2009]. Интересно, что уровень БС положительно коррелирует с устойчивостью растений огурца к фотоокислительному низкотемпературному И стрессам [Xia et al., 2009]. Авторы предполагают, что обычный синтез БС в нормальных условиях обеспечивает определенный уровень устойчивости растений, но его усиление при неблагоприятных условиях приводит к соответствующему возрастанию их стрессоустойчивости. Повышение холодоустойчивости в ответ на применение БС было показано и на ряде других культур [He et al., 1991; Hirai et al., 1991; Wilen et al., 1995; Kamuro, Takatsuto, 1999; Rao et al., 2002; Zhao, Chen, 2003]. Добавим, что способность эпина экстра повышать адаптивные возможности растений огурца подтверждена в нашей работе также и при действии на растения искусственных заморозков.

Существенно, что эпин экстра в период подготовки рассады наряду с повышением холодоустойчивости оказывал положительное влияние как на качество самой рассады (табл. 2), так и на последующее развитие растений в ходе вегетации (табл. 3). В частности, отмечено его стимулирующее действие на длину корня, массу листьев, накопление подземной и надземной биомассы. При дальнейшем развитии растений и переходе в фазу цветения стимулирующее действие эпина экстра выразилось в ускорении сроков цветения и плодоношения, усиленном образовании генеративных органов и женской сексуализации растений (табл. 3). Относительно применения стероидов для регуляции цветения в литературе имеется немного данных. Известно лишь, что опрыскивание листьев БС увеличивало число цветков у земляники [Pipattanawong et аl., 1996]. В случае же с грейпфрутом реакция на применение БС зависела от времени обработки: при обработке растений осенью число цветков увеличивалось, а поздно зимой уменьшалось [Rao et al., 2002].

Исследование влияния эпина экстра на пораженность огурца корневой гнилью на естественном фоне развития фитопатогена в условиях весеннее-летнего культурооборота показало, что препарат оказывает четко фиксируемое защитное действие против возбудителей корневой гнили у растений (табл. 4). В грунтовых пленочных теплицах огурец часто поражается корневыми гнилями, вызванными видами грибов родов Fusarium и Rhizoctonia. Накопление грибных патогенов связано с повторным использованием почвенного субстрата, часто недостаточно обеззараженного. Резкие перепа-

ды температуры также способствуют распространению заболевания. Первые признаки поражения огурца корневой гнилью, как правило, наблюдаются в фазу массового плодоношения, затем, распространяясь, заболевание приводит к потере значительной части урожая. Способность БС увеличивать устойчивость растений к инфекциям патогенных грибков показана в ряде работ [Васюкова и др., 1994; Волынец и др., 1997; Pshenichnava et al., 1997; Khripach et al., 2000, 2003; Вакуленко, Шаповал, 2001; Filipas, Ul'yanenko, 2001; Nakashita et al., 2003; Будыкина и др., 2007; Дубровин, Долженко, 2007; Нарежная, 2007]. Поскольку сами БС не обладают фунгицидной активностью, то, очевидно, их влияние связано со стимуляцией механизмов неспецифической (общей) устойчивости растений. Следовательно, можно считать, что эпин экстра является индуктором системной (общей) устойчивости растений.

Повышение устойчивости растений к низким температурам и возбудителям корневой гнили, а также стимуляция роста и генеративного развития под влиянием эпина экстра положительно отразились на продуктивности огурца (рис. 2). Препарат значительно увеличил ранний и общий урожай плодов, что согласуется с литературными данными об увеличении урожая огурца на 10-20 % в результате применения БС [Ikekawa, Zhao, 1991]. Повышение урожая у растений, обработанных ЭБЛ, повидимому, объясняется увеличением интенсивности фотосинтеза, что было показано ранее для растений огурца [Ding et al., 1995; Yu et al., 2004]. Связано оно было главным образом с увеличением активности рибулозодифосфаткарбоксилазы, ключевого фермента ассимиляции СО₂.

Повышение продуктивности огурца было наибольшим в вегетационный период, когда наблюдались понижения температуры после высадки рассады в грунт теплицы и перегревы воздуха в период массового плодоношения. Из литературы [Ikekawa, Zhao, 1991; Khripach et al., 1999] следует, что результаты применения БС особенно ощутимы в местах с худшими условиями, например, в засушливых районах. Все это подтверждает наблюдения о более сильном отклике растений на БС в стрессовых условиях [Castle et al., 2003].

Нами также выявлен положительный эффект при применении эпина экстра совместно с хелатированным микроэлементным препаратом цитовит. Урожай плодов за оборот увеличился на 11 % в сравнении с вариантом, где использовали только эпин экстра (рис. 2), существенно снизилась пораженность растений

корневой гнилью (табл. 4). Совместная обработка растений огурца эпином экстра и препаратом цитовит заслуживает рекомендации для ее широкой производственной проверки.

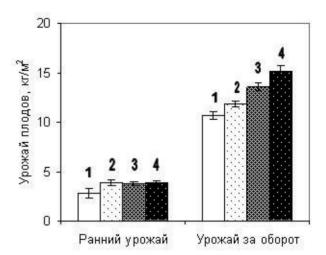


Рис. 2. Влияние эпина экстра (обработки семян, рассады и двухкратно вегетирующих растений) при раздельном и совместном с цитовитом применении на ранний и общий (за оборот) урожай огурца в весенне-летнем обороте (среднее за 2007–2009 гг.):

1 – контроль, 2 – эпин экстра (семена + рассада), 3 – эпин экстра (семена + рассада + вегетирующие растения), 4 – эпин экстра (семена + рассада + вегетирующие растения) + цитовит

Таким образом, полученные в наших исследованиях результаты позволяют сделать вывод о том, что эпин экстра обладает росторегулирующим, иммунокорректирующим и антистрессовым действием на растения огурца. При предпосевной обработке семян или рассады препарат индуцирует повышение холодоустойчивости и позволяет осуществлять упреждающее антистрессовое воздействие на растения низких положительных температур и заморозков в период их наибольшей опасности после высадки рассады в конце мая - начале июня в пленочные теплицы. Кроме того, эпин экстра оказывает защитное действие против возбудителей корневой гнили у растений. Благодаря этому препарат значительно увеличивает ранний и общий урожай плодов. Совместное применение эпина экстра с хелатным микроудобрением цитовитом повышает его эффективность.

Литература

Будай С. И. Всхожесть и морфофизиологические особенности развивающихся растений моркови (Daucus carota L.) при обработке семян регуляторами роста // Весці Нацыянальнай Акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. 2000. № 3. С. 38–41.

Будыкина Н. П., Тимейко Л. В., Алексеева Т. Ф., Гоголева Т. С. Оценка препарата эпин экстра на способность индуцировать повышение устойчивости растений к охлаждению // Устойчивость экосистем и проблема сохранения биоразнообразия на Севере. Материалы Междунар. конф. (Кировск, 26–30 авг. 2006 г.). Т. II. Кировск, 2006. С. 218–221.

Будыкина Н. П., Алексеева Т. Ф., Хилков Н. И. Оценка биопотенциала новых регуляторов роста растений // Агрохимический вестник. 2007. № 6. С. 24–26.

Будыкина Н. П., Алексеева Т. Ф., Хилков Н. И. Использование препарата эпин экстра в агротехнологии выращивания томата в пленочных теплицах европейского Северо-Запада России // Материалы Междунар. науч.-практ. конф. «Интенсификация и оптимизация продукционного процесса сельскохозяйственных растений». Орел, 2009. С. 48–52.

Вакуленко В. В., Шаповал О. А. Регуляторы роста растений в сельскохозяйственном производстве // Плодородие. 2001. № 2. С. 27–29.

Васюкова Н. И., Чаленко Г. И., Канева И. М. и др. Брассиностероиды и фитофтороз картофеля // Прикладная биохимия и микробиология. 1994. Т. 30, № 3. С. 464–469.

Волынец А. П., Пшеничная Л. А., Хрипач В. А. и др. Повышение фитозащитного действия брассиностероидов на минеральном фоне // IV междунар. конф. «Регуляторы роста и развития растений». М., 1997. С. 253–254.

Гринько Н. Н. Видовой состав возбудителей корневой гнили огурца в защищенном грунте // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. 2002. № 5. С. 55–57.

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 / Под ред. Г. В. Удовенко. Л.: Колос, 1976. С. 222–228.

Дубровин Н. К., Долженко О. А. Продуктивность картофеля при обработке эпином экстра в условиях дельты Волги // Полифункциональность действия брассиностероидов. М.: НЭСТ М, 2007. С. 87–100.

Нарежная Е. Д. Эффективность и экологически безопасные приемы возделывания сахарной свеклы при использовании эпина и эпина экстра // Полифункциональность действия брассиностероидов. М.: НЭСТ М, 2007. С. 182–187.

Прусакова Л. Д., Чижова С. И., Третьяков Н. Н. и др. Антистрессовые функции экоста и эпибрассинолида на яровой пшенице в условиях Центральной Нечерноземной зоны // Аграрная Россия. 1999. № 1. С. 39–41.

Хрипач В. А., Лахвич Ф. А., Жабинский В. Н. Брассиностероиды. Минск: Наука и тэхніка, 1993. 287 с.

Чепраков А. В., Филатов М. А., Лукашев Н. В., Малеванная Н. Н. Способ получения 24-эпибрассинолида. Патент на изобретение № 2272044. 2006. С. 1.

Bajguz A. Effect of brassinosteriods on nucleic acids and protein content in cultured cells of *Chlorella vulgaris* // Plant Physiol. Biochem. 2000. Vol. 38. P. 209–215.

Bajguz A., Hayat S. Effects of brassinosteriods on the plant responses to environmental stresses // Plant Physiol. Biochem. 2009. Vol. 47. P. 1–8.

Bhardwaj R., Arora N., Sharma P., Arora H. K. The effects of 28-homobrassinolide on seedling growth, lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities under nickel stress in seedlings of *Zea mays* L. // Asian Journal of Plant Sciences. 2007. Vol. 6, N 5. P. 765–772.

Castle J., Montoya T., Bishop G. J. Selected physiological responses of brassinosteroids: A historic approach // Brassinosteroids. Bioactivity and Crop Productivity (Eds. S. Hayat, A. Ahmad). Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 2003. P. 45–68.

Chang J. Q., Cai D. T. The effects of brassinolide on seed germination and cotyledons tissue culture in *Brassica napus* L. // Oil Crops China. 1988. Vol. 4. P. 18–22.

Clouse S. D. Brassinosteriod signal transduction: clarifying the pathway from ligand perception to gene expression // Molecular Cell. 2002. Vol. 10, N 5. P. 973–982.

Dhaubhadel S., Chaudhary S., Dobinson K. F., Krishna P. Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteriod, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings // Plant Mol. Biol. 1999. Vol. 40. P. 333–342.

Ding J. X., Ma G. R., Huang S. Q., Ye M. Z. Studies on physiological effects of epibrassinolide on cucumber (*Cucumis sativus* L.) // Journal of Zhojiang Agricultural University. 1995. Vol. 21. P. 615–621.

Dong J. W., Lou S. S., Han B. W. et al. Effects of brassinolide on rice seed germination and seedling growth // Acta Agriculturae University Pekinensis. 1989. Vol. 15. P. 153–156.

Filipas A. S., Ul'yanenko L. N. Influence of growth regulators of potato crop yield and quality // The 6th Conference on Regulators of Plant Growth and Development in Biotechnology. Moscow, 2001. P. 284.

Gregory L. E. Acceleration of plant growth through seed treatment with brassins // American Journal of Botany. 1981. Vol. 68. P. 586–588.

Hayat S., Fariduddin Q., Ahmad A. Homobrassinolide affect germination and α -amylase activity in wheat seeds // Seed Technology. 2003a. Vol. 25, N 1. P. 45–49.

Hayat S., Ahmad A., Fariduddin Q. Brassinosteroids: A regulator of 21st century // Brassinosteriods. Bioactivity and Crop Productivity. 2003b. P. 231–246.

He R., Wang G., Wang X. Effects of brassinolide on growth and chilling resistance of maize seedlings // Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Application (Eds. H. G. Cuttler, T. Yokota, G. Adam). American Chemical Society, Washington. 1991. P. 220–230.

Hirai K., Fujii S., Honjo K. Brassinolide action on regulation of plant growth // Jap. J. Crop Sci. 1991. Vol. 60, N 1. P. 29–36.

Ikekawa N., Zhao Y. J. Application of 24-epibrassinolide in agriculture // Brassinosteriods: Chemistry, Bioactivity and Applications. 1991. P. 280–291.

Janeczko A., Koscielniak J., Pilipowicz M. et al. Protection of winter rape photosystem II by 24-epibrassinolide under cadmium stress // Photosynthetica. 2005. Vol. 43. P. 293–298.

Jones-Held S., VanDoren M., Lockwood T. Brassinolide application to Lepidium sativum seeds and the effects on seedling growth // J. Plant Growth Regul. 1996. Vol. 15. P. 63–67.

Kagale S., Divi U. K., Krochko J. E. et al. Brassinosteroid confers tolerance in Arabidopsis thaliana and Brassica napus to a range of abiotic stresses // Planta. 2007. Vol. 225. P. 353–364.

Kamuro Y., Takatsuto S. Potential application of brassinosteroids in agricultural fields // Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones (Eds. A. Sakurai, T. Yokota, S. D. Clouse). Tokyo: Springer-Verlag, 1999. P. 223–241.

Kauschmann A., Adam G., Jessop A. et al. Genetic evidence for an essential role of brassinosteriods in plant development // Proc. Plant Growth Regul. Soc. Am. 1996. Vol. 23. P. 13.

Khripach V., Zhabinskii V. N., DeGroot A. Brassinosteriods. A New Class of Plant Hormones. San Diego: Academic Press, 1999. 338 p.

Khripach V., Zhabinskii V. N., DeGroot A. Twenty years of brassinosteriods: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century // Ann. Bot. 2000. Vol. 86. P. 441–447.

Khripach V. A., Zhabinskii V. N., Khripach N. V. New practical aspects of brassinosteroids and results of their ten-year agricultural use in Russia and Belarus // Brassinosteroids. Bioactivity and Crop Productivity. 2003. P. 189–230.

Krishna P. Brassinosteroid-mediated stress responses // J. Plant Growth Regul. 2003. Vol. 22. P. 289–297.

Leubner-Metzger G. Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways // Planta. 2001. Vol. 213. P. 758–763.

Leubner-Metzger G. Brassinosteroids promote seed germination // Brassinosteroids. Bioactivity and Crop Productivity. 2003. P. 119–128.

Li L., Van Staden J. Effects of plant growth regulators on the antioxidant system in callus of two maize cultivars subjected to water stress // Plant Growth Regul. 1998. Vol. 24. P. 55–66.

Müssig C., Fischer S., Altmann T. Brassinoteriod-regulated gene expression // Plant Physiol. 2002. Vol. 129. P. 1241–1251.

Nakashita H., Yasuda M., Nitta T. et al. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice // Plant J. 2003. Vol. 33, N 5. P. 887–898.

Nippon Kayaku Co., Ltd. JRDC-694 (epibrassinolide). Technical information, 1998.

Pereira-Netto A. B., Schaefer S., Galagovsky L. R., Ramirez J. A. Brassinosteroid-driven modulation of stem elongation and apical dominance: Application in micropropagation // Brassinosteroids. Bioactivity and Crop Productivity. 2003. P. 129–158.

Pipattanawong N., Fujishige N., Yamane K., Ogata R. Effects of brassinosteroid on vegetative and reproductive growth in two day-neutral strawberries // J. Japan. Soc. Hort. Sci. 1996. Vol. 65, N 3. P. 651–654.

Pshenichnaya L. A., Khripach V. A., Volynets A. P. et al. Brassinosteriods ad resistance of barley plants to

leaf diseases // Problems of Experimental Botany. Minsk: Belorussian Science, 1997. P. 210–217.

Rao S. S. R., Vardhini B. V., Sujatha E., Anuradha S. Brassinoseroids – A new class of phytohormones // Current Science. 2002. Vol. 82. P. 1239–1245.

Sairam R., Shukla D., Deshmukh P. Effect of homobrassinolide seed treatment on germination, alpha-amylase activity and yield of wjeat under moisture stress conditions // Indian J. Plant Physiology. 1996. Vol. 1. P. 141–144.

Sasse J. Physiological actions of brassinosteroids // Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones. 1999. P. 137–161.

Sasse J. M. Physiological Actions of Brassinosteriods: An Update // J. Plant Growth Regul. 2003. Vol. 22. P. 276–288.

Sasse J. M., Smith R., Hudson I. Effect of 24-epibrassinolide on germination of seeds of Eucalyptus camaldulensis in saline conditions // Proc. Plant Growth Regul. Soc. Amer. 1995. Vol. 22. P. 136–141.

Steber C. M., McCourt P. A role of Brassinosteroids in germination in *Arabidopsis* // Plant Physiology. 2001. Vol. 125. P. 763–769.

Takeuchi Y., Worsham A. D., Awad A. E. Effects of Brassinolide on conditioning and germination of witchweed (*Striga asiatica*) seeds // Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications. 1991. P. 298–305.

Takeuchi Y., Omigawa Y., Ogasawara M. et al. Effects of Brassinosteroids on conditioning and germination of clover broomrape (*Orobanche minor*) seeds // Plant Growth Regul. 1995. Vol. 16. P. 153–160.

Vardhini B. V., Rao S. S. R. Effect of brassinosteriods on salinity induced growth inhibition of groundnut seedlings // Indian J. Plant Physiol. 1997. Vol. 2. P. 156–157.

Vardhini B. V., Rao S. S. R. Effect of brassinosteriods on the activities of certain oxidizing and hydrolyzing enzymes of groundnut // Indian J. Plant Physiol. 2000. Vol. 5. P. 89–82.

Wilen R. W., Sacco M., Gusta L. V., Krishna P. Effects of 24-epibrassinolide on freezing and thermotolerance of brome grass (*Bromus intermis*) cell cultures // Physiol. Plantarum. 1995. Vol. 95. P. 195–202.

Xia X.-J., Wang Y.-J., Zhou Y.-H. et al. Reactive Oxygen Species Are Involved in Brassinosteroid-Induced Stress Tolerance in Cucumber // Plant Physiol. 2009. Vol. 150. P. 801–814.

Yamaguchi T., Wakizuka T., Hirari K. et al. Stimulation of germination in aged rice seeds by pretreatment with brassinolide // Proc. 14th Annual Meeting Plant Growth Regul. Soc. Am. (Ed. Cooke A. R.). Honolulu, Hawaii, 1987. P. 26–27.

Yu J. Q., Huang L. F., Hu W. H. et al. A Role of Brassinosteriods in the Regulation of Photosynthesis in Cucumis sativus // J. Exp. Bot. 2004. Vol. 55. P. 1135–1143.

Zhao Y. J., Chen J.-C. Studies on physiological action and application of 24-epibrassinolide in agriculture // Brassinosteroids. Bioactivity and Crop Productivity. 2003. P. 159–170.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Будыкина Нелли Петровна

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

эл. почта: kharkina@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 762712

Шибаева Татьяна Геннадиевна

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

эл. почта: kharkina@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 762706

Титов Александр Федорович

председатель КарНЦ РАН, чл.-корр. РАН, д. б. н. Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: krcras@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 769710

Budykina, Nelli

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

tel.: (8142) 762712

Shibaeva, Tatiana

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

tel.: (8142) 762706

Titov, Alexandr

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

УДК 577.115.3: 581.331.2: 582.632.1

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИПИДОВ ПЫЛЬЦЫ ОСНОВНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *BETULA* L.

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

Институт леса Карельского научного центра РАН

Впервые исследован жирнокислотный состав липидов зрелой пыльцы основных представителей рода *Betula* L., произрастающих в условиях Южной Карелии. Показано, что в весенний период клетки пыльцевых зерен характеризовались высоким содержанием липидов, представленных как запасными (нейтральными) (43 %), так и мембранными (фосфо- 24 % и гликолипидами – 33 %) липидами. Основными жирными кислотами микрогаметофита являлись среди насыщенных – пальмитиновая; среди ненасыщенных – линолевая и линоленовая, однако их количество варьировало в зависимости от фракции липидов. В нейтральной фракции и фосфолипидах накапливались преимущественно ди- и триеновые жирные кислоты, а в гликолипидах их доля оказалась несколько ниже на фоне заметного присутствия моноеновых жирных кислот (преимущественно олеиновой). По всей вероятности, это связано с физиологическими особенностями зрелого микрогаметофита, которые реализуются на клеточном уровне.

Ключевые слова: *Betula* L., пыльца, жирные кислоты, нейтральные липиды, гликолипиды, фосфолипиды.

L. V. Vetchinnikova, O. S. Serebryakova, M. K. Ilyinova. LIPID FATTY ACID COMPOSITION IN POLLEN OF MAIN REPRESENTATIVES OF BETULA L.

The fatty acid composition of lipids from mature pollen of the main representatives of genus *Betula* L. growing in southern Karelia was investigated for the first time. It is shown that in the spring season pollen cells contained high amounts of lipids, represented both by storage (neutral) lipids (43 %) and membrane (phospho- – 24 % and glyco- – 33 %) lipids. The main fatty acids of the microgametophyte were the palmitic among saturated acids, and the linoleic and linolenic among unsaturated acids, but their amount varied depending on the lipid fraction. In the neutral fraction and phospholipids there accumulated primarily di-and triene fatty acids, whereas in glycolipids their share was somewhat lower as significant amounts of monoene fatty acids (mainly oleic) were present. In all probability, this fact is connected with the physiological characteristics of a mature microgametophyte realized at the cellular level.

Key words: Betula L., pollen, fatty acids, neutral lipids, glycolipids, phospholipids.

Введение

В условиях Севера одной из главных лесообразующих пород является береза, которая относится к анемофильным растениям и характеризуется высокой специализацией репродуктивных органов в связи с адаптацией к неблагоприятным условиям среды, ограничивающим возможность опыления и оплодотворения. Не вызывает сомнения, что результативность системы опыления анемофильных видов, в том числе и представителей рода Betula L., существенным образом определяется морфофизиологическими свойствами пыльцы [Николаевская и др., 2009]. В анатомо-морфологическом плане процессы развития микрогаметофита описаны довольно подробно, однако их физиолого-биохимическая основа до сих пор остается слабоизученной.

В последние десятилетия исследования пыльцы древесных растений ведутся в нескольких направлениях: преимущественно для предупреждения проявления поллинозов у населения [Laadi, 2001; Corden et al., 2002; Emberlin, 2003 и др.], для реконструкции развития лесной растительности прошлых геологических эпох (споро-пыльцевой анализ) [Сладков, 1967; Елина и др., 2000; Чернова, 2004; Филимонова, 2009 и др.1, а также для экологической оценки состояния урбанизированных территорий (палиноиндикация) [Головко, 2001; Дзюба, 2006; Гайдыш, 2012 и др.].

Вместе с тем изучение физиолого-биохимических особенностей пыльцы, являющейся носителем генетической информации и выполняющей ведущую роль в процессе оплодотворения, имеет не только большой научный, но и практический интерес, который связан с вопросами семеноводства и лесовосстановления. Процессы прорастания пыльцы и роста пыльцевой трубки обеспечиваются активизацией многих биохимических процессов, в том числе и липидного обмена, поскольку липиды и составляющие их жирные кислоты служат важным источником энергии. Имеющиеся работы, посвященные изучению липидов пыльцы, выполнены преимущественно на хвойных породах [Ларионова и др., 1977; Кравченко и др., 1980; Рихтер, 1990; Andrikopoulos et al., 1985] и носят единичный характер.

Целью наших исследований явилось изучение жирнокислотного состава суммарных липидов и их фракций, содержащихся в зрелой пыльце основных древовидных представителей рода *Betula* L., произрастающих в условиях южной части Республики Карелия.

Материал и методы

Объектом исследования служила пыльца березы пушистой Betula pubescens Ehrh., березы повислой B. pendula Roth и карельской березы B. pendula Roth var. carelica (Mercklin) Hämet-Ahti. Ее сбор осуществляли в весенний период (с 10 по 15 мая 2010 г.) с 30–40-летних деревьев, произрастающих на экспериментальных участках, расположенных в зеленой зоне г. Петрозаводска (61°79′ с. ш., 34°35′ в. д.). Пыльцу заготовляли по общепринятой методике: ветки с мужскими сережками срезали накануне пыления, раздельно помещали в сухое помещение, пыльцу собирали после ее высыпания.

Экстракцию липидов из клеток пыльцы выполняли смесью хлороформа и метанола в соотношении 2: 1 по объему [Folch et al., 1957]. Суммарное количество липидов определяли весовым методом, а разделение на фракции методом колоночной хроматографии с использованием силикагеля (размер зерен - 75-150 μ, Sigma) [Simola, Koskimies-Soininen, 1984]. B качестве колонки служили пипетки Пастера длиной 145 мм. Фракции липидов извлекали последовательно следующими растворителями: нейтральные липиды - хлороформом, гликолипиды - ацетоном, фосфолипиды - метанолом. Полноту экстракции отдельных фракций контролировали путем их порционного сбора и индивидуального сжигания в концентрированной серной кислоте с последующим спектрофотометрированием растворов при длине волны 375 нм [Marsh, Weinstein, 1966]. Метиловые эфиры жирных кислот получали в результате переэтерификации липидов метанолом в присутствии ацетилхлорида и анализировали на газо-жидкостном хроматографе «Хроматэк -Кристалл 5000.1» (Йошкар-Ола, Россия) с использованием капиллярной колонки INNOWAX (30 м \times 0,32 мм) при температурах: термостата - 180 °C (изотерма), пламенно-ионизационного детектора - 240 °C, испарителя -220 °C и скорости газа-носителя (азот) -50 мл/мин. Идентификацию жирных кислот осуществляли с помощью стандартного набора метиловых эфиров жирных кислот (Supelko, 37 компонентов), а также сопоставлением эквивалентной длины цепи экспериментально полученных компонентов с известными данными [Сиймер и др., 1971] и логарифмических индексов [Jamieson, 1975]. Вычисляли содержание индивидуальных жирных кислот, а также их групп, объединенных по числу двойных связей в углеродной цепочке: моноеновые (М), диеновые (Д), триеновые (Тр) и насыщенные (H), у которых двойные связи отсутствуют. Индекс двойной связи (ИДС), характеризующий степень ненасыщенности липидов, рассчитывали по методу Лайонса и др. [Lyons et al., 1964]:

$$ИДC = \frac{M + 2Д + 3Тр}{100}$$

Коэффициент ненасыщенности (К) жирных кислот определяли по соотношению:

 $K = \sum$ ненасыщенных кислот/ \sum насыщенных кислот (где \sum – сумма).

Количественное определение жирных кислот проводили методом внутреннего стандарта (маргариновая кислота). Математическую обработку данных осуществляли с помощью общепринятых методов статистики с использованием пакета программ Microsoft Excel [Зайцев, 1984; Ивантер, Коросов, 2003]. В таблицах и на графиках приведены средние арифметические значения трех и более независимых экспериментов и их стандартные ошибки. Разницу средних величин оценивали по t-критерию Стьюдента и вероятности, которую признавали статистически значимой при р ≤ 0,05.

Результаты и обсуждение

Изучение репродуктивного цикла развития представителей рода Betula L. в условиях южной части Республики Карелия показало, что мужские генеративные органы после заложения визуально заметными становятся в июне, т. е. ранним летом (год заложения), формирование пыльцы завершается следующей весной, обычно в середине мая (год цветения). В сравнении с циклами физиолого-биохимического развития вегетативной и/или женской репродуктивной сферы процесс образования и существования пыльцы по длительности является наиболее коротким. Однако он продолжается почти полный календарный год, и многие факторы оказывают свое негативное воздействие на развитие микрогаметофита. Исследования, проведенные нами ранее [Николаевская и др., 2009], показали, что качество мужского гаметофита березы зависит не только от генотипических особенностей видов, но и от погодно-климатических характеристик (температура, влажность) отдельных лет. Нестабильность погодных условий, резкие перепады температур, засушливость или избыточная влажность могут оказать отрицательное воздействие и вызвать как структурные, так и функциональные изменения пыльцевых зерен в период их формирования. У березы процесс цветения опережает формирование вегетативной сферы, поэтому фертильность пыльцы и способность ее к прорастанию в значительной степени зависят от состояния мембран и их сохранности. Возврат низких температур в весенний период, часто наблюдаемый в условиях Карелии, может вызвать изменение жирнокислотного состава липидов, влекущее за собой физическое изменение состояния гидрофобного мембранного матрикса [Алаудинова и др., 2000].

Согласно полученным данным, в зрелой пыльце основных представителей рода Betula L. содержание суммарных липидов варьировало от 32 до 52 мг/г сухого в-ва (табл. 1). Более высокое их количество обнаружено у березы пушистой, оно превышало значения березы повислой и карельской березы в 1,2 и 1,6 раза соответственно. Анализ жирнокислотного состава показал, что в суммарных липидах пыльцы находилось не менее 25 компонентов с числом углеродных атомов от 14 до 24, представленных как насыщенными, так и ненасыщенными жирными кислотами (ЖК). Среди насыщенных преобладала пальмитиновая кислота, а среди ненасыщенных – линолевая.

Таблица 1. Содержание липидов в зрелой пыльце различных видов березы

Береза		Береза		Карельская		
пушиста	я	повисла	Я	береза	l	
мг/г		мг/г		мг/г		
сухого	%	сухого	%	сухого	%	
в-ва		в-ва		в-ва		
$19,2 \pm 0,9$	38	$16,0 \pm 1,4$	37	$16,7 \pm 1,4$	53	
$10,5 \pm 0,6$	20	$12,2 \pm 2,5$	28	$7,5 \pm 1,1$	24	
$21,5 \pm 2,0$	42	$15,2 \pm 1,8$	35	$7,4 \pm 0,2$	23	
$51,5 \pm 1,4$	100	$43,4 \pm 0,4$	100	$31,6 \pm 1,2$	100	
	пушиста мг/г сухого в-ва 19,2 ± 0,9 10,5 ± 0,6 21,5 ± 2,0	пушистая мг/г сухого в-ва 19,2 ± 0,9 38 10,5 ± 0,6 20 21,5 ± 2,0 42	пушистая повислая мг/г сухого в-ва % сухого в-ва 19,2 ± 0,9 38 16,0 ± 1,4 10,5 ± 0,6 20 12,2 ± 2,5 21,5 ± 2,0 42 15,2 ± 1,8	пушистая повислая мг/г сухого в-ва % сухого в-ва % в-ва 19,2 ± 0,9 38 16,0 ± 1,4 37 10,5 ± 0,6 20 12,2 ± 2,5 28 21,5 ± 2,0 42 15,2 ± 1,8 35	пушистаяповислаяберезамг/г сухого в-ва%мг/г сухого в-ва%мг/г сухого в-ва19,2 \pm 0,93816,0 \pm 1,43716,7 \pm 1,410,5 \pm 0,62012,2 \pm 2,5287,5 \pm 1,121,5 \pm 2,04215,2 \pm 1,8357,4 \pm 0,2	

По составу суммарные липиды пыльцы были представлены как нейтральными, или запасными, липидами (НЛ), так и полярными – фосфо-(ФЛ) и гликолипидами (ГЛ), являющимися структурной основой мембран. Сравнительный анализ изученных берез по концентрации отдельных групп выявил определенные различия между видами. Так, у березы пушистой и березы повислой концентрации нейтральных липидов и гликолипидов в клетках пыльцы преобладали над фосфолипидами в 2 и в 1,2 раза соответственно (табл. 1). В микрогаметофите карельской березы содержание запасных липидов превышало значения мембранных (как фосфо-, так и гликолипидов) более чем в 2 раза. Распределение липидов по фракциям, обнаруженное в зрелой пыльце различных видов березы, вероятно, обусловлено их видовой специфичностью и/или экологическими особенностями мест их произрастания.

Анализ жирнокислотного состава отдельных фракций показал следующее. В нейтральных и фосфолипидах основной уровень насыщенных ЖК определяла пальмитиновая кислота (С16:0), которая составляла в среднем соответственно 19 % и 32 % от общей суммы (табл. 2). В гликолипидах состав насыщенных жирных кислот был более разнообразным: кроме пальмитиновой кислоты (около 23 % от суммы жирных кислот) здесь присутствовали стеариновая (С18:0) – более 4,5 %, арахиновая (С20:0) – около 2,5 % и бегеновая (С22:0) – около 6 % от суммы ЖК.

Таблица 2. Концентрация основных насыщенных жирных кислот по фракциям липидов в пыльце изученных видов березы, % от суммы жирных кислот

21/1/	Береза			Береза			Карельская		
ЖК	П	/ШИСТ	ая	П	овисла	ЗЯ	береза		
	ΗЛ	ΦЛ	ΓЛ	ΗЛ	ΦЛ	ΓЛ	ΗЛ	ΦЛ	ГЛ
16:0	16,2	31,7	23,3	17,3	30,0	24,1	22,2	34,5	33,4
18:0	1,6	1,1	5,1	1,3	0,9	3,7	1,3	1,2	5,3
20:0	1,2	0,1	3,9	1,0	0,2	1,9	1,2	0,1	1,6
22:0	4,0	0,9	8,7	3,7	1,3	5,1	2,8	1,1	3,7

Примечание. ЖК – жирные кислоты, где 16:0 – пальмитиновая (гексадекановая), 18:0 – стеариновая (октадекановая), 20:0 – арахиновая (эйкозановая), 22:0 – бегеновая (докозановая). Здесь и в табл. 3, 4: НЛ – нейтральные липиды, ФЛ – фосфолипиды, ГЛ – гликолипиды.

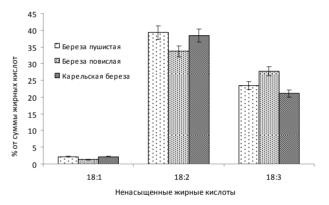
Ненасыщенные ЖК в пыльце березы содержали преимущественно 18 углеродных атомов в цепи, различающихся по количеству и положению двойных связей (табл. 3). Во всех фракциях доминировали линолевая и линоленовая ЖК (рис. 1). Содержание линолевой кислоты было выше по сравнению с линоленовой, но их соотношение несколько различалось в пыльце отдельных видов. Так, у березы пушистой и карельской березы линолевая кислота преобладала над линоленовой в среднем в 1,8 раза, у березы повислой – в 1,4 раза, независимо от фракции липидов.

Таблица 3. Концентрация основных ненасыщенных жирных кислот по фракциям в пыльце изученных видов березы, % от суммы жирных кислот

	-		-		-					
	Береза			Е	Береза			Карельская		
ЖК	пушистая		повислая			береза				
	ΗЛ	ΦЛ	ΓЛ	ΗЛ	ΦЛ	ΓЛ	ΗЛ	ΦЛ	ΓЛ	
16:1(n-7)	1,0	0,8	3,2	1,6	5,0	2,9	1,1	1,2	3,4	
18:1(n-9)	6,3	2,2	6,9	4,4	1,3	6,2	4,6	2,2	12,4	
18:2(n-6)	42,2	39,3	28,9	40,3	33,7	31,5	42,4	38,4	26,5	
18:3(n-3)	25,9	23,5	17,0	29,7	27,7	22,6	24,3	21,1	13,2	

Примечание. ЖК – жирные кислоты, где 16:1 – пальмитолеиновая (гексадеценовая), 18:1 – олеиновая (октадеценовая), 18:2 – линолевая (октадекадиеновая), 18:3 – линоленовая (октадекатриеновая).

Исследования отдельных фракций липидов изученных видов обнаружили различия в содержании олеиновой кислоты (С18:1), которая в дальнейшем может приводить к изменению функционального состояния мембран растения [Лось, 2005], поскольку является субстратом для синтеза ди- и триеновых (линолевой и линоленовой) ЖК. Наибольшие количества олеиновой кислоты наблюдали во фракции гликолипидов (рис. 1, Б), причем в пыльце карельской березы ее доля составила более 12 % от суммы жирных кислот, у других изученных видов – в два раза меньше. Минимальные ее значения (около 2 %), независимо от вида березы, обнаружены во фракции фосфолипидов (рис. 1, А).



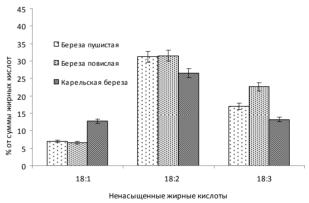


Рис. 1. Содержание ненасыщенных жирных кислот типа С18 в фосфо- (A) и гликолипидах (Б) пыльцы различных видов березы

Из полученных данных следует, что во всех фракциях липидов пыльцы изученных берез содержание ненасыщенных ЖК преобладало над насыщенными (табл. 4). Более того, в нейтральной фракции сумма ненасыщенных ЖК в 3 раза превысила сумму насыщенных. В мембранных липидах коэффициент ненасыщенности (К) оказался ниже по сравнению с нейтральными. По всей вероятности, это связано с тем, что зрелая пыльца до опыления имеет очень низкую физиологическую активность, и

на этом этапе ее развития мембраны находятся в фазе геля и практически не функционируют [Лось, 2005]. В дальнейшем, после попадания пыльцы на рыльце пестика, ЖК будут выполнять субстратную и/или энергетическую роль, а также участвовать в синтезе веществ, обеспечивающих рост пыльцевой трубки. Активизация метаболических процессов будет происходить также при взаимодействии пыльцы и рыльца в процессе адгезии, прорастания пыльцы, оплодотворения и дальнейшего формирования зиготы [Shivanna, 1979; Heslop-Harrison, 1982; Кузнецов, Дмитриева, 2006].

Таблица 4. Коэффициент ненасыщенности (К) и индекс двойной связи (ИДС) отдельных фракций липидов в пыльце различных видов березы

Фракции		Береза пушистая		реза ислая	Карельская береза		
липидов	K	ИДС	K	ИДС	K	ИДС	
НЛ	3,1	1,7	3,2	1,8	3,0	1,6	
ФЛ	1,9	1,5	1,9	1,5	1,5	1,4	
ГЛ	1,4	1,2	1,8	1,4	1,4	1,1	

Наиболее полно степень ненасыщенности липидов характеризует индекс двойных связей (ИДС), поскольку он отражает не только сумму ненасыщенных ЖК, но и число двойных связей. Величина ИДС не всегда совпадает со значениями коэффициента ненасыщенности. В зрелой пыльце всех изученных видов березы, несмотря на более низкие значения ИДС по сравнению с уровнем К (в 1,8 раза), ненасыщенность ЖК сохранила доминирующие позиции во фракции нейтральных липидов (табл. 4). По всей вероятности, это связано с механизмами сохранения жизнеспособности пыльцы и возможностями ее адаптации к действию отрицательных температур, которые наблюдаются в Карелии в весенний период. Стрессовые условия окружающей среды оказывают сильное воздействие на развитие генеративных органов и определяются погодно-климатическими условиями в период формирования пыльцы [Третьякова, Носкова, 2004]. В многочисленных работах [Родионов, 1978, 1983; Крепс, 1981; Лось, 2005 и др.] показано, что ведущая роль в развитии неспецифических реакций в ответ на неблагоприятное действие низких температур связывается с преобладанием ненасыщенных жирных кислот.

Существенные различия между фракциями липидов пыльцы березы выявлены в соотношении мо-, ди- и триеновых жирных кислот (рис. 2). Преобладающими во всех фракциях были диеновые жирные кислоты, однако наибольшее их количество отмечено во фракциях нейтральных и фосфолипидов. В гликолипидах со-

держание как ди-, так и триеновых жирных кислот оказалось несколько ниже на фоне заметного присутствия моноеновых жирных кислот (преимущественно за счет олеиновой). Подобное соотношение ненасыщенных жирных кислот с различным числом двойных связей было обнаружено нами ранее в почках березы в фазу их распускания [Ветчинникова, 2005]. По всей вероятности, это обусловлено действием Δ9-ацил-липидной десатуразы, вызывающей образование двойной связи в $\Delta 9$ -положении стеариновой кислоты (18:0) с образованием олеиновой кислоты (18:1), которая в дальнейшем будет служить субстратом для образования ди- и триеновых (линолевой и линоленовой) жирных кислот и в конечном итоге приведет к изменению структурного и функционального состояния мембран растения [Los. Murata, 1998; D'andrea et al., 2002; Лось, 2005, Кипайкина, 2006].

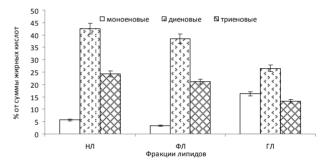


Рис. 2. Соотношение моно-, ди- и триеновых жирных кислот в отдельных фракциях липидов пыльцы карельской березы

Таким образом, зрелая пыльца основных представителей рода Betula L., произрастающих в условиях Южной Карелии, характеризуется довольно высоким содержанием липидов (от 32 до 52 мг/г сухого в-ва), представленных как запасными (нейтральными) липидами (43 %), так и мембранными (фосфо- - 24 % и гликолипидами – 33 %). До опыления микрогаметофит имеет очень низкую физиологическую активность. В дальнейшем после пыления и попадания пыльцы на рыльце пестика накопленные нейтральные липиды подвергаются расщеплению, а углерод используется в синтезе углеводов, за счет которых покрываются издержки ана- и катаболизма зиготы в период ее гетеротрофного развития [Тарчевский, 1996]. Основными жирными кислотами микрогаметофита среди насыщенных является пальмитиновая, а ненасыщенных - линолевая и линоленовая, однако их количество варьирует в зависимости от фракции липидов. В нейтральных и фосфолипидах накапливаются преимущественно ди- и триеновые жирные кислоты, в гликолипидах их доля несколько ниже на фоне заметного присутствия моноеновых жирных кислот (преимущественно за счет олеиновой). Среди диеновых жирных кислот доля линолевой кислоты составила более 40 %, среди триеновых преобладала линоленовая кислота – около 25 %. По всей вероятности, это связано с физиологическими особенностями зрелого микрогаметофита, которые реализуются на клеточном уровне.

Исследования выполнены при частичной финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Отделения биологических наук РАН «Биологические ресурсы России: оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга».

Литература

Алаудинова Е. В., Миронов П. В., Репях С. М. Жирные кислоты мембранных липидов живых тканей почек лиственницы сибирской // Химия растительного сырья. 2000. № 2. С. 41–45.

Ветчинникова Л. В. Карельская береза и другие редкие представители рода Betula L. М.: Наука, 2005. 269 с.

Гайдыш И. С. Биоиндикация природной среды малого северо-таежного промышленного города: на примере г. Костомукша: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2012. 22 с.

Головко В. В. Исследование пыльцевой компоненты атмосферного аэрозоля юга Западной Сибири: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 2001. 16 с.

Дзюба О. Ф. Палиноиндикация качества окружающей среды. СПб.: Недра, 2006. 198 с.

Елина Г. А., Лукашов А. Д., Юрковская Т. К. Позднеледниковье и голоцен Восточной Фенноскандии (палеорастительность и палеогеография). Петрозаводск: Карельский НЦ РАН, 2000. 242 с.

Зайцев Г. Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. М.: Наука, 1984. 424 с.

Ивантер Э. В., Коросов А. В. Введение в количественную биологию. Петрозаводск: ПетрГУ, 2003. 304 с

Кипайкина Н. В. Участие $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы в формировании устойчивости к гипотермии растений табака, трансформированных геном desC из Synechococcus vulcanus: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. 2006. 16 с.

Кравченко Л. В., Частий В. П., Гербеда В. В. Содержание липидов в пыльце хвойных древесных интродуцентов // Физиолого-биохимические основы повышения продуктивности растений. Минск: Наука и техника, 1980. С. 168–171.

Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран. Л.: Наука, 1981. 339 с.

Кузнецов В. В., Дмитриева Г. А. Физиология растений. М.: Высш. шк., 2006. 742 с.

Ларионова Н. А., Минина Е. Г., Кирьянова И. А. и др. Ауксины, ингибиторы роста и липиды пыльцы

кедра сибирского // Физиология растений. 1977. T. 24, № 1. C. 175–179.

Лось Д. А. Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений // Вестник РАН. Т. 75, № 4. 2005. С. 338–345.

Николаевская Т. С., Ветчинникова Л. В., Титов А. Ф., Лебедева О. Н. Изучение пыльцы у аборигенных и интродуцированных в условия Карелии представителей рода Betula L. // Труды Карельского НЦ РАН. 2009. № 4. С. 90–95.

Рихтер А. А. Вариабельность жирнокислотного состава липидов пыльников и пестиков у различных сортов миндаля // Бюл. Главного ботан. сада АН СССР. 1990. № 156. С. 43–47.

Родионов В. С. Влияние низких температур на липидный обмен в растениях и фазовые переходы в мембранах // Эколого-физиологические механизмы устойчивости растений к действию экстремальных температур. Петрозаводск: КФ АН СССР, 1978. С. 37–57.

Родионов В. С. Изменения в мембранных липидах растений при пониженных температурах // Липидный обмен древесных растений в условиях Севера. Петрозаводск: КФ АН СССР, 1983. С. 4–68.

Сиймер Э. Х., Таутс О. В., Мейстер К. Э. Рассчитанные значения ЭДЦ сіз-полиеновых метилен-разделенных жирных кислот // Тр. Таллиннского политехн. ин-та. Сер. А. 1971. № 300. С. 73–78.

Сладков А. Н. Введение в спорово-пыльцевой анализ. М.: Наука, 1967. 270 с.

Тарчевский И. А. Процессы деградации у растений // Соросовский образовательный журнал. 1996. № 6. С. 13–19.

Третьякова И. Н., Носкова Н. Е. Пыльца сосны обыкновенной в условиях экологического стресса // Экология. 2004. № 1. С. 26–33.

Филимонова Л. В. Динамика растительности восточного побережья Финского залива в голоцене // Труды Карельского НЦ РАН. 2009. № 4. С. 11–29.

Чернова Г. М. Спорово-пыльцевой анализ отложений плейстоцена – голоцена. СПб.: СПбГУ, 2004. 128 с.

Andrikopoulos N. K., Siafaka-Kapadai A., Demopoulos C. A., Kapoulos V. M. Lipids of Pinus halepensis pollen // Phytochemistry. 1985. Vol. 24, N 12. P. 2953–2957.

Corden J. M., Stach F., Millington W. M. A. Comparison of Betula pollen seasons at two European sites; Derby, United Kingdom and Poznan, Poland (1995–1999) // Aerobiologia. 2002. Vol. 18, N 1. P. 45–53.

D'andrea S., Guillou H., Catheline D. et al. The same rat 6-desaturase not only acts on 18- but also on 24-carbon fatty acids in very-long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis // Biochem. J. 2002. Vol. 364. P. 49–55.

Emberlin J., Detand M., Gehrig R. et al. Responses in the start of Betula (birch) pollen seasons to recent changes in spring temperatures across Europe // Int. J. Biometeorol. 2003. Vol. 47. P. 113–115.

Folch J., Lees M., Stanley G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226, N 1. P. 497–509.

Heslop-Harrison J. Pollen-stigma interaction and cross-incompatibility in the grasses // Science. 1982. Vol. 215, N 4538. P. 1358-1364.

Jamieson G. R. GLC identification techniques for long-chain unsaturated fatty acids // J. Chromat. Sci. 1975. Vol. 13. P. 491-497.

Laadi M. Regional variations in the pollen seasons of Betula in Burgundy: two models for predicting the start of the pollination // Aerobiologia. 2001. Vol. 17. P. 247-254.

Los D. A., Murata N. Structure and expression of fatty acid desaturases // Biochim. Biophys Acta. 1998. Vol. 1394, P. 3-15.

Shivanna K. phenomena during pollen-pistil interaction // Proc. Indian Acad. Sci. B88, N 2. Part 2. 1979. P. 115-141.

N 4. P. 574-579.

Simola L. K., Koskimies-Soininen K. Comparison of Glycolipids and Plastids in Callus Cells and Leaves of Alnus and Betula // Plant and Cell Physiol. 1984. N 25 (8), P. 1329-1340,

Lyons J. M., Wheaton T. A., Pratt H. K. Relationship

Marsh J. B., Weinstein D. B. Simple charring method

Recognition and rejection

between the physical nature of mitochondrial

membranes and chilling sensitivity in plants // Plant

for determination of lipids // J. Lipid Res. 1966. Vol. 7,

Physiol. 1964. Vol. 39, N 2. P. 262-268.

R.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Ветчинникова Лидия Васильевна

рук. группы биотехнологии воспроизводства древесных растений, вед. науч. сотр., д. б. н. Институт леса Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: vetchin@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 768160

Серебрякова Оксана Сергеевна

аспирант

Институт леса Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: 531521@mail.ru

Ильинова Мария Казимировна

старший научный сотрудник, к. б. н. Институт леса Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: iljinova@krc.karelia.ru

Vetchinnikova, Lidia

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

Serebryakova, Oksana

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

Ilyinova, Maria

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

УДК 577.15: 597.554.3+574.47 (285)

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛИКОЗИДАЗ КИШЕЧНИКА ЛЕЩЕЙ *ABRAMIS BRAMA* (L.) ИЗ УЧАСТКОВ РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА С РАЗЛИЧНОЙ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКОЙ

И. Л. Голованова, А. А. Филиппов

Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН

В экспериментах *in vitro* исследована активность, а также температурные и кинетические характеристики гликозидаз слизистой оболочки и химуса кишечника лещей *Abramis brama* (L.) из участков Рыбинского водохранилища с различной антропогенной нагрузкой. Показано значительное сходство уровня активности и температурного оптимума гликозидаз у леща загрязненного Шекснинского и относительно чистого Моложского плесов. Более низкая активность мальтазы в зоне температуры $0-20~^{\circ}$ С и более высокие значения $E_{\text{акт}}$ гликозидаз у леща Шекснинского плеса свидетельствуют о снижении эффективности гидролиза углеводных компонентов корма, а увеличение фермент-субстратного сродства — об адаптивных изменениях этого показателя с ростом уровня антропогенной нагрузки.

К л ю ч е в ы е с л о в а : гликозидазы, пищеварение, рыбы, антропогенное загрязнение.

I. L. Golovanova, A. A. Filippov. CHARACTERISTICS OF INTESTINAL GLYCOSIDASES IN BREAM FROM THE RYBINSKOYE RESERVOIR SITES DIFFERING IN ANTHROPOGENIC LOADING

The activity, temperature and kinetic characteristics of the intestinal mucosa and cheme glycosidases were investigated *in vitro* in bream *Abramis brama* (L.) from parts of the Rybinskoye storage reservoir differing in anthropogenic loading. Considerable similarity was found in the enzymatic activity level and the temperature optimum of glycosidases in bream from the polluted Sheksna and the relatively clean Mologa pools. The lower maltase activity at a temperature of 0–20 °C and the higher values of glycosidases $E_{\rm act}$ in bream from Sheksninsky pool testify to a decrease in the efficiency of food carbohydrate hydrolysis, but the increase in the enzyme-substratum affinity suggests this parameter changes as an adaptation to growing human pressure.

Key words: glycosidase, digestion, fish, anthropogenic pollution.

Введение

Рыбинское водохранилище (58 30' с. ш., 38 20' в. д.) – одно из крупнейших пресноводных искусственных водоемов России. Оно образовано в 1941–1947 гг. на месте слияния

трех крупных рек: Волги, Мологи и Шексны. Соответственно руслам этих рек выделяют Волжский, Моложский, Шекснинский и Главный плесы. Наиболее загрязненным участком Рыбинского водохранилища считается Шекснинский плес, принимающий сточные воды

промышленного комплекса г. Череповца. В различных компонентах экосистемы Шекснинского плеса (вода, донные отложения, бентос, рыбы) обнаружены полициклические ароматические углеводороды - нафталин, флуорен, трифенилен и др., стойкие органические загрязнители - полихлорированные бифенилы (ПХБ) и хлорорганические пестициды (ХОП), тяжелые металлы - Cd, Zn, Cu, Pb [Козловская, Герман, 1997; Флеров и др., 2000; Герман, Законнов, 2003; Чуйко и др., 2010]. При этом их содержание было на 1-2 порядка выше по сравнению с относительно чистым Моложским плесом. У лещей, отловленных в районе Шекснинского плеса, отмечены повышенные концентрации ПХБ и ХОП [Герман, Козловская, 1999; Чуйко и др., 2010], высокий уровень напряженности врожденного иммунитета [Лапирова, Заботкина, 2010], изменения активности кишечных протеиназ [Ушакова и др., 2009] и активности ацетилхолинэстеразы [Chuiko et al., 2007]. Несмотря на то что токсические вещества, находящиеся в воде, грунте и объектах питания, могут оказывать прямое и опосредованное действие на ферменты пищеварительного тракта, активность гликозидаз, расщепляющих углеводные компоненты корма, у лещей из участков Рыбинского водохранилища с различной антропогенной нагрузкой ранее не оценивалась. Известно лишь о большей активности α-амилазы, функционирующей в полости и слизистой оболочке кишечника леща Шекснинского плеса, по сравнению с более чистым Волжским плесом [Кузьмина, 1983].

В связи с этим цель работы состояла в сравнительном изучении *in vitro* уровня активности, а также температурных и кинетических характеристик гликозидаз слизистой оболочки и химуса кишечника лещей *Abramis brama* (L.), отловленных на участках Рыбинского водохранилища с различной антропогенной нагрузкой.

Материал и методы

В качестве объекта исследования выбран лещ – наиболее типичный представитель массовых промысловых видов рыб Рыбинского водохранилища. Половозрелые особи леща отловлены в Моложском (ст. Первомайка) и Шекснинском (ст. Любец) плесах Рыбинского водохранилища летом 2008 г. тралом с экспедиционного судна. Первый участок считается относительно чистой, второй – наиболее загрязненной частью акватории. Исследовали 10 и 7 экз. рыб из первой и второй группы соответственно. После отлова проводили полный биологический анализ. Линейно-массовые показатели и упи-

танность рыб из разных плесов достоверно не различались (р > 0,05). Длина и масса лещей из Моложского плеса составляли 31,1 \pm 0,9 см и 665 \pm 53 г, из Шекснинского плеса – 31,9 \pm 2,2 см и 688 \pm 113 г; упитанность рыб по Кларк – 1,90 \pm 0,04 и 1,79 \pm 0,06, по Фультону – 2,16 \pm 0,05 и 2,07 \pm 0,09, соответственно.

Кишечники рыб извлекали сразу после вылова и хранили при температуре 18 °C не более двух недель. Химус и слизистую оболочку (предварительно промытую охлажденным до 2-4 °C раствором Рингера для холоднокровных животных: 110 мМ NaCl, 1,9 мМ КСl, 13 мМ CaCl₂, pH 7,4) медиального отдела кишки использовали для приготовления индивидуальных гомогенатов. Растворы субстратов (растворимый крахмал 4,5-72 г/л, мальтоза и сахароза в концентрации 12,5-200 ммоль/л) готовили на таком же растворе Рингера. Гомогенаты и растворы субстратов инкубировали при постоянном перемешивании в течение 30 мин при температуре 20 °C или в диапазоне температуры 0-70 °C, pH 7,4.

Активность гликозидаз: амилолитическую активность (отражающую суммарную активность ферментов, гидролизующих крахмал - α-амилазы КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы КФ 3.2.1.3 и мальтазы КФ 3.2.1.20) и активность сахаразы КФ 3.2.1.48 определяли модифицированным методом Нельсона, активность мальтазы - глюкозооксидазным методом, активность α-амилазы - модифицированным методом Смита и Роя [Уголев и др., 1969]. Ферментативную активность у каждой особи определяли в трех повторностях с учетом фона (изначального количества гексоз в гомогенате) и выражали в мкМ продуктов реакции, образующихся за 1 мин инкубации ферментативно-активного препарата и субстрата в расчете на 1 г влажной массы ткани (мкмоль/ Γ -мин), активность α -амилазы – в м Γ крахмала, гидролизованого за 1 мин (мг/г·мин). Кинетические характеристики гидролиза углеводов - значения кажущейся константы Михаэлиса (К_т) и максимальной скорости реакции (V_{max}) - определяли графическим методом Лайнуивера-Берк, строя графики зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в координатах двойных обратных величин. Энергию активации (Е,,) рассчитывали графическим методом Аррениуса.

Данные обработаны статистически с помощью пакета прикладных программ Statgraphics Plus 5.1 и Excel 2003. Результаты представлены в виде средних и их ошибок ($M \pm m$). Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA, LSD-тест) при p = 0.05 [Sokal, Rolf, 1995].

Результаты и обсуждение

Активность гликозидаз химуса, отражающая активность ферментов, функционирующих в полости кишечника, у рыб из разных плесов оказалась близка (табл. 1). Уровень активности гликозидаз в слизистой оболочке кишечника леща в 1,2-6,4 раза ниже, чем в химусе, что хорошо согласуется с данными, полученными на других видах рыб бенто- и планктофагов [Уголев, Кузьмина, 1993]. У лещей двух популяций активность гликозидаз слизистой оболочки не различалась, исключая мальтазу, активность которой у рыб Шекснинского плеса на 25 % ниже по сравнению с Моложским. Однако активность протеиназ, гидролизующих белковые компоненты корма, в слизистой оболочке кишечника леща со ст. Любец Шекснинского плеса в 1,4 раза выше, чем у рыб со ст. Первомайка Моложского плеса [Ушакова и др., 2009]. Эти различия могут быть обусловлены как изменением состава кормовой базы, спектра питания и биохимического состава пищи у рыб, обитающих в загрязненном районе, так и разным влиянием токсических веществ на активность протеиназ и гликозидаз.

Таблица 1. Активность и кинетические характеристики гликозидаз химуса и слизистой оболочки кишечника лещей, отловленных в Моложском и Шекснинском плесах Рыбинского водохранилища

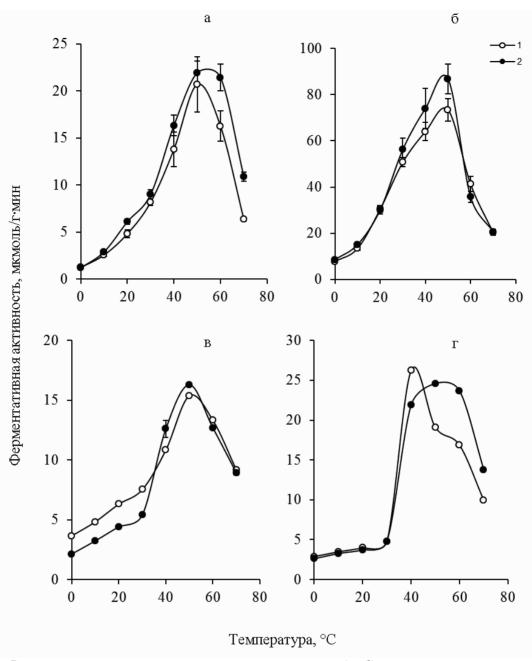
Показатель	Моложский	Шекснин- ский	
Химус			
Активность α-амилазы,			
мг/г∙мин	$191,2 \pm 3,69$	173,9 ± 11,0	
Активность мальтазы,			
мкмоль/г∙мин	$3,98 \pm 0,08$	$3,72 \pm 0,05$	
Активность сахаразы,			
мкмоль/г∙мин	$0,40 \pm 0,07$	0.37 ± 0.02	
Амилолитическая активность,			
мкмоль/г∙мин	$29,2 \pm 1,95$	$27,1 \pm 0,90$	
Слизистая об	болочка	i	
Активность α-амилазы,			
мг/г∙мин	$35,8 \pm 2,76$	$27,4 \pm 2,76$	
Активность мальтазы,			
мкмоль/г∙мин	$1,31 \pm 0,01$	0.98 ± 0.03 *	
Активность сахаразы,			
мкмоль/г∙мин	$0,31 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,04$	
Амилолитическая активность,			
мкмоль/г∙мин	$6,58 \pm 0,56$	$7,64 \pm 0,99$	
K _™ гидролиза мальтозы, ммоль	$3,30 \pm 0,21$	$6,95 \pm 0,86*$	
$K_{_{\!{}_{\!{}_{\!{}^{\!\scriptscriptstyle{M}}}}}}$ гидролиза сахарозы, ммоль	$19,9 \pm 3,87$	$7,03 \pm 1,37*$	
$K_{_{m}}$ гидролиза крахмала, г/л	$3,61 \pm 0,18$	$2,72 \pm 0,19*$	
$V_{\scriptscriptstyle{max}}$ гидролиза мальтозы,			
мкмоль/г∙мин	$1,49 \pm 0,01$	$1,18 \pm 0,06*$	
$V_{\scriptscriptstyle{max}}$ гидролиза сахарозы,			
мкмоль/г∙мин	$0,57 \pm 0,06$	$0,48 \pm 0,11$	
$V_{\scriptscriptstyle{max}}$ гидролиза крахмала,			
мкмоль/г∙мин	$12,6 \pm 0,5$	$11,9 \pm 1,2$	

Примечание. Приведены средние значения показателей и их ошибки (M \pm m); * – достоверные различия показателей у рыб, отловленных в разных плесах (p < 0,05).

Сравнение значений К позволило выявить значительные различия между двумя популяциями рыб (табл. 1). Так, К гидролиза мальтозы у рыб загрязненного района в 2,1 раза выше, что свидетельствует о снижении сродства ферментов к субстрату. В то же время значения К_ гидролиза сахарозы у леща Шекснинского плеса были в 2,8 раза, а К гидролиза крахмала в 1,3 раза ниже по сравнению с Моложским плесом. Эти изменения отражают адаптивное повышение фермент-субстратного сродства с ростом уровня антропогенного загрязнения. Значения $V_{\scriptscriptstyle{max}}$ у особей исследованных групп различались в меньшей степени: отмечено лишь достоверное снижение $V_{\scriptscriptstyle max}$ гидролиза мальтозы у леща из загрязненного участка (p < 0.05).

Исследование амилолитической активности химуса у лещей указанных районов в широком диапазоне температуры инкубации выявило отсутствие различий как в уровне активности, так и в форме кривых температурной зависимости (рис., а). Температурный оптимум гидролиза крахмала отмечен при 50 °C (рис., б), относительная активность при 0 °C составляла 10,5 %, при 10 °C – 17,5 %, при 20 °C – 35–40 % от максимальной у рыб обеих исследованных групп. Характер кривой температурной зависимости гликозидаз слизистой оболочки кишечника незначительно отличался от вышеописанного. Однако у леща Шекснинского плеса зона температурного оптимума несколько шире (50-60 °C), а относительная активность гликозидаз в зоне постмаксимальных значений температуры выше, чем у рыб Моложского плеса. Так, относительная активность при 60 и 70 °C составляет 98 и 50 % у первых и лишь 79 и 31 % у вторых. Вполне вероятно, что под действием некоторых загрязнителей происходит стабилизация свойств ферментативного белка, позволяющая более эффективно функционировать в зоне постмаксимальных значений температуры. Однако, поскольку гидролиз крахмала в слизистой оболочке кишечника происходит с участием сорбированных из полости (α-амилаза) и собственно мембранных (глюкоамилаза и мальтаза) ферментов, соотношение которых у рыб из чистого и загрязненного районов может меняться, судить о механизме этого явления не представляется возможным.

Температурный оптимум мальтазы слизистой оболочки кишечника лещей из двух популяций равен 50 °C. Однако относительная активность фермента в зоне физиологических значений температуры (0–20 °C) у рыб Моложского плеса составляла 24–40 %, Шекснинского плеса – лишь 13–27 % от максимальной, что



Влияние температуры на амилолитическую активность (a, б) и активность мальтазы (в, г) в слизистой оболочке (a, в) и химусе (б, г) кишечника лещей, выловленных в относительно чистом Моложском (1) и загрязненном Шекснинском (2) плесах Рыбинского водохранилища

свидетельствует об ухудшении условий функционирования в зоне антропогенного загрязнения. Температурный оптимум мальтазы химуса составил 40 °C у лещей из более чистого и 50 °C из более грязного плесов (рис., в, г), при этом у рыб второй группы зона температурного оптимума шире и относительная активность мальтазы в зоне постмаксимальных значений температуры выше.

В зоне температуры жизнедеятельности (0–20 °C) амилолитическая активность химуса в 5–7 раз выше, чем таковая слизистой оболоч-

ки кишечника; в зоне постмаксимальных значений температуры – лишь в 2–3 раза. Активность мальтазы в слизистой оболочке выше, чем в химусе, лишь у рыб более чистого района. Эти различия могут быть обусловлены разными характеристиками ферментов, функционирующих в составе слизистой оболочки кишечника (преимущественно мембранные ферменты) и химуса (панкреатические ферменты рыб, а также ферменты жертвы и энтеральной микробиоты). Поскольку характеристики одноименных, но различающихся по происхождению

ферментов существенно различаются [Кузьмина и др., 2008], действие загрязняющих веществ на них также может быть различным.

Сопоставление величин Еакт амилолитической активности слизистой оболочки кишечника лещей из разных участков Рыбинского водохранилища в диапазоне температур жизнедеятельности позволило выявить существенные различия (табл. 2). У леща из более чистого района излом на графике Аррениуса отсутствует, что соответствует полученным ранее данным [Уголев, Кузьмина, 1993], из загрязненного – отмечен при 20 °C. При исследовании гликозидаз химуса излом на графике отмечен при 30 °C у рыб обеих групп. В диапазоне температуры 0-20 °С величины Е_{акт} у леща более чистого плеса минимальны (эффективность процесса выше). Увеличение температуры приводит к снижению величины этого параметра, в большей мере в химусе, чем в слизистой оболочке. При этом значения Еакт гликозидаз химуса значительно ниже таковых слизистой оболочки. Значения Е_{якт} мальтазы и слизистой оболочки, и химуса у лещей из Моложского плеса ниже, чем из Шекснинского (излом на графике отмечен при 30 °C во всех вариантах опыта). Эти данные свидетельствуют о том, что у рыб, обитающих в загрязненном плесе, эффективность гидролиза ди- и полисахаридов в зоне температуры жизнедеятельности ниже, чем у рыб более чистого участка. Полученные результаты хорошо согласуются с данными по Еакт протеиназ слизистой оболочки кишечника леща указанных выборок [Ушакова и др., 2009].

Таблица 2. Значения $E_{\rm act}$ гликозидаз, функционирующих в слизистой оболочке и химусе кишечника лещей, выловленных из загрязненного Шекснинского и более чистого Моложского плесов Рыбинского водохранилища

		Энергия а			
Плес	Препарат	ккал/	моль	Точка пере-	
TibleC	Препарат	до	после	гиба, °С	
		перегиба	перегиба		
	Амилолити	іческая акт	ивность		
Моложский	Слизистая	9,3	9,3	Нет	
	Химус	8,4	3,6	30	
Шекснин-	Слизистая	14,5	6,8	20	
ский	Химус	10,3	4,2	30	
	· N	Лальтаза			
Моложский	Слизистая	4,3	6,9	30	
	Химус	2,7	15,0	30	
Шекснинский	Слизистая	5,0	15,7	30	
	Химус	3,7	16,1	30	

Поскольку в грунтах и тканях леща Шекснинского плеса установлено повышенное содержание ПХБ и тяжелых металлов [Флеров и др., 2000; Чуйко и др., 2010], можно предположить, что именно с их действием связаны изменения

характеристик пищеварительных гликозидаз, выявленные в данной работе. Действительно, ранее в экспериментах in vitro показаны значительные изменения активности протеиназ и гликозидаз, а также кинетических характеристик гидролиза углеводов у ряда видов пресноводных рыб при действии тяжелых металлов (Cu, Zn, Cd, Hg) и ПХБ [Кузьмина и др., 2005; Голованова, 2008; Филиппов, Голованова. 2010: Голованова и др., 2011]. Кроме того, были установлены различия в чувствительности пищеварительных гидролаз рыб, обитающих в различных участках Рыбинского водохранилища, к действию ионов биогенных металлов [Голованова и др., 2009; Кузьмина и др., 2010]. Однако активность пищеварительных гликозидаз и протеиназ рыб может значительно снижаться при хроническом действии сырой нефти [Кравецкий и др., 2010], оловоорганических соединений [Бузинова, 1975], хлорофоса [Голованова, Таликина, 2006]. Нафталин при хроническом действии повышает активность гликозидаз и протеиназ в химусе кишечника мозамбикской тилапии Oreochromis mossambicus Peters на 50-98 % от контроля [Golovanova et al., 1994; Kuz'mina et al., 1999], хотя в экспериментах in vitro не вызывает значительных изменений амилолитической активности слизистой оболочки кишечника у 12 видов рыб, обитающих в Рыбинском водохранилище [Golovanova et al., 1994]. Эти данные, наряду со сведениями об изменении чувствительности гликозидаз к действию тяжелых металлов под влиянием загрязнителей органической природы [Filippov, Golovanova, 2012], позволяют заключить, что выявленные изменения уровня активности, температурных и кинетических характеристик гидролиза углеводов в кишечнике леща, выловленного в Шекснинском плесе Рыбинского водохранилища, вызваны комплексным загрязнением этого района.

Механизм токсического действия загрязнителей органической и неорганической природы на пищеварительные ферменты рыб до сих пор не изучен и, по всей вероятности, неспецифичен. В условиях in vivo изменение активности пищеварительных гидролаз может свидетельствовать об изменении как интенсивности синтеза соответствующих ферментов, так и условий их функционирования. При этом возможно изменение физико-химических свойств самой молекулы фермента или ее мембранного окружения. Поскольку существует несколько изоформ α-амилазы, глюкоамилазы и мальтазы [Уголев, Кузьмина, 1993], нельзя исключить и молекулярную разнокачественность гликозидаз, функционирующих в кишечнике лещей из относительно чистого и загрязненного районов. В то же время выявленный в ряде случаев четкий концентрационно-зависимый эффект при действии ионов меди и цинка на активность гликозидаз в экспериментах *in vitro* [Голованова, 2010] позволяет предположить прямое влияние этих металлов на активный центр фермента. Для выяснения механизмов действия отдельных веществ и их смесей в условиях антропогенного загрязнения необходимы дополнительные экспериментальные исследования.

Выводы

Сравнительный анализ активности гликозидаз слизистой оболочки и химуса кишечника лешей, отловленных в загрязненном Шекснинском и более чистом Моложском плесах Рыбинского водохранилища, показал отсутствие различий, лишь активность мальтазы у рыб загрязненного участка была ниже. В то же время у рыб Шекснинского плеса отмечено снижение значений К гидролиза углеводов, свидетельствующее об адаптивном увеличении фермент-субстратного сродства. Кривые температурной зависимости гликозидаз кишечника лещей из разных мест обитания достаточно близки (температурный оптимум ферментов слизистой равен 50 °C, химуса – 40 и 50 °C). Однако различия в зоне физиологических и постмаксимальных значений температуры, а также более высокие значения $E_{\text{акт}}$ гликозидаз в диапазоне температуры жизнедеятельности у леща Шекснинского плеса свидетельствуют о снижении эффективности гидролиза углеводных компонентов корма рыб, выловленных в загрязненном районе.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 08-05-00805. Авторы выражают искреннюю благодарность Г. М. Чуйко и сотрудникам лаборатории физиологии и токсикологии водных животных, а также коллективу экспедиционного судна «Академик Топчиев» за содействие при сборе материала.

Литература

Бузинова Н. С. Действие триэтилоловохлорида на пищеварительную систему карпов // Оловоорганические соединения и жизненные процессы гидробионтов / Ред. Н. С. Строганов. М.: МГУ, 1975. С. 209–215.

Герман А. В., Законнов В. В. Аккумуляция полихлорированных бифенилов в Шекснинском плесе Рыбинского водохранилища // Водные ресурсы. 2003. Т. 30, № 5. С. 571–575.

Герман А. В., Козловская В. И. Содержание полихлорированных бифенилов в леще Abramis brama Рыбинского водохранилища // Вопр. ихтиологии. 1999. Т. 39, № 1. С. 139–142.

Голованова И. Л. Влияние тяжелых металлов на физиолого-биохимический статус рыб и водных беспозвоночных // Биология внутр. вод. 2008. № 1. С. 99–108.

Голованова И. Л. Влияние биогенных металлов (Cu, Zn) на активность карбогидраз молоди рыб // Биология внутр. вод. 2010. № 1. С. 98–103.

Голованова И. Л., Кузьмина В. В., Чуйко Г. М. и др. Влияние полихлорированных бифенилов на активность протеиназ и карбогидраз в кишечнике молоди плотвы Rutilus rutilus (L.) // Биология внутр. вод. 2011. № 2. С. 97–103.

Голованова И. Л., Таликина М. Г. Влияние низких концентраций хлорофоса в период раннего индивидуального развития на пищеварительные карбогидразы сеголетков плотвы Rutilus rutilus // Вопр. ихтиологии. 2006. Т. 46, № 3. С. 412–416.

Голованова И. Л., Филиппов А. А., Столбунов И. А. Чувствительность карбогидраз плотвы различных экологических групп к действию меди и цинка *in vitro* // Токсикол. вестник. 2009. № 6. С. 17–20.

Козловская В. И., Герман А. В. Полихлорированные бифенилы и полициклические ароматические углеводороды в экосистеме Рыбинского водохранилища // Водные ресурсы. 1997. Т. 24, № 5. С. 563–569.

Кравецкий П. А., Волкова И. В., Шипулин С. В. Влияние нефтяной интоксикации на гидролитическую функцию пищеварительного тракта карповых рыб // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: Материалы 3-й междунар. конф. с элементами школы для молодых ученых, аспирантов и студентов (Петрозаводск, 22–26 июня 2010 г.). Петрозаводск, 2010. С. 83–84.

Кузьмина В. В. Активность α-амилазы в пищеварительном тракте и крови леща // Биология внутренних вод. Информ. бюлл. № 59. Л.: Наука, 1983. С. 58–60.

Кузьмина В. В., Скворцова Е. Г., Шалыгин М. В. Влияние температуры на активность протеиназ химуса и слизистой оболочки кишечника рыб разных экологических групп // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2008. Т. 44, № 5. С. 482–487.

Кузьмина В. В., Ушакова Н. В., Лупилов О. П., Шептицкий В. А. Влияние цинка и меди на активность протеиназ слизистой оболочки кишечника леща, подвергнутого разной антропогенной нагрузке // Токсикол. вестник. 2010. № 6. С.55–57.

Кузьмина В. В., Шишин М. М., Корюкаева Н. В. и др. Влияние меди и цинка на эффективность гидролиза белковых компонентов пищи у ряда видов пресноводных костистых рыб в условиях *in vitro* // Биология внутр. вод. 2005. № 4. С. 84–92.

Лапирова Т. Б., Заботкина Е. А. Сравнительный анализ показателей иммунофизиологического состояния леща Abramis brama (L.) из различных по степени загрязнения участков Рыбинского водохранилища // Биология внутр. вод. 2010. № 2. С. 148–155.

Уголев А. М., Кузьмина В. В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб.: Гидрометеоиздат, 1993. 238 с.

Уголев А. М., Иезуитова Н. Н., Масевич Ц. Г. и др. Исследование пищеварительного аппарата у человека. Обзор современных методов. Л.: Наука, 1969. 216 с.

Уголев А. М., Кузьмина В. В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб.: Гидрометеоиздат, 1993. 238 с.

Ушакова Н. В., Кузьмина В. В., Лупилов О. П., Шептицкий В. А. Влияние антропогенной нагрузки на активность протеиназ слизистой оболочки кишечника леща (Abramis brama) Рыбинского водохранилища // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера: Материалы XXVIII Междунар. конф. (Петрозаводск, 5–8 окт. 2009 г.). Петрозаводск, 2009. С. 578–582.

Филиппов А. А., Голованова И. Л. Раздельное и совместное влияние меди и цинка *in vitro* на активность карбогидраз кишечника пресноводных костистых рыб // Биология внутр. вод. 2010. № 1. С. 104-109.

Флеров Б. А., Томилина И. И., Кливленд Л. и др. Комплексная оценка состояния донных отложений Рыбинского водохранилища // Биология внутр. вод. 2000. № 2. С. 148–155.

Чуйко Г. М., Законнов В. В., Герман А. В. и др. Распределение полихлорированных бифенилов в экосистеме Рыбинского водохранилища при их локальном поступлении // Современное состояние водных биоресурсов: Материалы науч. конф. (Вла-

дивосток, 25–27 марта 2008 г.). Владивосток, 2008. С. 680–685.

Чуйко Г. М., Законнов В. В., Морозов А. А. и др. Пространственное распределение и качественный состав полихлорированных бифенилов (ПХБ) и хлорорганических пестицидов (ХОП) в донных отложениях и леще (Abramis brama L.) из Рыбинского водохранилища // Биология внутр. вод. 2010. № 2. С. 98–108.

Chuiko G. M., Tillitt D. E., Zajicek J. L. et al. Chemical contamination of the Rybinsk Reservoir, Northwest Russia: relationship between liver polychlorinated biphenyls (PCB) content and health indicators in bream (Abramis brama) // Chemosphere. 2007. Vol. 67, N 3. P. 527–536.

Filippov A. A., Golovanova I. L. The effects of organic toxicants on the intestinal glycosidase sensitivity of young roach to Cu и Zn // Inland Water Biology. 2012. Vol. 5, N 1. P. 140–146.

Golovanova I. L., Chuiko G. M., Pavlov D. F. Effects of cadmium, naphthalene and DDVP on gut carbohydrases activity in bream (Abramis brama L.) and mozambigue tilapia (Oreochromis mossambicus Peters) // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1994. Vol. 52, N 3. P. 338–345.

Kuz'mina V. V., Chuiko G. M., Pavlov D. F. Effects of DDVP, naphthalene and cadmium, on intestinal proteolytic activity in mozambigue tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) // Bull. Envir. Contam. Toxicol. 1999. Vol. 62, N 2. P. 193–198.

Sokal R. R., Rolf F. J. Biometry. The principals and practice of statistics in biological research. New York: W. H. Freeman and Co., 1995. 887 p.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Голованова Ирина Леонидовна

главный научный сотрудник, д. б. н. ИБВВ им. И. Д. Папанина РАН Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, Россия, 152742 эл. почта: golovan@ibiw.yaroslavl.ru тел.: (8485) 4724484

Филиппов Андрей Андреевич

младший научный сотрудник ИБВВ им. И. Д. Папанина РАН Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, Россия, 152742 эл. почта: andron@ibiw.yaroslavl.ru тел.: (8485) 4724526

Golovanova, Irina

Papanin Institute of Inland Waters Biology, Russian Academy of Sciences 152742 Borok, Yaroslavl Region, Russia e-mail: golovan@ibiw.yaroslavl.ru tel.: (8485) 4724484

Filippov, Andrey

Papanin Institute of Inland Waters Biology, Russian Academy of Sciences 152742 Borok, Yaroslavl Region, Russia e-mail: andron@ibiw.yaroslavl.ru tel.: (8485) 4724526 УДК 597: 574.2.04

ОКОНЧАТЕЛЬНО ИЗБИРАЕМЫЕ И ВЕРХНИЕ ЛЕТАЛЬНЫЕ ТЕМПЕРАТУРЫ МОЛОДИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ПРЕСНОВОДНЫХ РЫБ

В. К. Голованов, А. К. Смирнов, Д. С. Капшай

Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН

В экспериментальных условиях установлены значения окончательно избираемой и верхней летальной температуры у молоди карпа, плотвы, окуня и щуки в летний период. Показатели хронического летального максимума и летальной температуры выше показателей критического термического максимума у всех изученных видов. Наибольшая термоустойчивость и самые высокие значения окончательно избираемой температуры выявлены у теплолюбивого карпа, наименьшие – у плотвы и окуня. Полученные данные позволяют прогнозировать поведение и распределение рыб различных экологических групп в пресноводных водоемах.

K л ю ч е в ы е $\,$ с л о в а : рыбы, термоустойчивость, окончательно избираемая температура, критический термический максимум, летальная температура, хронический летальный максимум.

V. K. Golovanov, A. K. Smirnov, D. S. Kapshaj. FINAL THERMOPREFERENDUM AND UPPER LETHAL TEMPERATURE IN JUVENILES OF SOME FRESHWATER FISH SPECIES

The values of final thermopreferendum and upper lethal temperature in juvenile carp, roach, perch and pike during the summer period were determined under experimental conditions. The values of chronic lethal maximum and lethal temperature are higher than the critical thermal maximum in all studied species. Maximal temperature resistance and the highest values of final thermopreferendum were found in the thermophilic carp, the lowest – in roach and perch. The results allow to predict the behaviour and distribution of fish of different ecological groups in freshwater bodies.

Key words: fish, temperature resistance, final thermopreferendum, critical thermal maximum, lethal temperature, chronic lethal maximum.

Введение

Температура окружающей среды – важный абиотический фактор, в наибольшей степени определяющий эффективность питания, роста и развития рыб, обитающих в пресных водах. Выступая в качестве лимитирующего фактора, она определяет географическое ме-

стоположение вида и его отдельных популяций [Одум, 1975]. Адаптации к температуре обеспечивают постоянное взаимодействие организма и среды. Как следствие, в процессе онтогенеза, а также при прохождении сезонных и жизненных циклов рыбы вынуждены приспосабливаться к колебаниям температуры и использовать различные формы темпе-

ратурных адаптаций: температурную акклимацию, терморегуляционное поведение, адаптацию к предельно высоким и низким температурам, а также «зимнюю спячку» [Голованов и др., 1997; Озернюк, 2000].

При оценке эффективности жизнедеятельности рыб наряду с физиологическими и биохимическими характеристиками применяют такие показатели, как температурная зона оптимального функционирования (оптимум) и предельная (верхняя и нижняя летальная) температура, ограничивающая диапазон термоустойчивости рыб. Температурный оптимум жизнедеятельности характеризуют, используя значения окончательно избираемой температуры (ОИТ), границы существования вида - значения летальной температуры (ЛТ) [Шмидт-Ниельсен, 1982; Алабастер, Ллойд, 1984; Голованов и др., 1997; Озернюк, 2000]. Существуют разные методы для оценки данных показателей. Метод термопреферендума наиболее часто применяют для определения температурного оптимума. Методы критического термического максимума (КТМ) при средней и высокой скорости нагрева воды (от 4 до 60 °С/ч) и хронического летального максимума (ХЛМ) - при медленной скорости нагрева ≤ 1 °С/ч используют для выявления пессимума жизнедеятельности [Голованов, Смирнов, 2007]. Несмотря на большое количество работ по ОИТ, КТМ и ХЛМ [Hokanson, 1977; Cherry, Cairns, 1982; Beitinger et al., 2000; Golovanov, 2006], сравнительный анализ результатов затруднен, поскольку они получены в различных экспериментальных условиях. В то же время для корректного сравнения температурных реакций рыб разных экологических групп в гетеротермальных условиях необходимы данные, полученные в идентичных методических условиях с vчетом возраста рыб и сезона года.

В связи с этим цель работы – сравнительный анализ и определение окончательно избираемой, а также верхней сублетальной и летальной температуры у молоди карпа *Cyprinus carpio* (L.), плотвы *Rutilus rutilus* (L.), речного окуня *Perca fluviatilis* L. и щуки *Esox lucius* L. в летний сезон при температуре акклимации 18 ± 2 °C.

Материал и методы

Работа выполнена в 2009–2010 гг. на молоди рыб разных экологических групп: карпе, плотве, окуне и щуке. Рыбы отловлены в прибрежье Рыбинского водохранилища, карп выращен в прудах стационара полевых и экспериментальных работ ИБВВ РАН. Длина и масса

карпа составляла: 63-80 мм, 8-13 г, плотвы -65-75 мм, 4-7,5 г, окуня -46-49 мм, 1,1-1,6 г, щуки -110-153 мм, 10-15 г. Всего исследовано 108 особей (из них 36, 48 и 24 экз. в опытах по определению ОИТ, КТМ и ХЛМ соответственно). Температура предварительной акклимации всех рыб составляла 18 ± 2 °C, время акклимации -7 сут при естественном фотопериоде.

Определение окончательно избираемой температуры (метод термопреферендума) проводили в экспериментальных термоградиентных условиях, в которых группе особей был предоставлен свободный выбор температуры. Экспериментальная установка по изучению избираемых температур представляет собой ло-ИЗ прозрачного стекла размерами 320×23×17 см (рис. 1). Горизонтальный градиент температуры создавался посредством нагрева и охлаждения воды на противоположных концах установки. Лоток делили на 12 камер с помощью неполных перегородок, в каждой из которых устанавливалось по 2 распылителя с подачей воздуха от компрессора для предотвращения вертикального градиента температуры. Градиент температуры создавался в диапазоне от 14 до 32 °C. Посадка рыб производилась в отсек с температурой, равной температуре акклимации. Распределение рыб, а также избираемая ими температура на начальном этапе выбора фиксировались 8-10 раз в светлое время суток. В качестве зоны окончательно избираемой температуры выбирался временной интервал, в котором в течение не менее 3 суток не было существенных колебаний в значениях избираемой температуры (среднесуточные значения статистически недостоверны). Корм (живой зоопланктон и сухой корм) вносили 1 раз в сутки в отсеки, где находились рыбы, для щук использовали также рыбный фарш и сеголетков окуня.

При определении КТМ и ЛТ группу рыб (по 6 экз. в каждой, две повторности) помещали в экспериментальный аквариум объемом 60 л, оборудованный системой нагрева и аэрации (рис. 2, а). Температуру воды в опытном аквариуме повышали со скоростью 8-10 °C/ч до нарушения локомоторной функции рыб – переворота на бок или кверху брюшком, сублетальное значение температуры фиксировали как КТМ [Becker, Genoway, 1979]. В этом случае при прекращении нагрева и переносе рыб в воду с температурой на 3-4 °C ниже они сохраняли жизнеспособность. Продолжая нагрев до момента прекращения движения жаберных крышек, фиксировали значение ЛТ по этому показателю.

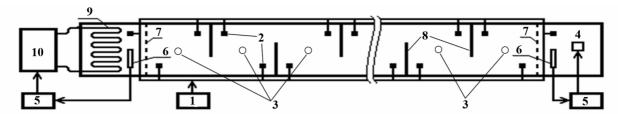


Рис. 1. Схема экспериментальной 12-камерной установки для определения избираемой и окончательно избираемой температуры у молоди рыб:

1 – воздушный компрессор, 2 – распылитель, 3 – датчик электронного термометра, 4 – нагреватель, 5 – терморегулятор, 6 – датчик электронного термометра нагрева/охлаждения, 7 – сетка-ограждение, 8 – неполные перегородки между отсеками, 9 – охлаждающий контур, 10 – компрессор холодильника

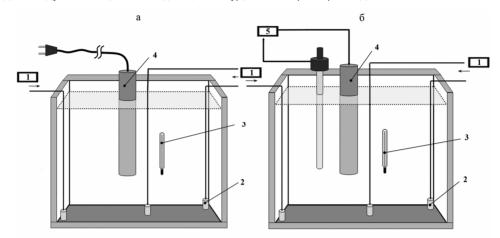


Рис. 2. Схема экспериментальных установок для определения критического термического максимума и летальной температуры (а) и хронического летального максимума (б) у молоди рыб:

1 - воздушный компрессор, 2 - распылитель, 3 - термометр, 4 - нагреватель, 5 - терморегулятор

Для определения ХЛМ группу рыб (по 6 экз. в каждой) помещали в экспериментальный аквариум объемом 60 л, оборудованный системой нагрева и аэрации (рис. 2, б). Температуру воды в опытном аквариуме повышали со скоростью 0.04 °C/ч (1 °C/сут) до момента гибели рыб, эту температуру фиксировали как ХЛМ. На каждые 4-е сутки меняли половину объема воды в аквариуме, сохраняя при этом в аквариуме то значение температуры, которое наблюдалось к моменту добавления воды. Продолжительность эксперимента при медленной скорости нагрева воды составляла 16-23 сут, при скорости нагрева 8-10 °C - 1,5-1,8 ч. Все опыты проводили в условиях естественного фотопериода. Рыб кормили 1 раз в сутки живым зоопланктоном, рыбным фаршем, сухим комбикормом (а щук - и сеголетками окуня) в объеме 5-10 % от общей массы тела.

Данные обработаны статистически с помощью пакета прикладных программ Statgraphics Plus 5.1 и Excel 2003. Результаты представлены в виде средних и их ошибок ($M \pm m$). Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA, LSD-тест) при p = 0.05 [Sokal, Rolf, 1995].

Результаты и обсуждение

При посадке группы особей в термоградиентные условия рыбы, как правило, не остаются в зоне температуры предварительной акклимации, а начинают движение в сторону более высокой или низкой температуры до тех пор, пока не сосредоточиваются в отсеках с температурой, соответствующей оптимальным значениям (зона ОИТ). Характерным моментом является высокая двигательная и поисковая активность в первые часы опыта: у плотвы и щуки в диапазоне значений температуры, различающихся на 1-2 °C, у карпа - на 8-9 °C. Значения ОИТ выявлены у карпа на 3-6-е сутки опыта, у плотвы – на 3-7-е, у окуня – на 6-10-е, у щуки - на 4-10-е. Максимальный уровень ОИТ отмечен у карпа, несколько более низкий у окуня и щуки, минимальный – у плотвы (табл.). Ранее было установлено, что значения ОИТ у молоди серебряного карася Carassius auratus (L.) и синца Abramis ballerus (L.) в летний сезон составляли 27-29 °C, у молоди леща *Abramis* (L.) и радужной форели (Oncorhynchus) mykiss Walbaum - 27 и 13-17 °C соответственно [Лапкин и др., 1990; Голованов, Валтонен, 2000; Смирнов, Голованов, 2004, 2005; Голованов, 2009]. Как и ожидалось, самый высокий уровень ОИТ характерен для сеголетков карпа, наиболее теплолюбивого и термоустойчивого из исследованных видов. Минимальный уровень отмечен для молоди радужной форели, представителя холодолюбивых видов рыб [Голованов, Валтонен, 2000]. В более ранних экспериментах уровень ОИТ у сеголетков плотвы был несколько выше 26 °С [Голованов и др., 1997; Лапкин и др., 1981], что может быть обусловлено возрастными различиями или разным физиологическим состоянием рыб.

Температурные характеристики молоди некоторых видов рыб

Dian	ОИТ. °С	хлм. ∘с	KTM. °C	ЛТ. °С
Вид	ONI, C	ATIVI, C	KTIVI, C	JII, C
Карп	$30,9 \pm 0,5^{a}$	$41,3 \pm 0,1^{a}$	$35,6 \pm 0,1^{a}$	$36,5 \pm 0,2^{a}$
Плотва	$24,0 \pm 0,3^{6}$	$34,4 \pm 0,3^6$	$32,0 \pm 0,3^6$	$32,6 \pm 0,3^6$
Окунь	26,4 ± 0,3 ⁸	$33,5 \pm 0,5^{6}$	$32,0\pm0,1^{6}$	$33,2 \pm 0,2^6$
Щука	$24,3 \pm 0,3^{6}$	$34,0 \pm 0,4^6$	33,6 ± 0,1 ⁸	35,2 ± 0,2 ⁸

Примечание. Приведены средние значения показателей и их ошибки (M \pm m); разные надстрочные индексы указывают на статистически достоверные различия между показателями в каждом столбце (ANOVA, LSD-test), P < 0,05.

Необходимо отметить высокую степень корреляции уровня ОИТ и значений температуры, оптимальных для роста рыб [Hokanson, 1977; Beitinger, Fitzpatrick, 1979; Jobling, 1981; Голованов, 2009]. Коэффициент корреляции между этими показателями, полученный на основании данных по 49 видам рыб, составил 0,937 [Jobling, 1981]. Существование такой зависимости позволяет использовать значение ОИТ для оценки температурного оптимума жизнедеятельности рыб. Следует отметить, что наиболее высокие значения оптимальной температуры роста и питания отмечены у молоди пресноводных видов рыб, у более взрослых неполовозрелых и половозрелых особей эти значения несколько ниже [Голованов и др., 1997].

Значения летальной температуры, как правило, на 6–10 °С выше значений ОИТ (табл.). Наиболее высокие значения летальной температуры получены при медленной (менее 1 °С/ч) скорости нагрева воды: значения ХЛМ у карпа составили 41,3 °С, у других исследованных видов – 33,5–34,4 °С. При скорости нагрева воды 8–10 °С/ч уровень КТМ у исследованных видов рыб варьирует от 32,0 до 35,6 °С: максимальные значения отмечены у карпа, минимальные – у плотвы и окуня. Полученные данные хорошо согласуются с результатами более ранней работы по определению уровня КТМ у тех же видов рыб [Смирнов, Голованов, 2005].

Значения ЛТ превышают КТМ на 0,6-1,6 °С, в большей мере у щуки, чем у плотвы. Более высокие значения ЛТ, определенные методом ХЛМ, связаны с процессом постепенной температурной акклимации рыб в течение эксперимента. Повышенная скорость нагрева в течение 1,5-1,8 ч не позволяет рыбам в достаточной мере адаптироваться к меняющимся условиям среды, поэтому значения КТМ и ЛТ у одного и того же вида рыб ниже, чем ХЛМ. У серебряного карася, который наряду с карпом является представителем наиболее теплолюбивых видов, при акклимации к температуре 21 °C и скорости нагрева 10 °C/ч значение КТМ равнялось 36 °C, а ЛТ - 37 °C [Смирнов, Голованов, 2004, 20051. Данные по молоди леша для аналогичной скорости нагрева воды в летний сезон отсутствуют, однако показатели КТМ у сеголетков леща при акклимации к температуре воды 12 °C в осенний сезон и скорости нагрева 10 °C/ч составили 27,7 °C, а у леща при скорости нагрева 5 °С/ч в летний сезон -34,3 °C [Лапкин и др., 1990; Смирнов, Голованов, 2005]. Минимальные показатели КТМ и ЛТ - 30.5 и 31.0 °C характерны для холодолюбивой радужной форели [Голованов, Валтонен, 2000].

Адаптационные возможности рыб, обитающих в водоемах умеренных широт России, ограничены диапазоном температуры от 0 до 43,5 °C. При этом границы верхней летальной температуры расположены, как правило, выше на 5–15 °C температурной зоны эколого-физиологического оптимума. У молоди рыб (сеголетки, годовики) значения оптимальной и летальной температуры выше, чем у половозрелых особей. Таким образом, возможный диапазон обитания у молоди рыб достигает максимальной ширины, сужаясь в последующие периоды развития [Голованов и др., 1997; Голованов, 2009].

Определение оптимальных и пессимальных значений температуры у разных видов позволяет прогнозировать поведение и распределение рыб в естественных водоемах как в норме, так и в случае аномально высоких значений температуры, особенно в зонах сброса подогретых вод ГРЭС, АЭС и крупных промышленных предприятий. Эти показатели могут применяться для разработки нормативов допустимого температурного воздействия на молодь рыб, при акклиматизации различных видов, а также при прогнозировании поведения и распределения молоди рыб в условиях аномально высокой температуры в летний период года.

Выводы

В экспериментальных условиях термоградиента показано, что уровень ОИТ у молоди рыб, акклимированных в летний период к температуре 20 °C, варьирует от 30,9 °C у карпа до 24 °C у плотвы и щуки, значения этого показателя у окуня составляют 26,4 °C. Наибольшие значения КТМ и ЛТ у исследованных видов при летней температуре акклимации показали особи карпа – 35,6 и 36,5 °C. Значения КТМ у плотвы и окуня оказались идентичными (32,0 °C), значения ЛТ (32,6 и 33,2 °C) также достоверно не различались. Наиболее высокие значения ЛТ у исследованных видов рыб отмечены при низкой (1 °C/ч) скорости нагрева: значения ХЛМ составили 41,3 °C у карпа и 33,5-34,4 °C у остальных видов. Выявленные видовые различия показателей ОИТ и ВЛТ обусловлены температурными предпочтениями изученных видов рыб и позволяют прогнозировать их распределение и поведение в естественных условиях и зонах термального загрязнения.

Исследование выполнено при поддержке Программы фундаментальных исследований Отделения биологических наук РАН «Динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий» и Программы Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-719. 2012.4.

Литература

Алабастер Дж., Ллойд Р. Критерии качества воды для пресноводных рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. 384 с.

Голованов В. К. Температурные критерии для пресноводных рыб Северо-Запада России // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера: Материалы XXVIII Междунар. конф. (Петрозаводск, 5–8 окт. 2009 г.). Петрозаводск: Карельский НЦ РАН, 2009. С. 148–153.

Голованов В. К., Валтонен Т. Изменчивость термоадаптационных свойств радужной форели *Oncorhynchus mykiss* Walbaum в онтогенезе // Биология внутр. вод. 2000. № 2. С. 106–115.

Голованов В. К., Смирнов В. К. Влияние скорости нагрева на термоустойчивость карпа Cyprinus carpio в различные сезоны года // Вопр. ихтиол. 2007. Т. 47, № 4. С. 555–561.

Голованов В. К., Свирский А. М., Извеков Е. И. Температурные требования рыб Рыбинского водохранилища и их реализация в естественных условиях // Современное состояние рыбных запасов Ры-

бинского водохранилища. Ярославль: ЯрГТУ, 1997. С. 92–123.

Лапкин В. В., Свирский А. М., Голованов В. К. Возрастная динамика избираемых и летальных температур рыб // Зоол. журн. 1981. Т. 40, № 12. С. 1792–1801.

Лапкин В. В., Голованов В. К., Свирский А. М., Соколов В. А. Термоадаптационные характеристики леща Abramis brama (L.) Рыбинского водохранилища // Структура локальной популяции у пресноводных рыб. Рыбинск, 1990. С. 37–85.

Одум Ю. Основы экологии. М.: Мир, 1975. 742 с. Озернюк Н. Д. Температурные адаптации. М.: МГУ, 2000. 205 с.

Смирнов А. К., Голованов В. К. Влияние различных факторов на термоустойчивость серебряного карася *Carassius auratus* L. // Биология внутр. вод. 2004. № 3. С. 103–109.

Смирнов А. К., Голованов В. К. Сезонная динамика верхних летальных температур у молоди карповых и окуневых видов рыб // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера: Материалы IV (XXVII) Междунар. конф. Ч. 2. (Вологда, 5–10 дек. 2005 г.). Вологда, 2005. С. 145–148.

Шмидт-Ниельсен К. Физиология животных. Приспособление и среда. Кн. 1. М.: Мир, 1982. 416 с.

Becker C. D., Genoway R. G. Evaluation of the critical thermal maximum for determining thermal tolerance of freshwater fish // Environ. Biol. Fish. 1979. Vol. 4, N 3. P. 245–256.

Beitinger T. L., Fitzpatrick L. C. Physiological and ecological correlates of preferred temperature in fish // Thermoregulation in ectotherms. Symp. Richmond. 1978. Amer. Zool. 1979. Vol. 19, N 1. P. 319–329.

Beitinger T. L., Bennet W. A., McCauley R. W. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature // Environ. Biol. Fish. 2000. Vol. 58, N 3. P. 237–275.

Cherry D. S., Cairns J. Jr. Biological monitoring. Part V. Preference and avoidance studies // Water Res. 1982. Vol. 16, N 3. P. 263–301.

Golovanov V. K. The ecological and evolutionary aspects of thermoregulation behavior of fish // J. lchthyology. 2006. Vol. 46, Suppl. 2. P. S180–S187.

Hokanson K. E. F. Temperature requirements of some percids and adaptations to the seasonal temperature cycle // J. Fish. Res. Bd. Can. 1977. Vol. 34, N 10. P. 1524–1550.

Jobling M. Temperature tolerance and the final preferendum – rapid methods for the assessment of optimum growth temperature // J. Fish. Biol. 1981. Vol. 19, N 4. P. 439–455.

Sokal R. R., Rolf F. J. Biometry. The principals and practice of statistics in biological research. N. Y.: W. H. Freeman and Co., 1995. 887 p.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Голованов Владимир Константинович

ведущий научный сотрудник ИБВВ им. И. Д. Папанина РАН Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл., Россия, 152742 эл. почта: vkgolovan@mail.ru тел.: (8485) 4724484

Смирнов Алексей Константинович

старший научный сотрудник ИБВВ им. И. Д. Папанина РАН Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл., Россия, 152742 эл. почта: smirnov_alkonst@mail.ru тел.: (8485) 4724893

Капшай Дмитрий Сергеевич

аспирант ИБВВ им. И. Д. Папанина РАН Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл., Россия, 152742 эл. почта: kapshay@ ibiw.yaroslavl.ru тел.: (8485) 4724588

Golovanov, Vladimir

Papanin Institute of Inland Waters Biology, Russian Academy of Sciences 152742 Borok, Yaroslavl Region, Russia e-mail: vkgolovan@mail.ru tel.: (8485) 4724484

Smirnov, Aleksey

Papanin Institute of Inland Waters Biology, Russian Academy of Sciences 152742 Borok, Yaroslavl Region, Russia e-mail: smirnov_alkonst@mail.ru tel.: (8485) 4724893

Kapshaj, Dmitry

Papanin Institute of Inland Waters Biology, Russian Academy of Sciences 152742 Borok, Yaroslavl Region, Russia e-mail: kapshay@ ibiw.yaroslavl.ru tel.: (8485) 4724588 УДК 591.1: 574.2

ВЛИЯНИЕ СЫРОЙ НЕФТИ НА ОРГАНИЗМ ГРЫЗУНОВ В ПОДОСТРОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

A. B. Елифанов¹, C. H. Гашев¹, T. И. Моисеенко²

Показано, что сырая нефть вызывает неспецифическую реакцию организма мелких млекопитающих на загрязнение, являющееся стрессовым фактором для животных. Отмечается повышение интенсивности метаболизма, напряженности энергетического обмена, нарушения процессов кроветворения, усиление миграции лимфоцитов в кровоток, увеличение доли пикноморфных клеток в различных тканях, свидетельствующие о прямом токсическом действии нефти и общем нарастании стрессовой ситуации. Установлено, что адаптация развивается специфично у разных видов млекопитающих и у разных поло-возрастных групп одного вида, в ней активное участие принимает гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система.

Ключевые слова: загрязнение, сырая нефть, млекопитающие, грызуны, токсикология, патофизиология.

A. V. Elifanov, S. N. Gashev, T. I. Moiseenko. INFLUENCE OF CRUDE OIL ON THE ORGANISM OF RODENTS IN A SUBACUTE EXPERIMENT

It is shown that crude oil induces a nonspecific response of the organism of small mammals to the pollution, which is a stress-factor for the animals. Metabolism, including the energy metabolism, intensifies, hematopoiesis processes are affected, lymphocytes migration to the bloodstream increases, and the proportion of pycnomorphic cells in different tissues grows, indicating a direct toxic effect of oil, and overall escalation of the stressful situation. Adaptation was found to have specific features depending on the species, and on sex and age within a species. The hypothalamic-pituitary-adrenal system plays an important part in the process of adaptation.

Key words: pollution, crude oil, mammals, rodents, toxicology, pathophysiology.

Введение

Увеличивающаяся в мире потребность в углеводородном сырье приводит к экстенсивному увеличению нефтедобычи в регионах и странах. Западная Сибирь прочно удерживает первенство среди российских регионов по добыче нефти и газа. В этом регионе сосредоточено более 6 % мировой добычи нефти. Намечено резкое расширение работ по разведке нефти и газа на шельфе дальневосточной и Арктической части России. Места разведки, добычи и переработки, газопроводы и нефтепроводы часто являются источниками нефтяного загрязнения наземных и водных экосистем.

¹ Тюменский государственный университет

² Институт геохимии и аналитической химии РАН им. В. И. Вернадского

Достаточно много обзорных работ посвящено токсичному влиянию сырой нефти на водные организмы, особенно морские [Ottway, 1971; Черкашин, 2005 и др.]. Значительно меньше известно о влиянии разливов нефти на сухопутных млекопитающих, чем на птиц и водные организмы. О физиологическом действии различных компонентов нефти и нефтепродуктов в лабораторных условиях на организм мелких млекопитающих имеются сообщения уже с конца XIX в. [Кулябко, Овсянникова, 1899]. К настоящему времени известно, что парафиновые углеводороды вызывают наркоз и судороги; ароматические и нафтеновые - действуют на кровь и кроветворные органы. При хроническом действии летучих фракций бессернистой нефти отмечаются функциональные изменения центральной нервной системы, низкое кровяное давление, замедление пульса, а также признаки поражения печени, наличие холестерина в крови, повышенная склонность к заболеваниям. При действии многосернистой нефти отмечается некоторая заторможенность, ослабляется обоняние, нарушается функция печени, щитовидной железы, поражаются слизистые оболочки, появляется хронический конъюнктивит, нарушается нормальный ход эмбриогенеза [Панов и др., 1986; Черкашин, 2005; Draft Toxicological Intake Values..., 2010 и др.]. Достаточно хорошо изучены токсичные и канцерогенные свойства нефтяных углеводородов [Coomes, Hazer, 1984; Holland, Frome, 1984; Lewis et al., 1984; Rahimtula et al., 1984; Канцерогенные вещества, 1987; ССМЕ, 2008 и др.]. Имеются также сведения о мутагенности некоторых из них [Conaway et al., 1984].

Отдельные исследования проведены по бензо(а)пирену [Rosmarie, 1994]. Известны работы о влиянии тяжелых фракций нефти на репродуктивную систему млекопитающих [Nishimoto et al., 2008, 2009]. Пристальному изучению ранее подвергались и нафтеновые кислоты, входящие в состав нефтей [Абдуллаев, Бейбутова, 1965; Караев, 1965; Сабирова, Маньковская, 1966]. В литературе можно найти и методические работы, посвященные интерпретации загрязнения нефтяными углеводородами тканей диких животных [Hall Russel, Coon Nancy, 1988]. Сводной публикацией о токсичности отдельных компонентов сырых нефтей на млекопитающих, а также руководством к подобным исследованиям является «Guidance on the application of Globally Harmonized System (GHS) criteria to petroleum substances» [2010]. Комплексные исследования токсического влияния сырых нефтей разного состава на кроликов и крыс проведены Американским нефтяным институтом [Test plan crude oil category, 2003]. Интересны и более ранние экспериментальные работы по изучению биохимических особенностей грызунов при воздействии сырой нефти [Ayalogu et al., 2001]. Несомненный интерес представляет одна из немногих в России работа В. М. Шапошникова и др. [1980], в которой приводятся результаты лабораторных экспериментов над мышами, подвергающимися действию сырой нефти.

Однако очень мало работ посвящено изучению вопроса комплексного действия сырой нефти в целом на организм животного, притом что в реальных условиях мы чаще всего имеем дело именно с таким интегрированным действием. В этой связи является важным понимание механизмов развития патофизиологических процессов у млекопитающих, развивающихся под влиянием сырой нефти.

Мелкие млекопитающие являются модельной группой организмов в экологических исследованиях как важные элементы водных и околоводных экосистем, удовлетворяющие требованиям, предъявляемым к видам-индикаторам (высокая численность, быстрая смена поколений и т. д.). В этом плане использование мелких млекопитающих имеет большое значение в биотестировании для экспериментального выявления ответных реакций организма на отдельные поллютанты (например, сырую нефть) при определении качества среды в экологическом мониторинге [Test plan crude oil category, 2010; Моисеенко и др., 2010 и др.].

Целью нашей работы являлось определение эффектов сырой нефти на морфофизиологические, гистологические и цитологические показатели грызунов, получавших ее с пищей и водой в условиях лабораторного эксперимента.

Материал и методы

Исследование сырой нефти на мелких млекопитающих в лабораторных условиях (подострый эксперимент) проведено в соответствии с «Международными рекомендациями...» [1993].

В качестве модельных животных использовались беспородные белые мыши (*Mus musculus* var alb.) в возрасте 2,5 мес. со средней массой тела 20 г и крысы (*Rattus norvegicus* var alb.) в возрасте 3 мес. со средней массой тела 200 г.

В диете белых мышей в течение двух месяцев использовали нефть Южно-Балыкского месторождения (среднелегкая, вязкая, сернистая, смоло-асфальтеновая). В диету опытных белых крыс входила сырая нефть Северо-Хохряковского месторождения (легкая, маловяз-

кая, малосернистая, парафиновая, с небольшим содержанием ароматических и наиболее токсичных моноциклических углеводородов). Оба месторождения нефти расположены в среднетаежной зоне Западной Сибири на территории Ханты-Мансийского автономного округа Тюменской области.

Контрольная группа животных (16 беспородных белых мышей и 10 беспородных белых крыс) получала те же корма, в тех же количествах и пропорциях, но без добавления нефти.

В ходе эксперимента в пищевой рацион подопытных групп животных (16 белых мышей и 18 белых крыс) систематически – через двое суток на третьи – добавлялась сырая нефть [Гашев и др., 1994]. Корм перемешивался нефтью в весовом соотношении 1:0,01 – концентрация нефти около 1 %, в питьевой воде создавалась концентрация нефти 0,001 %. Таким образом, с учетом суточного рациона мыши получали сырую нефть в дозировке 3,5 г/кг/день, крысы – 5,85 г/кг/день.

Животные содержались в терморегулируемых металлических шкафах (объемом по 1,5 м³) с подсветкой и пассивной вентиляцией при нормальных условиях в количестве, указанном выше для контрольных и экспериментальных групп разных видов, при равном соотношении полов в каждой группе. Эксперимент продолжался 60 дней. В ходе эксперимента отмечались выживаемость животных (доля оставшихся в живых от исходного числа), размножение и особенности поведения в обеих группах, в том числе поедаемость корма. Размножающиеся самки с приплодом оставлялись в общем гнезде. По завершении опытов все выжившие животные были забиты и подвергнуты детальному морфофизиологическому, гистологическому и цитогенетическому обследованиям по принятым методикам [Шварц и др., 1968; Кононский, 1976; Дарлингтон, Ла Кур, 1980 и др.].

В соответствии с методом морфофизиологических индикаторов использованы как показатель относительной массы тела (отношение массы тела к кубу его длины), так и индексы основных органов грызунов (сердце, печень, почки, надпочечники, селезенка). Из гематологических показателей измерялось количество гемоглобина в крови грызунов. Гистологические исследования проведены согласно общепринятым методам [Bucke, 1994]. Изучение цитогенетических особенностей проводили с помощью пикнотического теста: учитывали все типы дегенерации ядра, связанные с отставанием хроматиновой сети или отдельных ее составляющих от ядерной оболочки и слипанием ее в гомогенную массу.

Результаты и обсуждение

В контрольной группе мышей, содержащихся смешанными группами, отмечены 3 приплода новорожденных (по 3, 4 и 7 зверьков в каждой). Среди забитых зверьков в конце эксперимента 50 % контрольных самок были беременны (общее количество эмбрионов 17). В группе мышей, получавшей в пищевом рационе нефть, репродуктивные процессы полностью отсутствовали. Гибель животных в контрольной группе (без учета родившихся в ходе эксперимента) составила всего 12,5, в подопытной – 37,5 %.

Среди белых крыс размножение не отмечалось ни в опытном, ни в контрольном варианте. Гибель животных к концу эксперимента у опытных белых крыс составила 22,2 %, а у контрольных отсутствовала.

Поведение и динамика смертности. Динамика смертности у обоих видов грызунов, получавших в рационе сырую нефть, свидетельствует о прямой зависимости смертности от экспозиции при нефтяной диете, при этом зависимость носит нелинейный характер: при данных концентрациях нефти гибель не отмечается в течение первого месяца, но к концу второго резко нарастает. После месячного введения сырой нефти белым мышам отмечаются и достоверные различия с контролем по ряду биохимических показателей [Ayalogu et al., 2001].

При этом нужно отметить, что мыши демонстрируют более высокую смертность, даже получая с пищей нефть с меньшим содержанием токсичных веществ, по сравнению с крысами.

Отмечены и существенные отличия в поведении животных, получающих нефть, по сравнению с контрольными (в условиях «открытого поля»): они характеризовались меньшей подвижностью, вялостью; как правило, слабее контактировали с другими особями, не делали попыток скрыться от наблюдателя. Если в контроле зверьки при воздействии низких температур собирались в одно гнездо, то экспериментальные животные такой реакции не проявляли – находились по одной, реже по две особи в гнезде.

При внешнем осмотре экспериментальных зверьков были отмечены существенные морфологические отличия их от зверьков контрольной группы. Шерстный покров стал более редким: сквозь него просматривается кожа, остевые волосы частично слипались, общий тон окраски стал более темным, несмотря на то что животные постоянно чистили шерсть. У половины зверьков по всему телу образова-

лись опухоли и язвы диаметром до 10 мм, у 30 % зверьков отмечен некроз тканей кончика хвоста.

Индексы внутренних органов и гистопатология. При сравнении морфофизиологических показателей белых мышей, получавших в пищевом рационе сырую нефть (время экспозиции 2 мес.), и контрольных отмечены достоверные различия по большинству рассматриваемых признаков как у самцов, так и у самок (табл. 1).

Имеет место увеличение индексов сердца, печени, почки, селезенки, тенденция к увеличению индекса надпочечника, достоверное снижение уровня гемоглобина в крови у экспериментальных животных по сравнению с контрольными. Отдельные животные страдали от изъязвления кишечного эпителия. Все это, учитывая различия в задаваемых уровнях загрязнения пищи нефтью и демографической характеристике экспериментальной группы животных, вполне согласуется с данными, полученными в ходе лабораторных экспериментов, других авторов [Шапошников и др., 1980]. Необходимо отметить, что самки продемонстрировали большую чувствительность к нефти, чем самцы.

Печень. Гистологическое исследование печени белых мышей показало, что у 20 % подопытных животных наблюдаются цирротические изменения в тканях печени, в некоторых случаях на печени отмечены язвы и участки с нетипичной окраской зеленого цвета.

При микроскопическом изучении были обнаружены изменения как в объеме ядер, так и в размерах гепатоцитов: средний объем ядер в опыте составил 139 915 \pm 28 007,1 мкм³, или 156 % от контроля (89 475 \pm 26 053,7 мкм³), среднее количество гепатоцитов на тестовую площадку – 56 % от контроля; все различия достоверны при P < 0,01. Сходные результаты были получены и для белых крыс после двухмесячной диеты с добавлением сырой нефти:

средний объем ядер гепатоцитов - 107 479 ± $586,5 \text{ мкм}^3$, или 158 % от контроля ($67.758,9 \pm$ 514,8 мкм³), а среднее количество клеток на тестовую площадку - 59 % от контрольного уровня. Наблюдаемое явление при действии различных ядов и компонентов нефти отмечается и другими авторами [Вермель, 1935; Хесин, 1967; Ayalogu et al., 2001 и др.] и свидетельствует об увеличении функциональной активности гепатоцитов. Об этом же может говорить и увеличение индекса печени в опыте, так как индукция микросомальных монооксидаз часто сопровождается образованием новых гладких мембран эндоплазматического рети-И увеличением массы кулума [Meldolesi, 1967; Schulte-Hermann et al., 1968; Böhn, Moser, 19761.

Почки. Кормление белых крыс пищей, слабо загрязненной нефтью, вызывало увеличение массы почки в 1,8 раза, при этом увеличивались площади сечений проксимальных (в 1,67 раза) и дистальных (в 1,7 раза) канальцев нефрона. Просвет почечного тельца у опытных зверьков становился мало различимым из-за переполнения петель капилляров форменными элементами крови. В прямых отделах нефрона наблюдалось набухание клеток. Просвет канальцев был плохо виден из-за размытой щеточной каемки. Ядра клеток увеличивались: у контрольных животных их объем составлял $635503 \pm 1,2$, у подопытных – 741 231 \pm 2,1 мкм 3 . Все это может свидетельствовать о неспецифической реакции органа на увеличение функциональной нагрузки на него при отсутствии признаков острого токсического воздействия.

Надпочечники. Отмечено достоверное увеличение массы надпочечников экспериментальных белых крыс по сравнению с контролем (16,7 \pm 0,2 и 14,3 \pm 0,3 мг соответственно). Об этой реакции животных при неблагоприятных воздействиях в условиях стресса сообщают многие исследователи (Коврижко, Олейник,

Таблица 1. Влияние сырой нефти на некоторые морфофизиологические показатели белых мышей после двухмесячной экспозиции в эксперименте ($M\pm m$)

Показатель	(Самцы	Самки		
Показатель	Опыт (5)	Контроль (4)	Опыт (5)	Контроль (6)	
Относительная масса					
тела, г/см³	$0,34 \pm 0,004$	0.33 ± 0.005	0.34 ± 0.005	$0,35 \pm 0,011$	
Индекс сердца, ‰	$7,5 \pm 0,5$	$5,7 \pm 0,4*$	$8,2 \pm 0,5$	$5,9 \pm 0,5**$	
Индекс печени, ‰	$88,0 \pm 6,4$	$76,0 \pm 11,6$	$107,0 \pm 13,8$	$65,0 \pm 4,1*$	
Индекс почки, ‰	$10,0 \pm 0,7$	$8,9 \pm 1,1$	$10,3 \pm 0,8$	$6,7 \pm 0,5**$	
Индекс					
надпочечника, ‰	$0,46 \pm 0,20$	$0,23 \pm 0,02$	$0,58 \pm 0,23$	$0,28 \pm 0,04$	
Индекс селезенки, ‰	$19,6 \pm 5,2$	$13,9 \pm 4,0$	$16,0 \pm 3,4$	$7,6 \pm 1,1*$	
Кол-во гемоглобина,					
г/л	$92,7 \pm 3,7$	$123,0 \pm 9,7*$	$78,7 \pm 7,0$	$100,7 \pm 6,7^*$	

Примечание. В скобках – n. Здесь и в табл. 2, 3: различия между опытом и контролем достоверны: * – при P < 0.05; ** – при P < 0.01; *** – при P < 0.001.

1984; Кириллов, 1994 и др.). Однако в наших экспериментах таких проявлений сильного стресса, как кровоизлияния, деструкция клеток, истончение стенок сосудов и др., замечено не было, но происходили изменения таких морфометрических показателей, как площадь сечения ядер, ширина зон надпочечника, доля расширенных капилляров, ядерно-плазматическое отношение и митотический индекс, косвенно свидетельствующих об активизации функций надпочечника и роли его гормонов в адаптации организма к условиям стресса.

Иммунная и кроветворная системы. Нефтяное загрязнение пищи даже в течение 60 дней вызывает у белых крыс существенные изменения морфологии лимфатических фолликулов селезенки: отмечено достоверное снижение содержания лимфоидных клеток на тестовую поверхность во всех исследуемых зонах белой пульпы. В периартериальной тимусзависимой зоне количество лимфоидных клеток на 21,3 % ниже, чем в контроле, в тимуснезависимой мантийной они составили 62,9 %, в маргинальной зоне опустошение достигло 18,2 % по сравнению с контролем. Опустошение лимфатических фолликулов происходит, по мнению Г. Н. Крыжановского [1985], за счет усиленной миграции Т- и В-лимфоцитов, осуществляющих роль «срочной помощи» в поддержании тканевого гомеостаза и в элиминации поврежденных или перерожденных клеток. Эти клетки играют существенную роль в регенерации тканей. Речь идет о трофической и пластической стимуляциях регенерирующих паренхиматозных клеток, о передаче им лимфоцитами дополнительного или необходимого пластического материала в виде нуклеиновых кислот и белков в условиях стресса.

В ходе эксперимента у животных наблюдали нарушения процессов кроветворения. У белых крыс, находившихся на нефтяной диете один месяц, снижалось количество эритроцитов в периферической крови до 5,98 \pm 0,30 \times 10¹² клеток/л с $8,26 \pm 0,16 \times 10^{12}$ клеток/л у интактных животных, при этом концентрация гемоглобина в крови снижалась до 103,17 ± 2,4 с контрольного уровня $134,83 \pm 1,9$ г/л, что составило 76,5 %. Сходные результаты получены для белых мышей при двухмесячной экспозиции. К концу 60-дневной экспозиции у белых крыс имел место ретикулоцитоз (100,59 ± 1,04 ‰ ретикулоцитов по отношению к количеству эритроцитов в периферической крови при $43,38 \pm 0,86 \%$ в контроле), свидетельствующий о значительном повышении реактивности последних этапов кроветворного процесса. При оценке состояния костномозгового кроветворения были выявлены следующие особенности: количество проэритробластов составляло 77,3 % от контроля, базофильных и полихроматофильных эритробластов, полихроматофильных и оксифильных нормобластов соответственно 83,9, 89,1, 106,5 и 22,0 % от контроля (различия достоверны).

Полученные результаты демонстрируют наличие активной реакции системы эритрона костного мозга на нефтяное загрязнение, свидетельствуют об ингибирующем влиянии нефти на пролиферирующие кроветворные клетки, о повышении реактивности последних стадий кроветворения, о быстром переходе клеток последней генерации миелокариоцитов (оксифильных нормобластов) в ретикулоцитарный ряд.

Как у контрольных, так и у подопытных белых мышей отмечено неравномерное распределение Гомори-положительного нейросекреторного материала по заднему нейрогипофизу с концентрацией его вокруг капилляров. Однако у подобных животных эта концентрация выражена более отчетливо, и содержание нейросекреторного материала в заднем нейрогипофизе ниже (2 балла по 5-балльной шкале), чем в контроле (4 балла). Капилляры заднего нейрогипофиза у подопытных животных большей частью расширены и содержат форменные элементы крови [Елифанов и др., 1991]. Снижение содержания Гомори-положительного нейросекреторного материала в срединном возвышении и задней доле гипофиза отмечено, в частности, Е. Г. Берлингером с соавторами [1991] при свинцовой интоксикации. Все это позволяет предположить, что в процессе адаптации организма к условиям продолжительного нефтяного загрязнения слабой степени гипоталамические нонапептиды, выделяющиеся из заднего нейрогипофиза в общий кровоток, играют значительную роль.

Генотоксические эффекты. Особый интерес представляют данные о генотоксическом действии сырой нефти, оцененные пикнотическим тестом. О повышении доли пикнозов под действием некоторых неспецифических факторов сообщают Ж. Браше (1969), А. И. Атабекова и Е. И. Устинова [1987]. В настоящее время пикнотическим (микроядерным) тестом активно пользуются для выявления генотоксических агентов [Пшеничнов, 1991; Liu Yongchang et al., 1991 и др.]. В наших экспериментах использовался пикнотический индекс клеток кишечного эпителия и печени беспородных белых крыс. В обоих случаях отмечено достоверное увеличение количества пикноморфных клеток и их доли у животных, получавших в рационе сырую нефть на протяжении одного месяца (табл. 2 и 3).

Таблица 2. Пикнотические индексы клеток кишечного эпителия белых крыс, получавших с пищей сырую нефть, и в контроле

Показатель	Контроль	Опыт (самцы)	Опыт (самки)
Общее количество			
проб, шт.	23	40	41
Общее число тести-			
рованных клеток, шт.	7900	13500	10911
Пикнотический			
индекс, %	$2,3 \pm 0,17$	$3,5 \pm 0,20***$	5,6 ± 0,36***
Коэффициент вариа-			
ции пикнотического			
индекса, %	34,7	35,4	41,5

Примечание. Здесь и в табл. 3: для пикнотического индекса приводится $M\pm m$.

Таблица 3. Пикнотические индексы клеток печени белых крыс, получавших с пищей сырую нефть, и в контроле

Показатель	Контроль	Опыт (самцы)	Опыт (самки)
Общее количество			
проб, шт.	46	37	87
Общее число тести-			
рованных клеток, шт.	3832	3364	7202
Пикнотический			
индекс, %	$9,0 \pm 0,73$	$14,1\pm0,86***$	$17,8 \pm 0,60***$
Коэффициент ва-			
риации пикнотиче-			
ского индекса, %	54,5	36,9*	31,4***

При этом самки демонстрируют большую чувствительность к нефтяному загрязнению, чем самцы, как и в случае с морфофизиологическими показателями беспородных белых мышей, получавших нефть в диете в течение двух месяцев.

Учитывая самостоятельное индикационное значение показателей варьирования отдельных параметров, показанное многими авторами, интересно отметить, что, анализируя величины индекса надпочечника у самок опытной и контрольной групп белых мышей, мы не обнаружили достоверных различий, однако по характеру варьирования этого признака самки из опытной серии существенно отличаются от контрольных: коэффициенты вариации соответственно равны $87,4 \pm 27,6$ и $33,9 \pm 9,8$ (различия по t-критерию Стьюдента и F-критерию Фишера достоверны соответственно при P < 0.05 и P < 0.01). Принимая во внимание тот факт, что в опытной серии не было беременных самок, для которых характерно естественное повышение индекса надпочечника в этот период (а в контроле они составляли 50 %), можно утверждать, что большая вариабельность этого показателя в опыте целиком связана именно со стрессом, вызванным нефтяным загрязнением.

Понятным является и снижение при нефтяной диете коэффициента вариации пикнотического индекса клеток печени белых мышей, наименьшего у самок, несущих наибольшую

физиологическую и функциональную нагрузки, при тенденции к повышению его в клетках кишечного эпителия, играющего роль своеобразного «расходного материала».

Существенный момент при решении вопроса о разнородности отдельных групп животных – изучение корреляций разных частей организма в процессе увеличения размеров особей – так называемый аллометрический рост. В ходе наших исследований по зависимости веса надпочечников от веса тела для самок опытной и контрольной групп были построены аллометрические уравнения [Елифанов и др., 1996], которые позволили отметить разнонаправленный характер корреляций в том и другом случае: опыт: $Y = 506,6X^{0,440}$, контроль: $Y = 0,003X^{0,737}$.

Показательным является и характер распределения величин того или иного признака. степень отклонения распределения от нормального закона. В качестве примера можно привести характер распределения относительного веса тела самок контрольной и опытной групп (практически не отличающихся по средним величинам): если в первом случае это распределение не отличается от нормального, то во втором имеет место отрицательный эксцесс $(Ex = -1,3 \pm 0,75$ при $t_{Fx} = -1,73)$, характеризующий плосковершинное распределение. Биологический смысл этого феномена может быть связан с наличием возмущающего фактора, не являющегося по своей величине лимитирующим для данного показателя (когда преимущественного накопления вариант у модального значения не происходит).

Сравнивая эффект, вызванный экспериментальным воздействием сырой нефти на организм животных в лабораторных условиях, и данные исследований влияния нефтяного загрязнения на морфофизиологические особенности мелких млекопитающих в природных биогеоценозах Среднего Приобья, можно констатировать однотипность реакций, имеющих место в том и другом случае. В. М. Шапошников с соавторами [1980] считают, что однотипная реакция грызунов на нефтепромыслах и в лаборатории указывает на непосредственное влияние нефтяного загрязнения, а изменения, выявленные у животных только в районе нефтепромысла, вызваны сопутствующими нефтедобыче факторами (шум, химические реагенты, изменение уровня грунтовых вод, осветление в результате рубок леса и вываливания деревьев и др.).

Принимая это во внимание, можно предположить, что изменения в морфофизиологии мелких млекопитающих нефтезагрязненных территорий вызваны, в первую очередь, непо-

средственным действием сырой нефти и сопутствующих ей химических веществ.

Заключение

Сырая нефть вызывает неспецифическую реакцию организма мелких млекопитающих на загрязнение, являющееся стрессовым фактором для животных, что согласуется с результатами, полученными ранее в природе на нефтезагрязненных территориях [Гашев, 1992]. В эксперименте у грызунов, содержащихся на нефтяной диете, отмечается повышение интенсивности метаболизма, вызывающее увеличение индексов сердца и почек. Отмечена напряженность энергетического обмена, проявляющаяся в гипертрофии печени, возможно, за счет резервирования гликогена, что характерно для стрессовой ситуации, подтверждающейся увеличением у экспериментальных зверьков индекса надпочечников.

Токсические эффекты подтверждаются одновременным увеличением индекса селезенки и снижением гемоглобина в крови у животных, получающих с пищей и водой сырую нефть. Также отмечены нарушения процессов кроветворения, усиление миграции лимфоцитов в кровоток, увеличение доли пикноморфных клеток в различных тканях, свидетельствующие о прямом токсическом действии сырой нефти.

При употреблении с пищей сырой нефти можно говорить об общем нарастании стрессовости ситуации и об адаптации организма зверьков, специфично протекающих у разных видов грызунов и у разных поло-возрастных групп одного вида. В адаптации к стрессовым ситуациям, создаваемым нефтяным загрязнением, активное участие принимает гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система грызунов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта в рамках Постановления Правительства РФ № 220.

Литература

Абдуллаев М. Д., Бейбутова Т. С. Об антитоксическом действии нефтяного ростового вещества // Нефтяные удобрения и стимуляторы в сельском хозяйстве: Материалы совещания, 22–25 янв. 1963 г. Баку: АН АзССР, 1965. С. 547–549.

Атабекова А. И., Устинова Е. И. Цитология растений. М.: Агропромиздат, 1987. 244 с.

Берлингер Е. Г., Данилова О. А., Чекунова М. П. Влияние свинцовой интоксикации на гипоталамогипофизарный нейросекреторный комплекс крыс // Материалы IV Всесоюз. конф. «Эндокринная система организма и вредные факторы окружающей среды». Л., 1991.

Браше Ж. Биохимическая цитология. М., 1960. 516 с.

Вермель Е. М. Величина, размножение и рост клеток // Рост животных. М., 1935. С. 107–163.

Гашев С. Н. Влияние нефтяных разливов на фауну и экологию мелких млекопитающих Среднего Приобья // Экология. 1992. № 2. С. 40–48.

Гашев С. Н., Елифанов А. В., Соловьев В. С., Гашева Н. А. Влияние сырой нефти на морфофункциональное состояние организма беспородных белых мышей и крыс // Бюллетень МОИП. 1994. Т. 99, вып. 6. С. 23–29.

Дарлингтон С. Д., Ла Кур Л. Ф. Хромосомы. Методы работы. М., 1980. 183 с.

Елифанов А. В., Гашев С. Н., Ильюк Е. С. и др. О некоторых механизмах адаптации мелких млекопитающих к нефтяному загрязнению // Научный вестник ТГУ (биология). Тюмень: ТюмГУ, 1996. С. 76–79.

Елифанов А. В., Курочкина О. И., Гашев С. Н. Влияние нефтяного загрязнения на состояние заднего нейрогипофиза белых мышей // Материалы IV Всесоюз. конф. «Эндокринная система организма и вредные факторы окружающей среды». Л., 1991. С. 84.

Канцерогенные вещества: Справочник / Под ред. В. С. Турусова. М.: Медицина, 1987. 334 с.

Караев А. Н. Механизм действия нефтяного ростового вещества на животный организм // Нефтяные удобрения и стимуляторы в сельском хозяйстве: Материалы совещания, 22–25 янв. 1963 г. Баку: АН АзССР, 1965. С. 21–29.

Кириллов О. И. Стрессовая гипертрофия надпочечников. М.: Наука, 1994.

Коврижко Н. М., Олейник Н. К. Функциональная морфология надпочечников при стрессе на фоне введения транквилизаторов // Морфология. Вып. 9. Киев. 1984.

Кононский А. И. Гистохимия. Киев, 1976. 280 с. Крыжановский Г. Н. Стресс и иммунитет // Вестн. АМН СССР. 1985. № 8. С. 3–12.

Кулябко А. А., Овсянникова Ф. В. О физиологическом действии нефти и ее продуктов // Записки Императорской Академии Наук. 1899. Т. VIII, № 9. С. 1–19.

Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных // Ланималогия. 1993. № 1. С. 29.

Моисеенко Т. И., Гашев С. Н., Петухова Г. А. и др. Биологические методы оценки качества вод. Ч. 2: Биотестирование // Вестник Тюменского гос. ун-та. 2010. № 7. С. 39–50.

Панов Г. Е., Петряшин Л. Ф., Лысяный Г. Н. Охрана окружающей среды на предприятиях нефтяной и газовой промышленности. М.: Недра, 1986. 244 с.

Пшеничнов Р. А. Современные тест-системы выявления мутагенов окружающей среды. Свердловск, 1991.

Сабирова Г. В., Маньковская Н. К. Производство нефтяного ростового вещества. Киев: Техника, 1966.

Хесин Е. Я. Функциональная морфология ядер. М., 1967.

Черкашин С. А. Отдельные аспекты влияния углеводородов нефти на рыб и ракообразных // Вестник ДВО РАН. 2005. № 3. С. 83–91.

Шапошников В. М., Кирюшкина М. Н., Симонова Г. П., Блинов С. П. Грызуны как возможные индикаторы нефтяного загрязнения среды // Грызуны: Материалы 5-го Всесоюз. совещ. М.: Наука, 1980. С. 462–464.

Шварц С. С., Смирнов В. С., Добринский Л. Н. Метод морфофизиологических индикаторов в экологии наземных позвоночных. Свердловск: УФАКН, 1968. 387 с.

Ayalogu O. E., Igboh N. M., Dede E. B. Biochemical Changes in the Serum and Liver of albino rats exposed to Petroleum Samples (gasoline, kerosene, and crude Petroleum) // J. Appl. Sci. Environ. 2001. Vol. 5 (1). P. 97–100.

Böhn N., Moser R. Reversible Hyperplasie und Hypertrophie der Mänseleber unter funktioneller Belastung mit Phenobarbital // Beitr. Pathol. 1976. Bd. 157. N 3.

Bucke D. Histology. Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish. Ellis Horwood Ltd., Chichester, 1994. P. 69–97.

CCME (Canadian Council of Ministers for the Environment). Canada-wide Standard for Petroleum Hydrocarbons (PHC) in Soil: Scientific Rationale. Supporting Technical Document. Canadian Council of Ministers for the Environment. 2008. 383 p.

Conaway C. C., Schreiner C. A., Cragg S. T. Mutagenicity evaluation of petroleum hydrocarbons // Appl. Toxicol. Petrol. Hydrocarbons. Princeton, N. Y., 1984. P. 89–107.

Coomes R. M., Hazer K. A. Statistical analyses of crude oil and shale oil carcinogenic test data // Ibid. P. 167–186.

Draft Toxicological Intake Values for Priority Contaminants in Soil. Wellington: Ministry for the Environment, 2010. 168 p.

Guidance on the application of Globally Harmonized System (GHS) criteria to petroleum substances. Version 1, 17 June, 2010. 27 p.

Hall Russel J., Coon Nancy C. Interpreting residues of petroleum hydrocarbons in wildlife tissues // US Dep. Inter., Fish and Wildlife Serw. 1988. N 15. P. 1–7.

Holland J. M., Frome E. L. Statistical evaluations in the carcinogenesis bioassay of petroleum

hydrocarbons // Appl. Toxicol. Petrol. Hydrocarbons. Princeton, N. Y., 1984. P. 151–166.

Lewis S. C., King R. W., Cragg S. T., Hillman D. W. Skin carcinogenic potential of petroleum hydrocarbons: crude oil, distillate fractions and chemical class subfractions // Ibid. P. 139–150.

Liu Guocheng. How can the complexity result in the stability in ecosystem // J. North-East Forest. Univ. 1991, 19, N 6, P. 9–14.

Meldolesi I. On the significance of the hypertrophy of the smooth endoplasmic reticulum in liver cells after administration of drugs // Biochem. Pharmacol. 1967. Vol. 16. P. 125–129.

Nishimoto S., Yamawaki M., Kitamura S.-I. et al. Risk Assessment of Heavy Oil on Terrestrial Mammals // Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry. Biological Responses to Chemical Pollutants. 2008. P. 269–274.

Nishimoto S., Yamawaki M., Akiyama K. et al. Severe abnormalities in the reproductive organs of mice caused by chemical substances contained in heavy oil // The Journal of Toxicological Sciences. 2009. Vol. 34, N 2. P. 239–244.

Ottway S. M. The comparative toxicity of crude oils // The ecological effects of oil pollution on littoral communities. London: Institute of Petroleum, 1971. P. 172–180.

Rahimtula A. D., O'Brien P. J., Payne J. F. Induction of xenobiotic metabolism in rats in exposure to hydrocarbon-based oils // Appl. Toxicol. Petrol. Hydrocarbons. Princeton, N. Y., 1984. P. 71–79.

Rosmarie A. F. Toxicity summary for benzo[a]pyrene // Oak ridge reservation environmental restoration program. 1994. 10 p.

Schulte-Hermann R., Thom R., Sohlisht I., Kozansky W. Zahl und Ploidiegrad der Zellkerne der Leber unter dem Einfluss körperfremder Stoffe // Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. Und Experimental. Pathol. 1968. Bd. 261, H. 1.

Test plan crude oil category / High production volume (HPV) chemical challenge program, November 21, 2003 Crude Oil Consortium Registration #1100997.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Елифанов Андрей Васильевич

проректор Тюменского государственного университета, к. б. н., доцент Тюменский государственный университет

ул. Семакова, 10, Тюмень, Россия, 625003 эл. почта: andel@newmail.ru

Гашев Сергей Николаевич

зав. каф. зоологии и ихтиологии, д. б. н., профессор Тюменский государственный университет ул. Пирогова, 3, Тюмень, Россия, 625043 эл. почта: gsn-61@mail.ru тел.: (3452) 756249

Моисеенко Татьяна Ивановна

зав. Отделом биогеохимии и экологии, чл.-корр. РАН, д. б. н., профессор

Институт геохимии и аналитической химии РАН им. В. И. Вернадского

ул. Косыгина, 19, Москва, ГСП-1, Россия, 119991 эл. почта: moiseenko.ti@gmail.com

Elifanov, Andrey

Tyumen State University 10 Semakov St., 625003 Tyumen, Russia e-mail: andel@newmail.ru

Gashev, Sergey

Tyumen State University 3 Pirogov St., 625043 Tyumen, Russia e-mail: gsn-61@mail.ru tel.: (3452) 756249

Moiseenko, Tatiana

Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry

19 Kosygin St., 119991 Moscow, GSP-1, Russia e-mail: moiseenko.ti@gmail.com

УДК 582.475: 57.042: 581.5

ВЛИЯНИЕ КИСЛОТНОСТИ ПОЧВЫ НА ЭКОФИЗИОЛОГИЧЕСКУЮ ХАРАКТЕРИСТИКУ СЕЯНЦЕВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

А. А. Еркоева, С. Н. Дроздов, Е. С. Холопцева

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Исследовали эколого-физиологические характеристики двухмесячных сеянцев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) разного географического происхождения на трех уровнях кислотности почвы по влиянию свето-температурных факторов среды на CO_2 -обмен растений. Опыты проводили в регулируемых условиях среды, используя активный многофакторный планируемый эксперимент. Показано, что эколого-физиологическая характеристика сеянцев зависит как от их географического происхождения, так и от кислотности почвы. Оптимальные условия фотосинтеза исследуемых экотипов сосны по освещенности расположены в диапазоне $200-570~\mathrm{BT/m}^2$, а температурные – от 4 до $30~\mathrm{^oC}$. С продвижением на юг границы светового оптимума смещаются в сторону более низкой освещенности, а нижняя граница температурного – в сторону повышенных значений. При повышении кислотности до pH 4,5 границы свето-температурного оптимума сдвигаются в сторону увеличения интенсивности исследуемых факторов, а при дальнейшем уменьшении pH (до 3,5) – в сторону пониженных значений, независимо от географического происхождения.

К л ю ч е в ы е с л о в а : *Pinus sylvestris*, сеянцы, ${\rm CO_2}$ -обмен интактных растений, свето-температурные характеристики, оптимум и максимум нетто-фотосинтеза, кислотность почвы, географическое происхождение.

A. A. Erkoeva, S. N. Drozdov, E. S. Kholoptseva. EFFECTS OF SOIL ACIDITY ON ECO-PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SCOTS PINE SEEDLINGS OF DIFFERENT PROVENANCE

Ecological characteristics of whole two-months-old Scots pine seedlings of different provenance were investigated through the study of gaseous ${\rm CO_2}$ exchange under different light-temperature conditions at three levels of soil acidity. Investigations were carried out in a pre-planned multi-factor experiment in a controlled environment. It has been established that eco-physiological characteristics depend on both the provenance and soil acidity. The 200–570 W m² light range and the temperature of 4–30 °C were optimal. As one moved southwards the light range optimal for the net photosynthesis rate shifted towards lower light intensity, whereas the lower limit of the optimal temperature range shifted towards higher values. As the soil acidity increased (pH 4.5) the light-temperature range optimal for net photosynthesis shifted upwards; decrease in pH to 3.5 caused the range to shift towards lower values, irrespective of the provenance.

Key words: *Pinus sylvestris* L., seedlings, gaseous CO₂ exchange in intact plants, light-temperature characteristics, optimum and maximum net photosynthesis, soil pH.

Введение

Сосна обыкновенная (Pinus sylvestris L.) растет в основном на песчаных почвах и заболоченных территориях и обладает способностью успешно развиваться при небольших запасах питательных веществ и влаги. В то же время, наряду со слабой конкурентной способностью с другими древесными породами, она имеет широкий экологический диапазон и благодаря своим многочисленным разновидностям распространена в полосе, идущей от северной Шотландии и Норвегии через всю Евроазиатскую бореальную лесную зону до Тихого океана. Несмотря на значительное количество исследований, посвященных биологии сосны [Куусела, 1991; Молчанов, 2007], сведения об экофизиологической характеристике ее получены в основном при работе с отдельными частями растений и носят в большинстве экспериментов качественный характер [Цельникер, 1983; Суворова, 2009]. По имеющимся литературным данным, ее всходы очень чувствительны к засухе, но заморозкоустойчивы и светолюбивы [Голомазова, 1981; Куусела, 1991, с. 50-58]. Семена начинают прорастать при температуре 5-6 °C, максимальный рост побегов наблюдается при температуре в зоне корней 12 °С и температуре воздуха не выше 30 °C, интенсивность фотосинтеза снижается при температуре 10 °C и ниже, а световое насыщение достигается при 300-400 Bт/м² и зависит от предшествующих условий внешней среды [Голомазова, 1981; Малкина, 1981]. Световой оптимум CO₂обмена сосны в весенний период находится в пределах 180-760 Вт/м², а температурный от 5,5 до 25,2 °C. В летний период световой оптимум имеет границы 280-640 Bт/м², температурный – от 8,2 до 24,0 °C [Болондинский, 2004]. Почвы сосновых лесов в основном характеризуются кислой реакцией, достигающей в нижних слоях лесной подстилки и подзолистом горизонте рН менее 3,5 солевой вытяжки [Морозова, Федорец, 1992]. Имеющиеся литературные данные о влиянии кислотности почвенной среды на хвойные породы немногочисленны и не отражают специфики экотипов [Левкина, 1964; Иванов и др., 1966; Van Dijk, Bienfait, 1993; Jentschke et al., 2001]. В то же время она имеет большое значение, особенно на ранних фазах развития древесных, в связи с расширением масштабов лесовозобновления и необходимостью ускоренного получения качественного посадочного материала. Последнее требует углубленного знания экофизиологической характеристики сеянцев, выращиваемых в защищенном грунте [Жигунов, 2000; Фрейберг и др., 2009]. Многочисленность внешних и внутренних факторов, определяющих рост, развитие и продуктивность растений, обусловливает необходимость системного подхода и выбора интегральных показателей, характеризующих состояние изучаемых систем [Урманцев, 1977; Курец, Попов, 1991, с. 62-75]. Одним из методов получения экофизиологической характеристики растений является определение интенсивности ведущих факторов внешней среды, обеспечивающих достижение оптимального уровня нетто-фотосинтеза [Тооминг, 1977; Суворова, 2009, с. 40-44], т. е. условий фоновой зоны [Дроздов, Курец, 2003, с. 42-52] - границ оптимума произрастания конкретного экотипа. Выбор видимого фотосинтеза как показателя реакции растения на условия внешней среды определяется тем, что он является основополагающим физиологическим процессом, чутко реагирующим на изменения условий среды и хорошо дистанционно контролируемым. Однако даже многократные определения любого физиологического показателя в природных условиях или в однофакторном эксперименте не позволяют прогнозировать динамику процесса из-за влияния на него различных сочетаний факторов среды и не менее сильного их последействия. Даже многолетний планируемый сбор экспериментального материала со строгой регистрацией динамики ведущих факторов внешней среды и их последующим регрессионным анализом не гарантирует количественного определения влияния конкретного фактора на исследуемый биологический процесс из-за возможного отсутствия нужного сочетания интенсивности факторов внешней среды, что в свою очередь сказывается на качестве собранного материала.

Задачей данной работы было изучение влияния кислотности почвы на экофизиологическую характеристику сеянцев сосны обыкновенной разного географического происхождения путем определения параметров света и температуры, обеспечивающих достижение потенциального максимума и зоны оптимума их видимого фотосинтеза при естественном содержании в воздухе CO₂.

Материал и методы

Исследования проводили с сеянцами сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) разного географического происхождения (табл. 1). Перед посевом семена помещали на 3 ч в 0,05 %

раствор перманганата калия, затем просушивали до воздушно-сухого состояния в течение суток и высевали в пластиковые сосуды с песком объемом 0,5 л по 20–25 штук. Сеянцы выращивали в факторостатных условиях: фотопериод 14 ч, освещенность $100-120~\rm BT/M^2$, температура окружающей среды $25/20~\rm ^{\circ}C$ (день/ночь), при трех уровнях рН почвы – 3,5; 4,5 и 6,5. Полив осуществляли питательным раствором Кнопа, дополненным микроэлементами, с заданным рН. Кислотность раствора регулировали путем добавления 10%-й $\rm H_2SO_4$ в необходимой пропорции.

Таблица 1. Региональное и географическое место сбора семян сосны обыкновенной

Nº	Регион/место сбора семян	Географ коорді	Природная зона	
	соора семян	С. Ш.	В. Д.	зона
1	Мурманская обл./Ковдозеро	66°45'40''	31°33'39"	Лесотундра
2	Карелия/ Юшкозеро	64°44'01''	32°05'53"	Северная тайга
3	Карелия/ Поросозеро	62°43'05''	32°45'37''	Средняя тайга

По достижению сеянцами двухмесячного возраста удаляли нетипичные всходы, оставляя по 10 растений на сосуд. Затем по три сосуда с растениями помещали в установку для исследования CO_2 -обмена открытого типа [Курец, 1991, с. 50–55] с газоанализатором Infralyt-IV (Германия), пределы измерения 0–0,01 % объемных, и осветительной системой, со спектром излучения, близким к естественному свету. Далее по восьмиточечному плану второго порядка проводили многофакторный планируемый эксперимент в трехкратной повторности (табл. 2–3). Значения точек плана выбирали на основании литературных данных.

Таблица 2. План двухфакторного эксперимента по изучению влияния света и температуры на ${\rm CO_2}$ -газообмен сеянцев сосны обыкновенной разного географического происхождения [Голикова и др., 1974]

Ступень плана	$X_{_1}$	X ₂
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	1	0
6	0	1
7	0	0
8	0	-1

Примечание. X_1 (кодированное значение) – освещенность (BT/M^2) , X_2 (кодированное значение) – температура (°C).

Таблица 3. Соотношение кодированных и действительных значений освещенности и температуры

	14	I блок II блок							
Место	Кислотность		Натуральные уровни						
сбора семян	почвенной	кодированных единиц							
Семян	среды		-1	0	1	-1	0	1	
Ковдозеро	pH 6,5	Т	5	15	25	10	20	30	
		Ε	100	200	300	100	250	500	
	pH 4,5	Т	5	15	25	10	20	35	
		Ε	100	200	300	100	200	500	
	pH 3,5	Т	7	20	30	5	15	25	
		Ε	100	250	400	100	250	400	
Юшкозеро	pH 6,5	Т	5	10	25	8	15	30	
		Ε	100	200	300	100	200	500	
	pH 4,5	Т	5	15	25	7	15	35	
	_	Е	100	200	400	100	200	300	
	pH 3,5	Т	5	15	25	8	20	35	
_		Ε	100	250	450	100	250	450	
Поросозеро	pH 6,5	T	5	15	30	9	20	35	
		Ε	10	20	30	10	20	30	
	pH 4,5	T	7	20	30	15	25	35	
		Ε	100	200	300	100	250	500	
	pH 3,5	T	7	20	30	15	25	35	
		Е	100	250	400	100	250	400	

Примечание. Здесь и в табл. 4: T – температура воздуха (°C), E – освещенность (BT/M^2).

Интенсивность газообмена определяли при уровне CO_2 в воздухе, близком к естественному, по разности концентраций углекислого газа на входе и выходе воздушного потока установки. Экспозиция ступени плана составляла 40-60 мин, время выполнения одной повторности – 8 ч. Интенсивность газообмена рассчитывали на единицу сухой массы растения.

Результаты и обсуждение

Обработка экспериментальных данных методом множественного регрессионного анализа позволила получить уравнения – модели взаимосвязи видимого фотосинтеза интактных растений сосны обыкновенной с температурой и освещенностью:

NP = $a_0 + a_1 T + a_2 E + a_3 T^2 + a_4 E^2 + a_5 T E$, где NP – интенсивность нетто-фотосинтеза (мг CO $_2$ /г сухой массы в час); E – освещенность (Вт/м 2); T – температура (°C); $a_0 - a_5$ – коэффициенты, определенные при математической обработке экспериментальных данных.

Статистическая оценка модели показала высокую степень ее адекватности: коэффициент множественной детерминации $R^2=0.85$, множественной корреляции R=0.89, критерий Фишера F=5.4, который значительно больше F табличного при уровне значимости a=0.05.

Анализ модели численными методами показал (табл. 4), что сеянцы сосны по-разному реагировали на кислотность почвенной среды в зависимости от их географического происхождения. Наибольший максимум нетто-фотосинтеза при естественном содержании в воздухе CO₂ имели два более северных образца сосны при рН почвы 4,5, у более южного образца – при рН 6,5. Однако если в первом случае

разница в уровне потенциального максимума видимого фотосинтеза в зависимости от кислотности 4,5 и 6,5 была значительной, то в последнем – близкой к ошибке опыта.

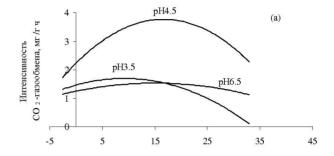
Таблица 4. Потенциальный максимум (max) и оптимум (opt) нетто-фотосинтеза сеянцев сосны обыкновенной и свето-температурные условия внешней среды, обеспечивающие их достижение при естественном содержании в воздухе CO_2 и разных значениях кислотности почвы

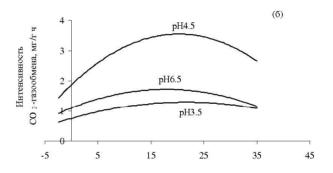
Место сбора семян	Кис- лот- ность поч-	фотос	то- синтез О₂/г·ч)	Услог максим нетт фот синте	мума ·о- о-	Услов оптим нетт фотоси	ума о-
	вы pH	max	opt	Е, Вт/м²	T, °C	E, Вт/м²	T, °C
Ковд-	6,5	1,49	1.37	310	12	200-480	4-22
озеро	4,5	3,86	3,48	430	14	290-570	6–24
•	3,5	1,4	1,24	370	11	240-460	2,5-20
Юшк-	6,5	2,1	1,89	340	15	240-420	6-24
озеро	4,5	4,08	3,65	350	19	240-470	9-28
	3,5	1,22	1,1	390	13	260-540	5-25
По-	6,5	3,0	2,7	310	21	200-400	11-30
poc-	4,5	2,3	2,1	330	16	220-410	10-25
озеро	3,5	1,32	1,21	340	15	210-450	8–22

Кислотность песчаного субстрата для выращивания сеянцев сосны значительно влияла и на свето-температурные условия, обеспечивающие достижение потенциального максимума нетто-фотосинтеза. Менее требовательными к теплу были растения сосны наиболее северного происхождения при всех исследуемых уровнях кислотности, особенно при рН 3,5. Более теплолюбивыми были сеянцы южного происхождения при рН 6,5, в то время как при повышенной кислотности (рН 4,5) их требования к теплу оказались ниже, чем у растений более северного происхождения — из северотаежной зоны, при том же значении рН.

По отношению к уровню освещенности также наблюдали значительные различия, зависящие как от географического происхождения семян, так и от кислотности почвы. Несколько менее требовательны к интенсивности света, обеспечивающего достижение максимума нетто-фотосинтеза, сеянцы из семян более южного происхождения при всех значениях кислотности почвы, особенно при рН 6,5. У всходов семян наиболее северного происхождения при оптимальном уровне кислотности почвы значительно выше требования к освещенности с расширением ее зоны оптимума.

Графическое изображение видимого фотосинтеза сеянцев сосны при различных условиях среды наглядно демонстрирует, по углу наклона кривых [Малкина и др., 1970], особенности реакции растений на действие исследуемого фактора в зависимости от кислотности почвы и места происхождения семян. У всходов разного происхождения сила влияния температуры, судя по наклону кривых, возрастала при кислотности почвы, обеспечивающей максимум фотосинтеза (рис. 1). При этом растения более северного происхождения достигали максимума видимого фотосинтеза при рН 4,5, а повышение и понижение кислотности вело к значительному снижению уровня нетто-фотосинтеза и силы влияния температурного фактора. Всходы наиболее южного происхождения достигали максимума нетто-фотосинтеза при рН 6,5, а повышение кислотности почвы приводило к снижению их видимого фотосинтеза и смещению его максимума в сторону пониженных температур.





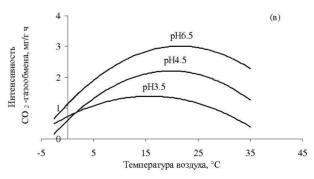


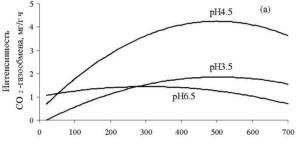
Рис. 1. Влияние температуры воздуха на интенсивность нетто-фотосинтеза сеянцев сосны обыкновенной разного географического происхождения:

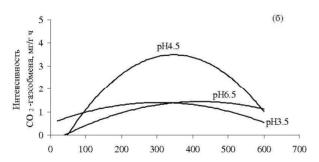
а – Ковдозеро, б – Юшкозеро, в – Поросозеро, при освещенности зоны оптимума 300 Вт/м², выращенных при разной кислотности почвенной среды

Световые кривые нетто-фотосинтеза сеянцев исследуемых образцов сосны под влиянием кислотности почвы, так же как и температурные, графически имели куполообразную форму (рис. 2), в отличие от приводимых в научной литературе и вошедших учебники [Физиология растений, 2005, с. 202]. Указанные световые кривые, полученные в природных условиях или в однофакторных экспериментах, при достижении определенной интенсивности света выходят на плато, что, по мнению авторов, наблюдается в результате светового насыщения. Эти различия в ходе влияния интенсивности света на видимый фотосинтез, вероятно, связаны с использованием иного методического подхода. В нашей работе была попытка применения методики активного планируемого мно-

широко практикуемого однофакторного метода. Об отсутствии в естественных многофакторных условиях внешней среды выхода световой кривой нетто-фотосинтеза на плато свидетельствуют многочисленные исследования повреждающего влияния высокой интенсивности света на фотосистемы растений [Цельникер, 1978, с. 163; Frank Harry, Brudvig Gary, 2004; Wei Ai-li et al., 2004]. По нашему мнению, выход световых кривых нетто-фотосинтеза на плато является результатом не светового насыщения, а влияния лимитирующего фактора: в природе это, вероятнее всего, недостаток влаги, а в эксперименте температуры. При работе в регулируемых условиях внешней среды при проведении планируемого многофакторного эксперимента эти лимитирующие условия снимаются, но, естественно, возникают другие трудности.

гофакторного эксперимента, в отличие от





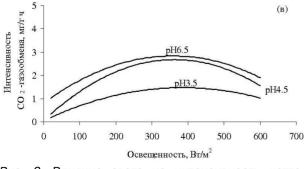
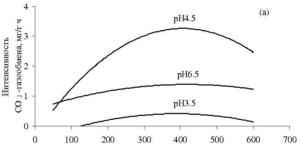
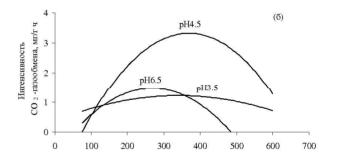


Рис. 2. Влияние света на интенсивность неттофотосинтеза сеянцев сосны обыкновенной разного географического происхождения:

а – Ковдозеро, б – Юшкозеро, в – Поросозеро, при 15 °C – температуре воздуха зоны оптимума для всех исследуемых вариантов, выращенных при разной кислотности почвенной среды





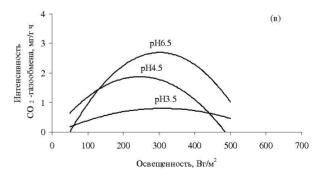


Рис. 3. Влияние света на интенсивность неттофотосинтеза сеянцев сосны обыкновенной разного географического происхождения:

а – Ковдозеро, б – Юшкозеро, в – Поросозеро, при $25~^{\circ}$ С – температуре воздуха зоны теплового закаливания для всех исследуемых вариантов, выращенных при разной кислотности почвенной среды

При этом световые кривые сеянцев сосны из семян различного географического происхождения, судя по их уровню и углу наклона, значительно различались между собой в зависимости от кислотности почвы, но имели общие тенденции с температурными кривыми: по интенсивности нетто-фотосинтеза и величине диапазона светового оптимума. При выходе температуры за пределы зоны оптимума [Дроздов и др., 1984] сила влияния светового фактора на газообмен резко возрастала, а зона оптимума по свету несколько сужалась (рис. 3).

Выводы

Таким образом, проведенные исследования показали, что экофизиологическая характеристика всходов сосны обыкновенной зависит как от их географического происхождения, так и от условий среды их произрастания, в том числе кислотности почвы. Потенциальный максимум нетто-фотосинтеза при естественном содержании в воздухе СО, у интактных растений сосны обыкновенной находился в диапазоне 2,1-6,5 мг СО₂/г.ч. Наибольший уровень видимого фотосинтеза имели всходы, выращенные при кислотности почвы рН 4,5 из семян сосны северотаежной зоны. Температурный оптимум сеянцев расположен в диапазоне 4-30 °C. Наименее теплолюбивы растения сосны, выращенные при рН почвы 6,5 из семян северного происхождения (4-22 °C). Наиболее теплолюбивы (11-30 °C) сеянцы, выращенные при рН почвы 6,5 из семян наиболее южного происхождения. Световой оптимум всходов располагался в диапазоне 200-570 Bт/м², при этом наиболее светолюбивы сеянцы северного происхождения, выращенные при рН почвы $4,5 (290-570 \text{ BT/M}^2).$

Литература

Болондинский В. К. Динамика $\mathrm{CO_2}$ -газообмена побегов сосны обыкновенной в условиях среднетаежной зоны: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 2004. 28 с.

Голикова Г. И., Панченко Л. А., Фридман М. З. Каталог планов второго порядка. М.: МГУ, 1974. Вып. 47. Ч. 1. 387 с.

Голомазова Г. М. Световые и температурные кривые фотосинтеза хвойных древесных пород // Физиология растений. 1981. Т. 28, № 2. С. 263–268.

Дроздов С. Н., Курец В. К. Некоторые аспекты экологической физиологии растений. Петрозаводск: ПетрГУ, 2003. 172 с.

Дроздов С. Н., Курец В. К., Титов А. Ф. Терморезистентность активно вегетирующих растений. Л.: Наука. 1984. 167 с.

Жигунов А. В. Теория и практика выращивания посадочного материала с закрытой корневой системой. СПб.: СПбНИИЛХ, 2000. 146 с.

Иванов А. Ф., Понамарева А. В., Дерюгина Т. Ф. Отношение древесных растений к влажности и кислотности почвы. Минск: Наука и техника, 1966. 231 с.

Курец В. К., Попов Э. Г. Статистическое моделирование связей растение – среда. Л.: Наука, 1991. 152 с.

Куусела К. Динамика бореальных хвойных лесов. Хельсинки: Репола, 1991. 210 с.

Левкина Т. И. К вопросу об отношении сеянцев древесных пород к реакции среды и известкованию почв лесных питомников // Возобновление леса на вырубках и выращивание сеянцев в питомниках. Петрозаводск: Карельское книжное изд-во, 1964. С. 179–203.

Малкина И. С. Фотосинтез сосны обыкновенной // Лесоведение. 1981. № 4. С. 78–89.

Малкина И. С., Цельникер Ю. Л., Яшкина А. М. Фотосинтез и дыхание подроста. М.: Наука, 1970. 183 с.

Молчанов А. Г. Баланс CO_2 в экосистемах сосняков и дубрав в разных лесорастительных зонах. Тула: Гриф и K, 2007. 284 с.

Морозова Р. М., Федорец Н. Г. Современные процессы почвообразования в хвойных лесах Карелии. Петрозаводск: Карельский НЦ РАН, 1992. 282 с.

Суворова Г. Г. Фотосинтез хвойных деревьев в условиях Сибири. Новосибирск: ГЕО, 2009. 195 с.

Тооминг Х. Г. Солнечная радиация и формирование урожая. Л.: Гидрометиздат, 1977. 199 с.

Урманцев Ю. А. Системный подход к проблеме устойчивости растений (на примере исследования зависимости содержания пигментов в листьях фасоли от одновременного действия на нее засухи и засоления) // Физиология растений. 1977. Т. 26, вып. 4. С. 762–777.

Физиология растений / Ред. И. П. Ермакова. М.: Изд. центр Академия, 2005. 635 с.

Фрейберг И. А., Ермакова М. В., Стоценко С. К. Критерии оценки посадочного материала сосны обыкновенной // Лесное хозяйство. 2009. № 2. С. 33–35.

Цельникер Ю. Л. Физиологические основы теневыносливости древесных растений. М.: Наука, 1978. 211 с.

Цельникер Ю. Л. Функциональная и структурная организация фотосинтетического аппарата лесных древесных растений // Труды Всесоюз. совещ. «Эколого-физиологические исследования фотосинтеза и водного режима растений в полевых условиях». Иркутск: Иркутский гос. ун-т, 1983. С. 5–15.

Frank Harry A., Brudvig Gary W. Redox functions of carotinoids in photosynthesis // Biochemistry. 2004. Vol. 43, N 27. P. 8607–8615.

Jentschke G., Drexhage M., Fritz H.W. et al. Does soil acidity reduce subsoil rooting in Norway spruce (*Picea abies*)? // Plant and Soil. 2001.Vol. 237. P. 91–108.

Van Dijk H. F. G., Bienfait H. F. Iron-deficiency chlorosis in Scots pine growing on acid soils // Plant and Soil. 1993. Vol. 153. P. 255–263.

Wei Ai-li, Wang Zhi-min, Xibei Zhi-wuxuebao // Acta bot. Boreali-occident. Sin. 2004. Vol. 24, N 7. P. 1342–1397.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Еркоева Александра Андреевна

младший научный сотрудник Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

тел.: (8142) 762712

Дроздов Станислав Николаевич

главный научный сотрудник, д. б. н., проф. Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: drozdov@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 762706

Холопцева Екатерина Станиславовна

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

эл. почта: holop@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 762712

Erkoeva, Alexandra

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

tel.: (8142) 762712

Drozdov, Stanislav

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

e-mail: drozdov@krc.karelia.ru

tel.: (8142) 762706

Kholopseva, Ekaterina

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

e-mail: holop@krc.karelia.ru

tel.: (8142) 762712

УДК 581.1

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИПИДОВ ЛИСТЬЕВ КАРТОФЕЛЯ В УСЛОВИЯХ ПЕРИОДИЧЕСКОЙ И ДЛИТЕЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ

В. В. Лаврова, М. И. Сысоева, Е. М. Матвеева

Институт биологии Карельского НЦ РАН

Изучено влияние ежесуточных кратковременных и постоянных низкотемпературных воздействий на жирнокислотный состав общих липидов листьев растений картофеля (Solanum tuberosum L., с. Невский). Показано, что как длительные, так и кратковременные снижения температуры приводят к изменениям в жирнокислотном составе общих липидов листьев картофеля. Однако если условия длительной гипотермии вызывают увеличение ненасыщенности жирнокислотного состава липидов за счет диеновых и триеновых жирных кислот (ЖК), то при адаптации растений картофеля к кратковременным перепадам температур ключевая роль принадлежит триеновой кислоте и, соответственно, ω3 десатуразе.

K л ю ч е в ы е с л о в а : *Solanum tuberosum* L., низкая температура, устойчивость, жирные кислоты, ацил-липидные десатуразы.

V. V. Lavrova, M. I. Sysoeva, E. M. Matveeva. LIPID FATTY ACIDS IN POTATO LEAVES UNDER PERIODIC AND LONG-TERM HYPOTHERMIA

We investigated the effect of daily short-term and continuous exposure to low temperatures on the fatty acid composition of total lipids in potato ($Solanum\ tuberosum\ L.,\ cv.\ Nevskiy$) leaves. Both long- and short-term low temperature impacts induced changes in the fatty acid (FA) composition of total lipids in potato leaves. Where long-term hypothermia caused the unsaturatedness of the lipid FA composition to increase owing to diene and triene FA, the key part in the adaptation of potato plants to short-term temperature variations belonged to the triene acid and, hence, to $\omega 3$ desaturase.

Key words: Solanum tuberosum L., low temperature, resistance, fatty acids, acyllipid desaturases.

Введение

Липиды играют важную роль как в формировании устойчивости растений к низким температурам [Чиркова, 1997; Лось, 2005; Lyons, 1973], так и в ответных реакциях растений на биотический стресс [Shahetal, 2005; Wang et al., 2006]. Большинство исследований связано с изучением длительного действия низких закаливающих температур [Нюппиева, 1988; Новицкая и др., 1990; Upchurch, 2008; Zhang, Tian,

2009; Batista-Santos et al., 2011], в то время как данные об изменениях в содержании жирных кислот на широко распространенные в природе кратковременные падения температур в суточном цикле являются единичными [Марковская и др., 2009].

В связи с этим целью настоящей работы было провести сравнительный анализ изменений в содержании жирных кислот общих липидов листьев картофеля в условиях периодической и длительной гипотермии.

Материал и методы

Мини-клубни картофеля (Solanum tuberosum L., с. Невский), полученные в ГНУ «Карельская ГСХОС Россельхозакадемии», проращивали стандартным способом на свету в течение 3 недель, высаживали в пластиковые сосуды с песком при поливе питательным раствором Кнопа с добавлением микроэлементов (рН 5,5-5,6) и выставляли в камеру искусственного климата при температуре 23 °C, фотопериоде (день/ночь) 16/8 ч и освещенности 10 клк. По достижении фазы трех листьев часть растений оставляли при 23 °C (вариант контроль), а остальные - подвергали в течение 6 суток либо ежесуточным снижениям температуры (с 23 до 5 °C) на 2 ч в конце ночного периода (вариант ДРОП, от англ. drop - падение), либо действию постоянной низкой температуры 5 °C (ПНТ). На следующий день после завершения температурных обработок проводили анализ жирнокислотного состава общих липидов листьев растений всех вариантов.

Для анализа жирнокислотного состава общих липидов использовали 3-й полностью развернувшийся лист наиболее развитого побега. Фиксацию растительного материала (1,5 г) осуществляли путем кипячения в изопропаноле в течение 5 мин с добавлением 0,001% антиоксиданта ионола [Fishwick, Wright, 1977]. После упаривания изопропанола липиды экстрагировали смесью хлороформа с метанолом (2:1 по объему) [Bligh, Dyer, 1959].

Определение содержания и состава жирных кислот (ЖК) осуществляли методом газожидкостной хроматографии [Цыдендамбаев, Верещагин, 1980; Пчелкин и др., 2001]. Для этого выделенные липиды подвергали прямому метанолизу в растворе метанола с хлористым ацетилом [Цыганов, 1971]. После охлаждения метиловые эфиры жирных кислот экстрагировали гексаном [Christie, 1993]. Полученные метиловые эфиры жирных кислот анализировали на хроматографе «Кристалл 5000» («Хроматек», Россия) с пламенно-ионизационным детектором в капиллярной колонке ZB-FFAP длиной 50 м, с внутренним диаметром 0,32 мм и толщиной слоя жидкой фазы 0,50 мкм при температуре 225 °C. Идентификацию ЖК осуществляли сравнением хроматографических подвижностей со стандартными ЖК [Jamieson, Reid, 1975]. Количественный анализ проводили при помощи компьютерной программы «Мультихром-Аналитик, v.1.5».

Относительное содержание ЖК определяли в процентах от общего их содержания в исследуемом образце. Для оценки ненасыщенности

ЖК в тканях листьев использовали индекс двойных связей (ИДС) [Lyons et al., 1964]:

ИДС = $\Sigma P_i n_i / 100$,

где P_j – содержание ЖК (%) и n_j – количество двойных связей в каждой кислоте. Также использовали коэффициент ненасыщенности (K) как отношение суммы ненасыщенных ЖК к сумме насыщенных.

Активность ацил-липидных $\omega 9$, $\omega 6$ и $\omega 3$ десатураз, катализирующих введение двойных связей в углеродные цепи олеиновой ($C_{18:1}$), линолевой ($C_{18:2}$) и линоленовой ($C_{18:3}$) кислот, определялась как стероил- (SDR), олеил- (ODR) и линолеил- (LDR) десатуразные отношения, рассчитанные на основании содержания (% от суммы ЖК) компонентов C_{18} , как описано в работах [Jaworski, Stumpf, 1974; Cartea et al., 1998; Алаудинова, Миронов, 2009]:

SDR =
$$(C_{18:1}) / (C_{18:0} + C_{18:1})$$

ODR = $(C_{18:2} + C_{18:3}) / (C_{18:1} + C_{18:2} + C_{18:3})$

LDR = $(C_{_{18:3}})$ / $(C_{_{18:3}}+C_{_{18:2}})$, где $C_{_{18:0}}$, $C_{_{18:1}}$, $C_{_{18:2}}$ и $C_{_{18:3}}$ – процентное от суммы кислот содержание стеариновой, олеиновой, линолевой и линоленовой кислот, соответственно.

Результаты

Анализ жирнокислотного состава общих липидов показал отсутствие влияния как кратковременных, так и длительных низкотемпературных воздействий на суммарное содержание общих липидов, которое во всех исследованных вариантах составляло 27 ± 0,1 мг/г сырой массы. Реакция жирнокислотного состава на низкотемпературные воздействия разной продолжительности проявилась в количественных изменениях отдельных групп жирных кислот. Так, ДРОП-обработка вызвала увеличение доли ненасыщенных ЖК (рис. 1), о чем свидетельствуют повышение в 1,4 раза коэффициента ненасышенности и на 10 % величины индекса двойных связей (ИДС) (рис. 2). Сумма насыщенных ЖК снизилась с 25 до 19 % (рис. 1) за миристиновой (14:0), пальмитиновой (16:0) и стеариновой (18:0) ЖК, причем пальмитиновая осталась преобладающей кислотой (15,2 % от суммы ЖК) (табл. 1). Одновременно с этим сумма ненасыщенных ЖК повысилась с 75 до 81 % (рис. 1). При этом в ненасыщенной фракции ЖК содержание моноеновых кислот снизилось практически в 3 раза, преимущественно за счет олеиновой кислоты (18:1(n-9)), свидетельствуя, тем самым, об активном их превращении в полиеновые, содержание которых возросло с 67,9 до 78,4 % (табл. 1). Следует отметить, что повышение содержания в листьях ЖК с высокой степенью ненасыщенности

у растений при действии кратковременных снижений температуры обусловлено как ЖК типа C_{18} (18:2(n-6) и 18:3(n-3)), так и C_{16} (16:2(n-6) и 16:3(n-3)). Особый интерес представляют данные, свидетельствующие о повышении гексадекатриеновой кислоты (16:3(n-3)). Известно, что эта кислота играет большую роль в холодоустойчивости 16:3-растений, к которым относится картофель [Нюппиева, 1988; Heinz, Roughanetal, 1983], способствуя процессам фотосинтеза при пониженных температурах [Демин, 2010]. При биосинтезе 16:3 ЖК субстратом служат липиды, содержащие 16:2 кислоту. Как следует из полученных результатов, ДРОП-обработка повысила содержание 16:1(n-9) и 16:2(n-6) кислот (табл. 1).

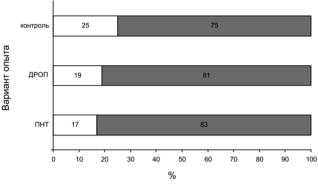


Рис. 1. Содержание (%) насыщенных (□) и ненасыщенных (■) ЖК липидов в листьях растений картофеля при кратковременном (ДРОП) и постоянном (ПНТ) действии низкой закаливающей температуры (5 °C)

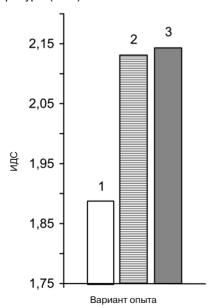


Рис. 2. Изменение показателя индекса двойных связей (ИДС) в листьях растений картофеля при кратковременном (ДРОП) и постоянном (ПНТ) действии низкой закаливающей температуры (5 °C):

1 – контроль, 2 – ДРОП, 3 – ПНТ

Таблица 1. Содержание некоторых жирных кислот (% от суммы ЖК) при кратковременном (ДРОП) и постоянном (ПНТ) действии низкой закаливающей температуры (5 $^{\circ}$ C)

	Bar	риант опыт	га
Жирные кислоты	Контроль	ДРОП	ПНТ
14:00	1,7	1,1*	0,8*
16:00	19,7	15,2*	14,7*
18:00	3,5	1,6*	1,5*
20:00	0,4	0,3	0,4
Сумма насыщенных ЖК	25,2	19,1*	17,3*
16:1(n-9)	0,4	0,6*	0,3
16:1(n-7)	1,1	0,3*	0,1*
18:1(n-9)	4,5	2,2*	2,8*
18:1(n-7)	0,8	0,4*	0,3*
Сумма моноеновых ЖК	6,9	2,6*	3,5*
16:2(n-9)	1,6	1,6	1,6
16:2(n-6)	1,4	1,7*	0,7*
18:2(n-6)	18,7	21,3	24,5
Сумма диеновых ЖК	21,7	24,7*	26,8*
16:3(n-3)	7,6	9,4*	9,0*
18:3(n-3)	38,6	44,3*	43,4*
Сумма триеновых ЖК	46,2	53,7*	52,4*
Сумма ПНЖК	74,8	80,9*	82,7*

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – различия достоверны (р ≤ 0,05) при сравнении с контролем.

Действие постоянной низкой температуры (ПНТ) на соотношение ПНЖК/НЖК (рис. 1) и степень ненасыщенности ЖК (рис. 2) было аналогичным действию ДРОП. Однако ненасыщенность липидов возрастала в основном за счет ЖК типа C₁₈ - 18:2(n-6), 18:3(n-3) и при участии 16:3(n-3) (табл. 1). Следует отметить, что содержание диеновых кислот, а именно линолевой (18:2(n-6)), было выше в данном варианте, чем при действии ДРОП, тогда как уровень триеновых кислот сопоставим для вариантов ПНТ и ДРОП (табл. 1). В отношении кислоты 16:2(n-6) для разных типов низкотемпературной обработки отмечено разнонаправленное изменение: ПНТ в отличие от ДРОП-обработки снижало долю данной ЖК (табл. 1).

Биосинтез кислот типа $C_{_{18}}$ осуществляется с участием ацил-липидных десатураз, а оценка их активности позволяет в определенной мере судить о механизмах синтеза и роли ненасыщенных ЖК в низкотемпературной устойчивости. Оба типа низкотемпературного воздействия повысили активность ω9 (индекс SDR) и ω6 (индекс ODR) десатураз, ответственных за введение в углеводородную цепь первой и второй двойной связи, соответственно (табл. 2). В то же время реакция ω3 десатуразы (индекс LDR), которая обусловливает введение третьей двойной связи, в ответ на действие ДРОП и ПНТ была разнонаправленной. Кратковременная низкотемпературная обработка вызвала небольшое, но достоверное повышение активности, тогда как постоянное воздействие низкой температуры, наоборот, способствовало ее снижению (табл. 2).

Таблица 2. Показатели индексов, отражающих активность ω9 (SDR), ω6 (ODR) и ω3 (LDR) десатураз, при кратковременном (ДРОП) и постоянном (ПНТ) действии низкой закаливающей температуры (5 °C)

Милокоги	Вариант опыта					
Индексы	Контроль	ДРОП	ПНТ			
SDR	0,56	0,58*	0,65*			
ODR	0,93	0,97*	0,96*			
LDR	0,67	0,68*	0,64*			

Обсуждение

Результаты нашего исследования показали, что не только длительные, но и кратковременные периодические колебания температуры вызывают увеличение доли ненасыщенных ЖК, преимущественно за счет полиеновых. Однако при ДРОП-обработке, по сравнению с действием ПНТ, больший вклад в ненасыщенность липидов вносят триеновые кислоты - гексадекатриеновая и линоленовая, причем субстратом для ацил-липидных десатураз при их биосинтезе могут являться не только ЖК типа С18 (как в случае ПНТ), но и ЖК типа $C_{_{16}}$. Установленные различия жирнокислотного состава при ДРОП и ПНТ, по-видимому, отражают существование в растениях картофеля разных регуляторных механизмов в ответ на часто встречающиеся в природе кратковременные перепады температур в суточном цикле и постоянное действие низкой температуры в течение длительного времени. что согласуется с недавно высказанным предположением о различном отклике растений на биохимическом уровне на эти два типа температурного воздействия [Zheng et al., 2011].

Ключевая роль в адаптации растений картофеля к кратковременным перепадам температур принадлежит линоленовой кислоте и, соответственно, ω3 десатуразе, поскольку повышение ее активности приводит к превращению линолевой кислоты в линоленовую. Это находит подтверждение в работе [Марковская и др., 2009], свидетельствующей о важной роли линоленовой кислоты в повышении уровня ненасыщенности липидов семядольных листьев растений огурца при ДРОП-обработке. Исходя из полученных результатов, адаптация к постоянной низкой закаливающей температуре достигается в основном за счет увеличения активности ω6 десатуразы, ответственной за биосинтез линолевой кислоты, и в меньшей степени – ω3 десатуразы.

Известно, что уровень диеновых и триеновых кислот во многом определяет устойчивость растений к длительному действию пониженных температур [Hugly, Somerville, 1992; Nishida, Murata, 1996; Liu et al., 2008]. Ранее на-

ми было показано, что низкотемпературные обработки повышают холодоустойчивость растений, причем уровень устойчивости после кратковременных низкотемпературных воздействий в 5-6 раз выше, чем после постоянного действия низкой температуры [Сысоева и др., 2011], и более длительное время сохраняется на высоком уровне в последействии [Sysoeva et al., 2005]. Одной из причин такого высокого уровня холодоустойчивости является активация COR гена ci7 в сочетании с повышенным функционально активным состоянием, характеризующимся стимуляцией метаболических процессов, увеличением продуктивности и ускорением развития [Лаврова и др., 2011]. Наряду с этим в повышение холодоустойчивости, по всей видимости, вносит вклад и обогашение ненасышенными триеновыми кислотами липидного состава, поскольку данные кислоты обеспечивают поддержание процесса фотосинтеза за счет сохранения структурнофункциональной стабильности мембран хлоропластов и прохождение их нормального биогенеза [Hugly, Somerville, 1992; Kodama et al., 1994]. Кроме того, ненасыщенность ЖК защищает ФСІІ от низкотемпературного фотоингибирования [Nishida, Murata, 1996; Liu et al., 2008]. ДРОП-обработка не оказывает влияния на функциональное состояние ФСІІ, в том числе и электронный транспорт, сохраняя значения основных параметров флуоресценции на уровне контроля [Сысоева и др., 2010]. Вероятно, это может быть связано с повышением уровня триеновых кислот, поскольку известно, что они участвуют в поддержании электронного транспорта [Hugly, Somerville, 1992]. Coxpaнение высокого уровня ЖК также способствует функциональной поддержанию активности хлоропластов. Кроме того, наблюдаемые нами изменения в жирнокислотном составе общих липидов, вызванные низкотемпературными обработками, в частности низкое содержание 18:1(n-9) кислоты при высоком уровне 18:2(n-6) и 18:3(n-3) кислот, могут способствовать активации Я генов (генов устойчивости) и развитию реакции сверхчувствительности [Chandra-Shekara et al., 2007; Upchurch, 2008], а также принимать участие в формировании системной приобретенной устойчивости за счет активации салицил-зависимых защитных PR генов [Upchurch, 2008]. Нами, действительно, было показано ранее [Сысоева и др., 2011], что кратковременные и длительные низкотемпературные воздействия вызывают экспрессию R гена в листьях растений картофеля, способствуя повышению устойчивости к заражению фитопаразитом.

Таким образом, как длительные, так и кратковременные снижения температуры приводят к изменениям в жирнокислотном составе общих липидов листьев картофеля. Однако если условия длительной гипотермии вызывают увеличение ненасыщенности жирнокислотного состава липидов за счет диеновых и триеновых ЖК, то при адаптации растений картофеля к кратковременным перепадам температур ключевая роль принадлежит триеновым кислотам и, соответственно, ω3 десатуразе.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 10-04-00097 а).

Литература

Алаудинова Е. В., Миронов П. В. Липиды меристем лесообразующих хвойных пород центральной Сибири в условиях низкотемпературной адаптации. 2. Особенности метаболизма жирных кислот фосфолипидов меристем Larix sibirica Ledeb., Picea obovata L. и Pinus sylvestris L // Химия растительного сырья. 2009. № 2. С. 71–76.

Демин И. Н. Участие 12-ацил-липидной десатуразы в формировании устойчивости растений картофеля к гипотермии: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2010. 25 с.

Лаврова В. В., Сысоева М. И., Шерудило Е. Г. и др. Экспрессия гена ci7 в листьях картофеля при действии кратковременных ежесуточных снижений температуры // Труды Карельского НЦ РАН. 2011. № 3. С. 73–77.

Лось Д. А. Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений // Вестник РАН. 2005. Т. 75. С. 338-345.

Марковская Е. Ф., Шерудило Е. Г., Рипатти П. О., Сысоева М. И. Роль липидов в устойчивости семядольных листьев огурца к постоянному и кратковременному периодическому действию низкой закаливающей температуры // Труды Карельского НЦ РАН. 2009. № 3. С. 67–74.

Новицкая Г. В., Сальникова Е. Б., Суворова Т. А. Изменение ненасыщенности жирных кислот липидов растений озимой и яровой пшеницы в процессе закаливания // Физиология и биохимия культ. растений. 1990. Т. 22. С. 257–264.

Нюппиева К. А. Состав и содержание липидов в различных органах картофеля при действии закаливающей и повреждающей температуры // Влияние факторов среды и физиологически активных веществ на продуктивность и устойчивость растений / Под ред. С. Н. Дроздова, А. Ф. Титова. Петрозаводск, 1988. С. 98–113.

Пчелкин В. П., Кузнецова Э. И., Цыдендамбаев В. Д., Верещагин А. Г. Определение позиционно-видового состава запасных триацилглицеринов растений медом неполного химического деацилирования // Физиология растений. 2001. № 48. С. 809–816.

Сысоева М. И., Лаврова В. В., Марковская Е. Ф. и др. Влияние ежесуточных кратковременных снижений температуры на состояние фотосинтетического

аппарата растений картофеля в условиях заражения фитопаразитической нематодой // Труды Карельского НЦ РАН. 2010. № 2. С. 41–46.

Сысоева М. И., Лаврова В. В., Матвеева Е. М. и др. Кросс-адаптация растений картофеля к действию низких температур и заражению картофельной цистообразующей нематодой // Физиология растений. 2011. Т. 58, № 6. С. 1–6.

Чиркова Т. В. Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям // Соросовский образовательный журнал. 1997. № 9. С. 12–17.

Цыганов Э. П. Метод прямого метилирования липидов после ТСХ без элюирования с силикагеля // Лабораторное дело. 1971. № 8. С. 490–493.

Цыдендамбаев В. Д., Верещагин А. Г. Исследование липидов корня сахарной свеклы в связи с функцией сахаронакопления. 2. Экстрагируемое ацилсодержащих липидов паренхимы покоящегося корня // Физиология растений. 1980. № 27. С. 778–784.

Batista-Santos P., Lidon F. C., Fortunato A. et al. Cold impact on photosynthesis in genotypes of *Coffea* spp. – photosystems sensitivity, photoprotective mechanisms and gene protection // J. Plant Physiol. 2011. Vol. 168. P. 792–806.

Bligh E. G., Dyer W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Canad. J. Biochem. Physiol. 1959. Vol. 37. P. 911–919.

Cartea M. E., Migdal M., Galle A. M. et al. Comparison of sense and antisense methodologies for modifying the fatty acid composition of *Arabidopsis thaliana* oilseed // Plant Science. 1998. Vol. 136. P. 181–194.

Chandra-Shekara A. C., Venugopal S. C., Barman S. R. et al. Plastidial fatty acid levels regulate resistance gene-dependent defense signaling in *Arabidopsis* // PNAS. 2007. Vol. 104, N 17. P. 7277–7282.

Christie W. W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis // Advances in lipid methodology – Two / Ed. Christie W. W. Dundee, 1993. P. 69–111.

Fishwick M. J., Wright A. J. Comparison of methods for the extraction of plant lipids // Phytochemistry. 1977. Vol. 16. P. 1507–1510.

Heinz E., Roughan P. G. Siniilarities and differences in lipid Metabolism of chloroplastsisolated from 18:3 and 16:3 plants // Plant Physiol. 1983. Vol. 72. P. 273–279

Hugly S., Somerville C. R. A role of membrane lipid polyunsaturation in chloroplast biogenesis at low temperature // Plant Physiol. 1992. Vol. 99. P. 197–202.

Jamieson G. R., Reid E. H. The fatty acid composition of fern lipids // Phytochemistry. 1975. Vol. 14. P. 2229–2232.

Jaworski J. G., Stumpf P. K. Fat metabolism in higher plants. Properties of a soluble stearyl-acyl carrier protein desaturase from maturing *Carthamus tinctorius* // Arch. Biochem. Biophys. 1974. Vol. 162. P. 158–165.

Kodama H., Hamada T., Horiguchi G. et al. Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast ω-3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco // Plant Physiol. 1994. Vol. 105. P. 601–605.

Liu X.-Y., Li B., Yang J.-H. et al. Overexpression of tomato chloroplast omega-3 fatty acid desaturase gene alleviates the photoinhibition of photosystems 2 and 1 under chilling stress // Photosynthetica. 2008. Vol. 46, N 2. P. 185–192.

Lyons J. M. Chilling injury in plants // Annu. Rev. Plant Physiol. 1973. Vol. 24. P. 445–466.

Lyons J. M., Wheaton T. A., Pratt H. K. Relationship between the physical nature of mitochondrial membranes and chilling sensitivity in plant // Plant Physiology. 1964. Vol. 39. P. 262–268.

Nishida I., Murata N. Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: The Crucial Contribution of Membrane Lipids // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1996. Vol. 47. P. 541–568.

Shah J. Lipids, Lipases, and Lipid-Modifying Enzymes in Plant Disease Resistance // Annual Review of Phytopathology. 2005. Vol. 43. P. 229–260.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Лаврова Виктория Витальевна

аспирант

Институт биологии Карельского научного центра 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. Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: sysoeva@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 762706

Матвеева Елизавета Михайловна

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

эл. почта: matveeva@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 762706

Sysoeva M. I., Sherudilo E G., Markovskaya E. F. et al. Temperature drop as a tool for cold tolerance increment in plants // Plant Growth Regul. 2005. Vol. 46. P. 189–191.

Upchurch R. G. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress // Biotechnol Lett. 2008. Vol. 30. P. 967–977.

Wang X., Li W., Li M., Welti R. Profiling lipid changes in plant response to low temperatures // Physiologia Plantarum. 2006. Vol. 126. P. 90–96.

Zhang C., Tian S. Crucial contribution of membrane lipids unsaturation to acquisition of chilling-tolerance in peach fruit stored at 0 $^{\circ}$ C // Food Chemistry. 2009. Vol. 115. P. 405–411.

Zheng G., Tian B., Zhang F. et al. Plant adaptation to frequent alternations between high and low temperatures remodeling of membrane lipids and maintenance of unsaturation levels // Plant, Cell Env. 2011, Vol. 34, P. 1431–1442.

Lavrova, Victoria

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

e-maii: sysoeva@krc.kareiia.ru

tel.: (8142) 762706

Matveeva, Elizaveta

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

e-mail: matveeva@krc.karelia.ru

tel.: (8142) 762706

УДК 581.154+575.224.46: 582.542.1

ПРИСПОСОБЛЕННОСТЬ РАСТЕНИЙ *FESTUCA PRATENSIS* HUDS. С СУПРЕССИРОВАННОЙ ХЛОРОФИЛЛДЕФЕКТНОСТЬЮ И ДЕЙСТВИЕ СТАБИЛИЗИРУЮЩЕГО ОТБОРА

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

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Выявлены закономерности формирования компонентов приспособленности (выживаемости и плодовитости) у растений овсяницы луговой с супрессированной хлорофиллдефектностью, которые связаны с механизмами фенотипических изменений окраски проростков в ювенильной стадии развития при ресупрессии (репопуляция, реверсия) и их скоростью (быстрая, медленная).

Ключевые слова: *Festuca pratensis* Huds., компоненты приспособленности, супрессированная хлорофиллдефектность, стабилизирующий отбор.

O. N. Lebedeva, A. F. Titov, T. S. Nikolaevskaya. ADAPTATION OF *FESTUCA PRATENSIS* HUDS. PLANTS WITH SUPPRESSED CHLOROPHYLL DEFICIENCY, AND STABILIZING NATURAL SELECTION

We investigated the formation patterns of the components of fitness (survival and fecundity) in meadow fescue plants with suppressed chlorophyll deficiency, which are associated both with the mechanisms of phenotypic changes in the color of seedlings at the juvenile stage of their development under resuppression (repopulation, reversion) and with their rate (fast, slow).

Key words: Festuca pratensis Huds., components of fitness, suppressed chlorophyll deficiency, adaptation, stabilizing natural selection.

Введение

Эволюция стратегии выживаемости включает в себя множество генетических механизмов, благоприятствующих увеличению численности популяции и повышению ее приспособленности. В этом отношении хорошо известны эффекты доминантности, гетерозиготности, полиплоидии, компенсаторного комплекса генов [Алтухов, 2003; Хедрик, 2003]. В меньшей степени изучены генетическая супрессия отдельных генов и генных систем, а также регуляторных генов и псевдогенов, селективная роль которых в эволюционном процессе активно обсу-

ждается [Суходолец, 1991, 1995, 2000; Инге-Вечтомов, 2004]. Однако, опираясь на общие генетические закономерности, иногда невозможно объяснить часто наблюдаемые случаи высокой устойчивости (или чувствительности) и приспособленности биологических систем, которые сравнительно легко переживают естественные и антропогенные нагрузки (световой, температурный, водный, солевой и другие стрессы), или, напротив, оставляют малочисленное и слабо жизнеспособное потомство в достаточно комфортных условиях. Основной экспериментальный подход в таких исследованиях базируется на анализе маркерных при-

знаков, связанных не только с нормальными, но также и с дефектными генетическими системами. Изучение последних вносит наибольший вклад в познание биологических механизмов выживаемости как в процессе онтогенетического развития, так и в сфере эволюционных изменений. У растений, важнейшим свойством которых является фотосинтез, наиболее информативным может быть изучение различного рода хлорофиллдефектности: от ядерных пигментных мутаций, консервативно блокирующих те или иные звенья биохимического синтеза пигментов, до лабильного изменения структуры хлоропласта в результате его повышенной термо- или светочувствительности.

Известно, что генетическая основа температурозависимой хлорофиллдефектности базируется на действии генов-супрессоров, которые способствуют сохранению первичных мутаций от действия отбора и расширению генетического разнообразия. Обладая широкой плейотропией, они могут повышать адаптивные свойства и выживаемость индивидуумов и популяций [Инге-Вечтомов и др., 1994; Инге-Вечтомов, 2004]. Учитывая, что роль супрессорных систем у высших растений изучена очень слабо, использование генетических особенностей объекта исследования Festuca позволит pratensis Huds. сформулировать стратегии выживаемости и экологической устойчивости высших растений с генетическим грузом. Такие знания расширяют теоретические представления о роли супрессорных мутаций в поддержании адаптивного потенциала популяций растений, сохраняющих высокий уровень естественного генетического груза, и показывают их селективную ценность.

Целью настоящей работы было изучение на примере растений овсяницы луговой с супрессированной хлорофиллдефектностью закономерностей формирования компонентов приспособленности (выживаемости и плодовитости), которые связаны как с механизмами фенотипических изменений окраски проростков в ювенильной стадии развития при ресупрессии (репопуляция, реверсия), так и с их скоростью (быстрая, медленная).

Материал и методы

Объектом исследования является представитель многолетних злаков – Festuca pratensis Huds. (Poaceae). Выбор объекта в качестве модельного при изучении механизмов выживаемости у многолетних перекрестноопыляющихся злаков с естественным и индуцированным генетическим грузом обусловлен целым рядом

его особенностей и достоинств. Важная биологическая особенность ряда видов многолетних злаков (овсяница луговая, овсяница красная, ежа сборная, тимофеевка луговая) состоит в том, что у них обнаружена система температурозависимой депигментации проростков, окраска листа которых восстанавливается до зеленой (нормальный фенотип) после изменения экстремальных температурных условий культивирования на оптимальные [Land et al., 1971; Олимпиенко и др., 1976; Титов, Олимпиенко, 1976; Титов и др., 1978]. Генетическая основа температурозависимой хлорофиллдефектности базируется на действии генов-супрессоров и сопровождается комплексом компенсаторных эффектов, распространяющихся на широкий спектр анатомических, морфологических и физиологических признаков [Олимпиенко и др., 2005; Лебедева и др., 2007].

Для выявления мутантных, дефектных по хлорофиллу растений семена Festuca pratensis Huds. проращивали на фильтровальной бумаге в течение 10 дней в фитотроне при круглосуточном освещении (96–130 μ mol m⁻² s⁻¹) и температуре 35 °C. В массиве проростков регистрировали зеленые и депигментированные растения. При последующем проращивании в течение 4 суток и температуре 25 °C часть проростков восстанавливали полностью или частично зеленую окраску листа. Маркированные по хлорофиллдефектности и восстановлению пигментации растения-ревертанты культивировали на протяжении 6 лет в полевых условиях в виде клонов (8 растений в клоне). При описании хлорофиллдефектных фенотипов использовали общепринятые для хлорофилльных мутаций обозначения [Калам, Орав, 1974]: светло-зеленые (viridsi, V), желтые (xantha, X), белые (albian, A). Комбинированные фенотипы обозначались как зелено-светло-зеленые (NV), светло-зелено-зеленые (VN), светло-зеленожелтые (VX), светло-зелено-белые (VA), желтозеленые (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.

Оценку приспособленности проводили на основе анализа выживаемости и плодовитости растений [Тимофеев-Ресовский и др., 1977; Алтухов, 2003]. Выживаемость исследовали на разных этапах онтогенетического развития растений (фертильность пыльцы, фертиль-

ность соцветия, всхожесть семян, доля выживших проростков, доля растений, достигших репродуктивной фазы развития) и вычисляли общую выживаемость путем умножения долей каждого показателя. Плодовитость особей оценивали на основе показателей массы семян на растение и массы 1000 семян.

Приспособленность рассчитывали как произведение общей выживаемости и плодовитости по формуле:

$$W = v \cdot \kappa, \tag{1}$$

где v – выживаемость, κ – плодовитость, W – приспособленность в долях относительно w-type или контрольной популяции.

Элиминирующее действие отбора рассчитывали по формуле:

$$S = 1 - W, \tag{2}$$

где S – показатель элиминирующего отбора.

Для оценки действия естественного отбора (стабилизирующей формы) вычисляли среднюю арифметическую, а также разность между средним и конкретным значением соответственно для каждого признака. Полученные ряды разностей ранжировали. По диаграммам рядов разностей от средней вычисляли тренды (линии рассеивания) и по углу их наклона (крутизны) устанавливали степень различий между группами индивидуумов (особей) в отношении действия стабилизирующего отбора. При этом использовали формулу:

$$y = a + bx, (3)$$

где y – разность между средним и конкретным значением признака; a – значение пересечения линии тренда с осью Y; b – tg угла наклона линии тренда, x – номер ранга особи. Отклонения от средних в большинстве случаев значимо отличались друг от друга при p < 0,05, что вместе с высокими значениями коэффициента детерминации позволяет считать результаты статистически достоверными. Все результаты обработаны с помощью общепринятых методов вариационной статистики [Зайцев, 1984].

Результаты и обсуждение

Восстановление различных фенотипических изменений у растений происходит различными путями – через реверсию и репопуляцию. В общих чертах, реверсия – это восстановление изменений (в нашем случае окраски листа) у мутантного организма до дикого типа, которое осуществляется в результате перехода мутировавшего гена в ген исходного или дикого типа (обратная, или возвратная, мутация). Репопуляция выражается в замещении пула поврежденных клеток неповрежденными, деление которых происходит после прекращения действия по-

вреждающего фактора [Гродзинский, 1989]. Полагают, что это процесс функционирования генетически детерминированной системы, возникшей в процессе эволюции и обеспечивающей приспособительную реакцию семени к изменению внешних условий [Копdo, 1988]. В отличие от ферментативной репарации ДНК, которая часто бывает неполной, репопуляция всегда приводит к полной элиминации повреждения. Важно, что ген-супрессор лишь частично подавляет действие мутантного гена, и это существенно отражается на уровне приспособленности и ее компонентов – выживаемости и репродуктивной способности растений с супрессированной хлорофиллдефектностью.

В ходе экспериментов было обнаружено, что у хлорофиллдефектных растений овсяницы луговой система супрессии хлорофиллдефектности оказалась мультивалентной. Ресупрессия в период температурной релаксации происходит множественными альтернативными путями: быстро – медленно; через репопуляцию клеток базальной части проростка или реверсию с использованием физиологических ресурсов для восстановления структуры хлоропластов и синтеза пигментов. Возможны различные сочетания скорости и механизмов восстановления (быстрая реверсия – медленная реверсия и быстрая репопуляция - медленная репопуляция). Еще одной феноменологической чертой температурозависимой депигментации является тот факт, что восстановление может протекать двумя путями: каноническое восстановление (от окраски проростка с более выраженной депигментацией к менее выраженной) в 1-2 этапа и неканоническое (часто с усилением хлорофиллдефектности или с фенотипическими повторениями на первых этапах восстановления, зеленая окраска проявляется у последующих листьев) и только медленное (табл. 1).

Таблица 1. Фенотипический спектр проростков Festuca pratensis в зависимости от скорости и механизма восстановления функции гена-супрессора (температура проращивания семян 25 °C)

Фенотип проростка
V>N, X>N, X>V, A>N, A>V
V>V>N, X>X>N, A>A>N
V>X>N, X>A>N
VN>VN, XN>XN, XV>XV
VN>N, $XN>N$, $XV>N$,
XV>XN
V>VN, X>XN, X>XV,
A>AN, A>AV
V>XN>N, X>AV>N,
X>AN>N

Примечание. Здесь и в табл. 2–5: сокращенные названия хлорофиллдефектных фенотипов обозначены в разделе «Материал и методы».

Формирование компонентов приспособленности растения (выживаемость и плодовитость) оказалось закономерно связанным со скоростью и механизмами восстановления функции гена-супрессора.

Так, общая выживаемость растений с фенотипами viridis и xantha в 2-2,5 раза выше при репопуляции (медленной и быстрой соответственно) по сравнению с реверсией. Плодовитость растений с этими фенотипами, напротив, выше в 1,5-2,5 раза при реверсии (медленной и быстрой соответственно). У растений с фенотипом albina и выжи-

ваемость (в 7,5 раза), и плодовитость выше при медленной репопуляции по сравнению с быстрой и особенно медленной реверсией. При этом выживаемость растений с фенотипом albina при медленной репопуляции в 1,5–2 раза выше, чем у растений w-type и с фенотипами viridis и xantha (табл. 2–5). Различия в скорости восстановления хлорофилльного дефекта выявлены только для растений с фенотипом albina: при медленной реверсии общая выживаемость снижена в 1,6 раза по сравнению с быстрой реверсией (табл. 2–5).

Таблица 2. Выживаемость, плодовитость и приспособленность растений Festuca pratensis с супрессированной хлорофиллдефектностью, различающихся скоростью и механизмом восстановления пигментации при ресупрессии (быстрое восстановление фенотипов проростков к w-type путем репопуляции)

Признак	w-type	VN>VN	XN>XN, XV>XV	AV>AV
Фертильность пыльцы	$0,90 \pm 0,01$	$0,70 \pm 0,02$	0.84 ± 0.02	-
Доля проросших семян	$0,62 \pm 0,05$	$0,91 \pm 0,02$	0.86 ± 0.07	_
Доля выживших проростков	$0,91 \pm 0,03$	0.88 ± 0.04	$0,99 \pm 0,04$	
Доля жизнеспособных проростков	$0,49 \pm 0,05$	$0,39 \pm 0,08$	$0,35 \pm 0,06$	-
Доля растений, достигших репродуктивного				
развития	0,96	0,97	1,00	-
Общая выживаемость	0,370	0,208	0,247	-
Масса семян на растение	11,76 ± 1,56	$6,82 \pm 1,12$	6,16 ± 1,28	-
Масса 1000 семян	$1,94 \pm 0,03$	$1,93 \pm 0,07$	$2,07 \pm 0,1$	_
Плодовитость растения	6074	3527	2967	-
Относительная выживаемость	1	0,562	0,669	-
Относительная плодовитость	1	0,581	0,488	-
Относительная приспособленность	1	0,326	0,327	_
Интенсивность элиминирующего отбора		0,674	0,673	_

Примечание. Здесь и в табл. 3–5: стандартизованные величины общей выживаемости – v, плодовитости – κ ; приспособленности – W; интенсивности элиминирующего отбора – S.

Таблица 3. Выживаемость, плодовитость и приспособленность растений Festuca pratensis с супрессированной хлорофиллдефектностью, различающихся скоростью и механизмом восстановления пигментации при ресупрессии (медленное восстановление фенотипов проростков к w-type путем репопуляции)

Признак	w-type	V>VN	X>XN (XV)	A>AN (AV)
Фертильность пыльцы	0.90 ± 0.01	0.82 ± 0.02	0.86 ± 0.02	0,93 ± 0,01
Доля проросших семян	0.62 ± 0.05	0.92 ± 0.02	0.90 ± 0.07	0.88 ± 0.06
Доля выживших проростков	0.95 ± 0.02	0.92 ± 0.01	0.97 ± 0.02	0.87 ± 0.08
Доля жизнеспособных проростков	$0,49 \pm 0,10$	0.49 ± 0.10	0.33 ± 0.10	0.65 ± 0.09
Доля растений, достигших репродуктивного	, , , , , ,	-,, -	-,,-	-,
развития	0.96	1,00	0.97	1,00
Общая выживаемость	0,370	0,351	0,251	0,526
Масса семян на растение	11,76 ± 1,56	8,40 ± 1,87	7,48 ± 1,45	7,21 ± 1,23
Масса 1000 семян	1,94 ± 0,03	2.0 ± 0.11	1,94 ± 0,08	2,15 ± 0,08
Плодовитость растения	6074	4191	3862	3350
Относительная выживаемость	1	0,950	0,678	1,423
Относительная плодовитость	1	0,690	0,636	0,552
Относительная приспособленность	1	0,656	0,432	0,785
Интенсивность элиминирующего отбора		0,344	0,568	0,215

Таблица 4. Выживаемость, плодовитость и приспособленность растений Festuca pratensis с супрессированной хлорофиллдефектностью, различающихся скоростью и механизмом восстановления пигментации при ресупрессии (быстрое восстановление фенотипов проростков к w-type путем реверсии)

Признак	w-type	V>N	X>N	A>N
Фертильность пыльцы	$0,90 \pm 0,01$	$0,92 \pm 0,01$	0.85 ± 0.01	$0,91 \pm 0,04$
Доля проросших семян	$0,62 \pm 0,05$	$0,40 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,06$	$0,59 \pm 0,07$
Доля выживших проростков	$0,91 \pm 0,04$	$0,91 \pm 0,02$	$0,71 \pm 0,03$	$0,79 \pm 0,02$
Доля жизнеспособных проростков	$0,49 \pm 0,05$	$0,55 \pm 0,10$	$0,40 \pm 0,07$	$0,49 \pm 0,02$
Доля растений, достигших				
репродуктивного развития	0,96	0,94	0,97	1,00
Общая выживаемость	0,370	0,173	0,106	0,208
Масса семян на растение	11,76 ± 1,56	$16,87 \pm 0,00$	$13,25 \pm 2,17$	$5,83 \pm 0,76$
Масса 1000 семян	$1,94 \pm 0,03$	$1,82 \pm 0,03$	$2,20 \pm 0,05$	$1,90 \pm 0,03$
Плодовитость растения	6074	9293	6036	3066
Относительная выживаемость	1	0,469	0,286	0,562
Относительная плодовитость	1	1,530	0,994	0,505
Относительная приспособленность	1	0,717	0,284	0,284
Интенсивность элиминирующего отбора		0,283	0,716	0,716

Таблица 5. Выживаемость, плодовитость и приспособленность растений Festuca pratensis с супрессированной хлорофиллдефектностью, различающихся скоростью и механизмом восстановления пигментации при ресупрессии (медленное восстановление фенотипов проростков к w-type путем реверсии)

Признак	w-type	V>V	X>X	A>A
Фертильность пыльцы	$0,90 \pm 0,01$	$0,94 \pm 0,01$	$0,90 \pm 0,01$	$0,54 \pm 0,02$
Доля проросших семян	$0,62 \pm 0,05$	$0,48 \pm 0,01$	$0,53 \pm 0,09$	$0,26 \pm 0,05$
Доля выживших проростков	$0,91 \pm 0,04$	0.74 ± 0.05	$0,67 \pm 0,06$	$1,00 \pm 0,02$
Доля жизнеспособных проростков	$0,49 \pm 0,05$	$0,42 \pm 0,15$	$0,45 \pm 0,07$	$0,62 \pm 0,03$
Доля растений, достигших				
репродуктивного развития	0,96	0,84	0,92	0,82
Общая выживаемость	0,370	0,118	0,133	0,071
Масса семян на растение	11,76 ± 1,56	12,44 ± 3,21	$8,81 \pm 1,77$	$4,57 \pm 0,81$
Масса 1000 семян	$1,94 \pm 0,03$	$2,14 \pm 0,02$	$2,06 \pm 0,04$	$1,97 \pm 0,09$
Плодовитость растения	6074	5813	4277	2320
Относительная выживаемость	1	0,319	0,359	0,193
Относительная плодовитость	1	0,957	0,704	0,382
Относительная приспособленность	1	0,305	0,253	0,074
Интенсивность элиминирующего отбора		0,695	0,747	0,926

Показатели относительной выживаемости и плодовитости растений с супрессированной хлорофиллдефектностью проявили фенотипическую зависимость экспрессии признака. Максимальные значения относительной выживаемости для растений всех фенотипических групп выявлены при медленной репопуляции, а минимальные - при медленной реверсии. Относительная плодовитость растений с фенотипом viridis характеризуется максимальными значениями при быстрой и медленной реверсии, с фенотипом xantha – при быстрой реверсии и с фенотипом albina – при медленной репопуляции. Максимальные значения относительной приспособленности растений с фенотипом viridis установлены при быстрой реверсии, с фенотипами xantha и albina - при медленной репопуляции.

Различия между механизмами восстановления пигментации проростков при ресупрессии по приспособленности растений с фенотипом

хаптhа выражены в меньшей степени (в 1,7 раза), чем с фенотипами viridis (в 2,4 раза) и albina (в 10,6 раза). Этот эффект связан, как будет показано ниже, прежде всего с жестким давлением стабилизирующего отбора в отношении признаков растений, формирующих их приспособленность. Выявлен компенсаторный эффект (повышение компонентов приспособленности по сравнению с w-type) по относительной выживаемости у растений с фенотипом albina (в 1,4 раза) при медленной репопуляции и по относительной плодовитости у растений с фенотипами viridis (в 1,5 раза) при быстрой реверсии.

Оценка действия естественного отбора (стабилизирующей его формы) была проведена в отношении признаков, формирующих выживаемость и плодовитость, на основе анализа ранжированных отклонений от средних арифметических их значений. Установлено, что интенсивность действия стабилизирующего

отбора определяется как исследуемым признаком (компонентом приспособленности), так и хлорофиллдефектным фенотипом растений и в меньшей степени механизмами фенотипических превращений окраски проростков при ре-

супрессии (табл. 6). Сильное давление стабилизирующего отбора выявлено для фертильности пыльцы, для выживших и жизнеспособных проростков и значительно более низкое – для массы семян на растение и массы 1000 семян.

Таблица 6. Интенсивность стабилизирующего отбора в отношении компонентов приспособленности растений *Festuca pratensis* с супрессированной хлорофиллдефектностью, различающихся скоростью и механизмом восстановления пигментации при ресупрессии

Помочем	Интенсивность стабилизирующего отбора			
Признак	1	2	3	4
Бы	страя репопул	іяция		
Фертильность пыльцы		viridis	w-type	xantha
Всхожесть семян		w-type	viridis	xantha
Доля выживших проростков		viridis	xantha	w-type
Доля жизнеспособных проростков		w-type	viridis	xantha
Масса семян на растение		viridis	xantha	w-type
Масса 1000 семян		w-type	xantha	viridis
Мед	ленная репопу	уляция		
Фертильность пыльцы	viridis	w-type	albina	xantha
Всхожесть семян	albina	w-type	viridis	xantha
Доля выживших проростков	viridis	w-type	xantha	albina
Доля жизнеспособных проростков	viridis	w-type	albina	xantha
Масса семян на растение	viridis	albina	w-type	xantha
Масса 1000 семян	albina	viridis	w-type	xantha
Б	ыстрая ревер	сия		
Фертильность пыльцы	xantha	w-type	albina	viridis
Всхожесть семян	albina	w-type	viridis	xantha
Доля выживших проростков	viridis	albina	w-type	xantha
Доля жизнеспособных проростков	albina	viridis	w-type	xantha
Масса семян на растение	viridis	albina	w-type	xantha
Масса 1000 семян	albina	w-type	xantha	viridis
Me	едленная реве	рсия		
Фертильность пыльцы	albina	w-type	xantha	viridis
Всхожесть семян	albina	w-type	viridis	xantha
Доля выживших проростков	viridis	albina	w-type	xantha
Доля жизнеспособных проростков	albina	viridis	w-type	xantha
Масса семян на растение	viridis	albina	w-type	xantha
Масса 1000 семян	albina	w-type	xantha	viridis

Примечание. 1-4 - степени интенсивности стабилизирующего отбора от слабой к сильной.

Сравнительный анализ интенсивности стабилизирующего отбора у растений трех фенотипических по хлорофиллдефектности групп показал, что его давление, как правило, наиболее сильно выражено у растений с фенотипом xantha и не зависит ни от скорости, ни от механизма восстановления хлорофилльного дефекта, тогда как для растений с фенотипами viridis и albina механизм и скорость восстановления хлорофилльного дефекта имеет значение в проявлении действия стабилизирующего отбора (табл. 6). Так, например, действие стабилизирующего отбора в отношении фертильности пыльцы наименее выражено для растений с фенотипом viridis при быстрой репопуляции, а с фенотипом albina - при медленной реверсии. Как видно, различия в относительной приспособленности растений с супрессированной хлорофиллдефектностью зависят от действия стабилизирующего отбора в отношении формирующих ее компонентов (выживаемость и плодовитость).

Таким образом, как показывают наши многолетние исследования, генетическая супрессия, выполняющая охранную функцию, подавляет функциональную активность генетически дефектных и не отселектированных естественным отбором генных локусов и, следовательно, выполняет функцию системы, обеспечивающей эффективную защиту. Восстановление пигментации связано со скоростью этого процесса (быстрое - медленное) и со специфичностью путей фенотипических превращений (репопуляция - реверсия). Механизмы восстановления пигментации при ресупрессии являются главной составляющей в стратегии выживания растений с супрессированной хлорофиллдефектностью. Проведенное исследование позволило установить дифференциальную приспособленность растений с супрессированной хлорофиллдефектностью, что связано как со степенью хлорофилльного дефекта растений, так и с механизмами фенотипических изменений окраски проростков при ресупрессии и их скорости; показать зависимость относительной приспособленности растений с супрессированной хлорофиллдефектностью от клеточных механизмов восстановления пигментации при ресупрессии; выявить приспособительный эпистаз в отношении относительной выживаемости и относительной плодовитости у растений отдельных фенотипических групп.

Литература

Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях. М.: Академкнига, 2003. 431 с.

Гродзинский Д. М. Радиобиология растений. Киев, 1989. 380 с.

Зайцев Г. Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. М.: Наука. 1984. 424 с.

Инге-Вечтомов С. Г. Блочный принцип в теории эволюции. Перспективы и парадоксы // Фундаментальные зоологические исследования. Теория и методы. М.; СПб.: Т-во научных изданий. КМК. 2004. С. 74–87.

Инге-Вечтомов С. Г., Миронова Л. Н., Тер-Аванесян М. Д. Неоднозначность трансляции: версия эукариот // Генетика. 1994. Т. 30, № 8. С. 1022–1035.

Калам Ю., Орав Т. Хлорофильная мутация. Таллин, 1974. 60 с.

Лебедева О. Н., Титов А. Ф., Стафеева Е. Б., Николаевская Т. С. О стратегии фотозащиты у высших растений // Доклады РАСХН. 2007. № 4. С. 15–19.

Олимпиенко Г. С., Титов А. Ф., Митрофанов Ю. А. Депигментация проростков овсяницы луговой под влиянием температуры // Генетика. 1976. Т. 12, № 1. C. 153-155.

Олимпиенко Г. С., Лебедева О. Н., Николаевская Т. С. и др. Содержание пигментов и морфологический тип у овсяницы луговой // Доклады РАСХН. 2005. № 5. С. 15–17.

Суходолец В. В. Механизм вертикальной эволюции и теория нейтральности // Генетика. 1991. Т. 27, № 10. С. 1685–1696.

Суходолец В. В. Регуляторный отбор как альтернатива теории нейтральности // Генетика. 1995. Т. 31, № 12. С. 1589–1597.

Суходолец В. В. Приспособленность, экологическая устойчивость и эволюция диплоидных организмов // Генетика. 2000. Т. 36, № 1. С. 5–16.

Тимофеев-Ресовский Н. В., Воронцов Н. Н., Яблоков А. В. Краткий очерк теории эволюции. М., 1977. 297 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 возможности селективной ценности температурочувствительных хлорофильных мутаций у овсяницы луговой // Журн. общей биологии. 1978. Т. 39, № 4. С. 628-632.

 $\it Xедрик \ \Phi. \$ Генетика популяций. М.: Техносфера, 2003. 588 с.

Kondo S. Altruistic cell suicide in relation to radiation hormesis // Int. J. Radiat. Biol. 1988. Vol. 53, N 1. P. 95–102.

Land J. B., Whittington W. J., Norton G. Environment dependent chlorosis in mutant plant of Festuca pratensis Huds. // Ann. Bot. 1971. Vol. 35, N 141. P. 605–613.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Лебедева Ольга Николаевна

зам. директора по научной работе, к. б. н. Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: lebedeva@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 774682

Титов Александр Федорович

председатель КарНЦ РАН, чл.-корр. РАН, д. б. н. Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: krcras@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 769710

Николаевская Татьяна Сергеевна

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

эл. почта: nicoltn@mail.ru тел.: (8142) 573107

Lebedeva, Olga

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

Titov, Alexandr

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

Nikolaevskaya, Tatiana

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences 11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia e-mail: nicoltn@mail.ru tel.: (8142) 573107 УДК 582.632.1: 581.1

ВЛИЯНИЕ СООТНОШЕНИЙ N : P : K В СРЕДЕ НА МИНЕРАЛЬНЫЙ СОСТАВ РАСТЕНИЙ РОДА *ВЕТULA*

В. Б. Придача, С. В. Позднякова, Т. А. Сазонова

Институт леса Карельского научного центра РАН

Проведено исследование минерального состава сеянцев березы повислой ($Betula\ pendula\ var.\ pendula\)$ и карельской березы ($Betula\ pendula\ var.\ carelica\)$ при разной обеспеченности питательной среды основными элементами минерального питания. Выявлены «биологический» и «хозяйственный» оптимумы N:P:K и их сходство у исследуемых форм берез. Показаны внутривидовые особенности распределения биомассы растения в условиях разной обеспеченности среды макроэлементами. Обсуждаются возможные причины этих различий.

K л ю ч е в ы е с л о в а : Betula pendula var. pendula, Betula pendula var. carelica, морфометрические показатели, «биологический» и «хозяйственный» оптимумы N:P:K.

V. B. Pridacha, S. V. Pozdnyakova, T. A. Sazonova. EFFECT OF AMBIENT N: P: K RATIOS ON THE MINERAL NUTRIENT COMPOSITION IN *BETULA* PLANTS

Investigation of the elemental composition was carried out in common silver birch ($Betula\ pendula\ var.\ pendula\)$ and curly (Karelian) birch ($Betula\ pendula\ var.\ carelica\)$ seedlings at early stages in the ontogeny against the background of variation in the availability of major mineral nutrients in the substratum. The "biological" and "commercial" N:P:K optimums and their similarity in the birch forms in question were determined. Intraspecific variation of the structural organization of the plants under the conditions of different availability of macroelements is demonstrated. Probable causes of the distinctions are discussed.

Key words: Betula pendula var. pendula, Betula pendula var. carelica, morphometric parameters, «biological» and «commercial» N:P:K optimums.

Введение

Древесные виды рода Betula имеют широкий ареал и являются основными лесообразующими видами на Северо-Западе России, наряду с растениями родов Pinus и Picea. Особый интерес для исследователей представляет карельская береза (Betula pendula Roth var. carelica (Merclin) Hämet Ahti) в связи с выявлением механизмов формирования структурных аномалий [Любавская, 1978; Барильская, 1979;

Коровин и др., 2002; Новицкая, 2008 и др.]. Согласно концепции Л. Л. Новицкой [2008], карельская береза является экологической формой березы повислой (*Betula pendula* Roth), естественный ареал которой занимает очень небольшую часть ареала березы повислой.

Вопрос о роли воздействия факторов среды на формирование узорчатой древесины карельской березы широко обсуждается в литературе [Ермаков, 1986; Евдокимов, 1989; Ветчинникова, 2004; Новицкая, 2008 и др.].

Важную роль в комплексе внешних факторов, индуцирующих аномальный рост, отводят уровню почвенного плодородия, в частности, азотного питания [Новицкая, 2008]. В свою очередь, изменения структурной организации тканей ствола, вероятно, должны сказываться на процессах обмена, в частности, транспорте и метаболизме элементов минерального питания в растении. Анализ работ по изучению элементного состава древесных растений рода Betula в норме и при аномальном росте в зависимости от этапа онтогенеза в естественных условиях среды показал слабую изученность и фрагментарный характер имеющихся в настоящее время данных для разных форм и видов [Ремезов и др., 1959; Комшилов, Селиванова, 1962; Казимиров и др., 1978; Ingestad, 1979; Ferm, Markkola, 1985; Margolis, Vezina, 1988; Wendler, Millard, 1996; Oleksyn et al., 2000 и др.], что не позволяет провести их сравнительную оценку.

В этой связи представляет интерес изучение минерального состава растения обычной березы повислой (Betula pendula var. pendula) и карельской березы (Betula pendula var. carelica) при разной обеспеченности питательной среды основными элементами минерального питания.

Материал и методы

Исследование проводили в камеральных условиях в лаборатории физиологии и цитологии древесных растений Института леса КарНЦ РАН (ИЛ КарНЦ РАН). Вегетационные опыты были проведены на сеянцах березы повислой (Betula pendula var. pendula) и карельской березы (Betula pendula var. carelica (Merclin) Hämet Ahti), выращенных из сертифицированных семян от контролируемого опыления (Финляндия), в условиях песчаной культуры. Для этого семена березы повислой и карельской березы высевали в вегетационные сосуды с приготовленными на дистиллированной воде питательными средами согласно схеме опыта (табл. 1) и помещали в светоустановку. Питательную смесь вносили однократно перед посевом семян. В каждом сосуде, содержащем 4 кг кварцевого песка, выращивали по 100 растений при освещенности 15 клк, температуре воздуха +25 °C, относительной влажности воздуха 50 %, при поливе дистиллированной водой по массе до 60 % от полной влагоемкости. Плотность посадки 1 раст./см². Во всех вариантах питательной смеси за 100 % принимали суммарную концентрацию N+P+K в среде Ингестада для березы, равную 24,10 мг-атом/л [Гродзинский, Гродзинский, 1973]. Таким образом, растения разных вариантов выращивали при одинаковой суммарной концентрации N+P+K, но разном соотношении N:P:K в среде [Вахмистров, Воронцов, 1994, 1997].

Таблица 1. Содержание и соотношение NPK в питательной среде

Рорионт	Концентрация, мг-ат./кг			Соотношение
Вариант	Ν	P	K	N:P:K,%
1	0,96	11,57	11,57	4:48:48
2	3,61	11,57	8,92	15 : 48 : 37
3	6,27	16,87	0,96	26:70:4
4	8,19	7,95	7,95	34 : 33 : 33
5	9,88	9,64	4,58	41:40:19
6	11,57	6,27	6,27	48 : 26 : 26
7	11,57	8,92	3,61	48:37:15
8	11,57	11,57	0,96	48:48:4
9	14,22	3,62	6,27	59 : 15 : 26
10	14,22	6,27	3,61	59 : 26 : 15

Содержание остальных макро- (г/л) микроэлементов (мг/л) в питательных средах соответствовало среде Ингестада для березы: 0,30 - CaCO₃, 0,49 - MgSO₄·7H₂O; 13,50 -FeCl₂·6H₂O, 1,50 - MnSO₄, 0,15 - CuSO₄, 0,25 -ZnSO₄, 2,80 - H₂BO₂, 0,02 - (NH₄)₂MoO₄ [Гродзинский, Гродзинский, 1973]. По окончании опытов через 10 недель определяли сухую массу отдельных органов (корни, стебли, листья) и проводили их химический анализ. Сухой вес листьев, стеблей и корней определяли после высушивания до абсолютно сухого веса в термостате при температуре 105 °C. Систематизацию данных проводили для отдельного органа и целого растения. Биологическая повторность трехкратная.

Среднее содержание элемента в целом растении (С) рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{\sum (c_o m_o)}{m_{\Sigma}},$$

где c_{\circ} – концентрация элемента в отдельном органе (% на сухой вес), m_{\circ} и m_{Σ} – сухая масса этого органа и целого растения, соответственно (мг/растение).

Химический анализ растительных образцов проводили в аналитической лаборатории ИЛ КарНЦ РАН. Определение содержания азота (N) выполняли с помощью элементного анализатора PE-2410 (Perkin Elmer, США), калия (K) – методом атомно-эмиссионной и атомно-абсорбционной спектрофотометрии на атомно-абсорбционном спектрофотометре AA-6800 (Shimadzu, Япония), фосфора (P) – спектрофотометрическим методом с молибденовой синью (Методическое руководство..., 1990). Ошибка определения 5–10 %. Аналитическая повторность трехкратная.

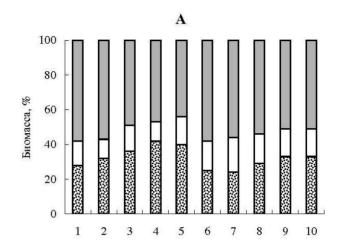
Оптимум N:P:K определяли методом корреляционного зондирования купола отклика «соотношение питательных элементов в среде – рост растений» [Вахмистров и др., 1986; Вахмистров, Воронцов, 1994]. Отклонения (разность между двумя соотношениями N:P:K) выражали как корень квадратный из суммы квадратов разностей долей отдельных элементов: $\Delta_{\rm y} = \sqrt{\Delta_{\rm N}^2 + \Delta_{\rm p}^2 + \Delta_{\rm K}^2}$ [Вахмистров, Воронцов, 1994].

Для обработки результатов использовали методы вариационной статистики [Ивантер, Коросов, 2003]. Результаты наблюдений представлены в таблицах в виде средней арифметической величины и ошибки средней. Проверку гипотез и оценку существенных различий между средними величинами осуществляли с помощью критерия Стьюдента при 5%-м уровне значимости.

Результаты и обсуждение

Структурные характеристики. Анализ распределения биомассы сеянцев по органам березы повислой и карельской березы (рис. 1) показал, что наибольшей ростовой активностью во всех вариантах обладают листья и корни исследуемых форм берез. Стебель по всем вариантам опыта уступает в скорости нарастания корням и листьям. Диапазон изменений относительной массы листьев, стеблей и корней для березы повислой составил 44–58, 11–20 и 24–42 % соответственно, для карельской березы – соответственно 43–69, 16–22 и 15–41 %.

Следует отметить, что при рассмотрении всех вариантов эксперимента достоверной зависимости распределения биомассы от условий обеспеченности субстрата макроэлементами обнаружено не было ни для березы повислой, ни для карельской березы. Однако в результате кластерного анализа распределения биомассы исследуемых форм берез были выявлены две группы (рис. 2), соответственно варианты 1-5 и 6-10, для которых была установлена зависимость накопления биомассы от доли N в соотношении N:P:K в среде. Так, при увеличении доли N в среде с 4 до 41 % (варианты 1-5) происходит снижение массы листа $(r = -0.96, R^2 = 0.93, p < 0.05)$ и увеличение массы корня (r = 0.96, $R^2 = 0.92$, p < 0.05) как для березы повислой, так и для карельской, соответственно с 58 до 44, с 28 до 40 и с 69 до 43, с 15 до 41 %. Однако при дальнейшем увеличении доли *N* в среде с 48 до 59 % (варианты 6-10) ответные реакции исследуемых форм берез различаются. Если у березы повислой также происходит снижение массы листа с 58 до 51 % (r = -0.89, $R^2 = 0.79$, p < 0.05) и увеличение массы корня с 25 до 33 % (r = 0.90, $R^2 = 0.81$, p < 0.05) с ростом доли N в среде, то для карельской березы обнаружена некоторая стабилизация отношения надземной и подземной частей растения. Причиной большего накопления массы корней у березы повислой при увеличении N в питательной среде, вероятно, может быть усиленный отток питательных веществ в корни по сравнению с карельской березой, у которой, напротив, происходит более активное потребление ассимилятов в надземных органах.



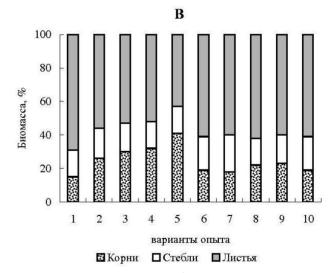


Рис. 1. Распределение биомассы по органам сеянцев березы повислой (А) и карельской березы (В) (абсолютно сухой вес выражен в относительных процентах; варианты опыта здесь и на рис. 2 и 3 смотри в табл. 1)

Сравнительный анализ соотношения подземной (корни) и надземной массы (листья и стебли) также выявил различия для исследуемых форм берез (рис. 3). Так, во всех вариантах опыта меньшие значения соотношения подземной и надземной массы были у карельской березы. Диапазон изменения соотношения по всем вариантам опыта составил для березы повислой и карельской березы 0,36-0,76 и 0,15-0,61 соответственно, средние значения показателя в эксперименте - соответственно 0.49 и 0.32. Этот факт, вероятно, свидетельствует о более интенсивном развитии подземной части сеянцев березы повислой и, напротив, надземной части сеянцев карельской березы. Ранее мы также отмечали в период интенсивного роста более активное развитие ассимиляционной поверхности карельской березы по сравнению с березой повислой [Придача, Позднякова, 2010]. Исключение составил вариант 5, в котором при соотношении N: P: K в среде 41: 40: 19 соотношения подземной и надземной массы исследуемых форм берез были близки и составили 0,66 и 0,61 соответственно.

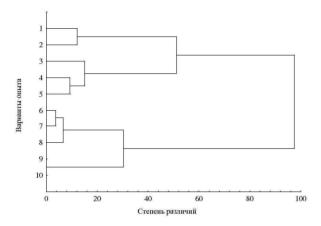


Рис. 2. Результаты кластерного анализа распределения биомассы исследуемых форм берез

Минеральный состав. Сопоставление данных по содержанию и соотношению основных элементов минерального питания в питательной среде и сеянцах исследуемых форм берез

показало, что они существенно различаются (табл. 1 и 2). Максимальные и минимальные значения содержания N, P, K в питательной среде по вариантам опыта различались соответственно в 15, 4 и 12 раз, тогда как в целом растении березы повислой - в 1,5, 1,6 и 1,7 раза соответственно. Для карельской березы было отмечено двукратное изменение содержание макроэлементов по вариантам опыта. При этом диапазон варьирования доли N, P, К в тройном соотношении в среде составил (4-59): (15-70): (4-48), которому соответствовал более узкий диапазон варьирования долей элементов в растении березы повислой и карельской березы (47-64): (13-21): (20-32) и (50-68): (12-28): (14-28) соответственно.

Таким образом, за счет избирательности поглощения диапазон варьирования содержания и соотношения основных элементов минерального питания NPK в сеянцах как березы повислой, так и ее формы - карельской березы уменьшился в несколько раз. Аналогичные данные ранее нами были получены для саженцев сосны [Сазонова, Придача, 2002]. Такие результаты поддерживают гипотезу Д. Б. Вахмистрова [1966] о двух видах избирательной способности. Абсолютная избирательность обеспечивает различие между содержанием элементов в среде и растении и заключается в том, что при изменении концентрации элемента в среде в определенное число раз его поглощение изменяется в меньшее число раз. Относительная избирательность проявляется в способности растений поглощать и накапливать элементы минерального питания в соотношении, более близком к оптимальному для их жизнедеятельности и отличном от соотношения элементов в наружной среде, что и следует из полученных результатов.

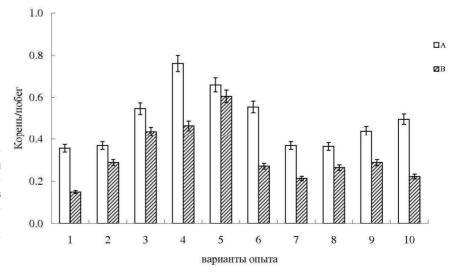


Рис. 3. Соотношение подземной и надземной массы березы повислой (A) и карельской березы (B) в условиях разной обеспеченности основными элементами минерального питания N:P:K

Таблица 2. Содержание и соотношение *NPK* в сеянцах березы повислой (над чертой) и карельской березы (под чертой)

		,		
_	Содерж	ание, мг-ат	Соотношение	
Вариант		массы	N:P:K,%	
	N	P	K	N.F.K, 70
_	31,6	<u>14,1</u>	22.0	<u>47 : 21 : 32</u>
1	24,3	11,9	12,0	50 : 25 : 25
	<u>29,1</u>	10,5	16,5	52:19:29
2	34,4	13,5	18,9	52 : 20 : 28
	04,4	10,0	10,5	32.20.20
3	=	= 16,4	= 11,8	<u>=</u>
	31,4			52 : 28 : 20
4	<u>40,6</u>	<u>9.6</u>	<u>23,3</u>	<u>55 : 13 : 32</u>
-	40,5	13,6	16,7	57 : 19 : 24
_	<u>41,8</u>	<u>15,4</u>	<u>16,2</u>	<u>57 : 21 : 22</u>
5	45,2	13,1	10,7	65 : 19 : 16
6	=	=	=	=
O	41,1	9,4	9,4	68:16:16
7	42,8	<u>13,5</u>	<u>14,4</u>	<u>61 : 19 : 20</u>
7	46,2	12,6	9,6	68 : 18 : 14
0	=	=	=	=
8	41,4	12,4	12,6	62:19:19
			=	_
9	44,5	8,2	14,0	67 : 12 : 21
	44,2	<u>10,9</u>	13,6	64:16:20
10	46,2	10,0	11,6	68 : 15 : 17
	40,2	10,0	11,0	00.13.17

Примечание. Прочерк – нет данных.

Далее для выявления оптимальных соотношений N:P:K березы повислой и карельской березы были использованы методические подходы [Вахмистров и др., 1986; Вахмистров, Воронцов, 1994, 1997], разработанные для расчета соотношений основных элементов минерального питания в среде, которые соответствуют биологическому и хозяйственному оптимумам растения.

Хозяйственный оптимум N: P: K определяли методом корреляционного зондирования купола отклика «соотношение питательных элементов в среде - рост растений» [Вахмистров и др., 1986; Вахмистров, Воронцов, 1994], выбрав в качестве параметра оптимизации сухую массу растения. Принцип метода основан на том, что чем ближе к оптимуму соотношение макроэлементов в среде, тем сильнее будет тормозиться рост растений при отклонении от него и, следовательно, тем выше будет коэффициент отрицательной корреляции между ростом и отклонениями от этого соотношения. Сухая масса сеянцев исследуемых форм берез, выращенных при разных соотношениях N: P: К в питательной среде, приведена в табл. 3. Найденное с помощью метода корреляционного зондирования оптимальное соотношение N:P:K оказалось одинаковым (рис. 4) как для березы повислой, так и для карельской березы и составило 59:26:15, r = -0.86(р < 0.05). Для подтверждения оптимальности соотношения построили график зависимости (рис. 5) изменения биомассы сеянцев берез от отклонений долей N, P и K в среде от оптимального соотношения 59:26:15. Как и ожидали, по мере удаления соотношений N:P:K в опытных вариантах от оптимума общая биомасса растений снижается.

Таблица 3. Зависимость общего сухого веса растения березы повислой (над чертой) и карельской березы (под чертой) от соотношений N:P:K в питательной среде

Вариант		пя в сум Р+К, ат		Сухой вес,	t-Student
•	Ν	Р	K	мг/растение	$(t_{0,05} = 4,30)$
1	4	48	48	$\frac{15,80 \pm 0,60}{18,05 \pm 1,30}$	1,35
2	15	48	37	$\frac{14,76 \pm 0,90}{17,70 \pm 1,50}$	1,43
3	26	70	4	$\frac{14,25 \pm 0,25}{16,95 \pm 0,45}$	7,10*
4	34	33	33	$\frac{17,60 \pm 1,10}{21,60 \pm 0,90}$	2,81
5	41	40	19	28.20 ± 1.80 22.70 ± 1.60	1,65
6	48	26	26	26,35 ± 1,10 25,10 ± 1,70	0,86
7	48	37	15	$\frac{24,35 \pm 1,80}{31,70 \pm 2,10}$	1,52
8	48	48	4	$\frac{33.05 \pm 1.55}{29,70 \pm 0,90}$	2,06
9	59	15	26	$\frac{33,40 \pm 1,90}{30,35 \pm 2,10}$	0,68
10	59	26	15	$\frac{38,20 \pm 2,20}{44,70 \pm 2,30}$	2,10

Примечание. Сумма N+P+K во всех вариантах одинакова и равна 24,10 мг-ат./кг; * – различия достоверны.

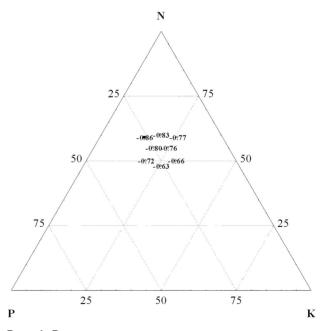
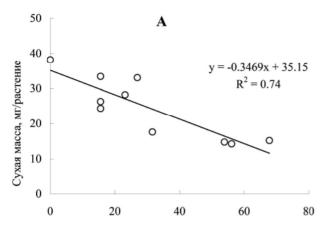


Рис. 4. Результаты корреляционного зондирования купола отклика «сухая масса растений – соотношение N:P:K в среде»; черная точка – оптимум N:P:K (59: 26: 15, r=-0.86, p<0.05)



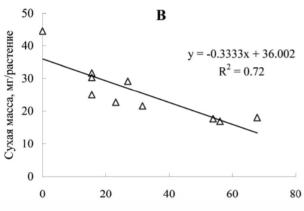


Рис. 5. Изменение сухой массы сеянцев березы повислой (A) и карельской березы (B) по мере отклонения соотношений N:P:K в среде от

оптимального (59: 26: 15)

Отклонение соотношения N:P:К в среде от

оптимального, %

Внутренний (биологический) оптимум — такое соотношение N:P:K в среде, при котором основные элементы минерального питания будут поглощаться и накапливаться в растениях в том же самом соотношении [Вахмистров, Воронцов, 1997]. Для определения внутреннего (биологического) оптимума рассмотрели зависимость доли каждого элемента в соотношении N:P:K в сеянцах исследуемых форм берез от доли того же элемента в среде, независимо от вариации внешних долей двух других элементов.

Для доли азота (1), фосфора (2) и калия (3) в соотношении N:P:K в сеянцах березы повислой (а) и карельской березы (в) такая зависимость удовлетворительно аппроксимируется уравнением линейной регрессии (р < 0,05):

где N_y , P_y , K_y – расчетные доли в соотношении N:P:K в растениях, N_x , P_x , K_x – заданные в эксперименте доли в их тройном соотношении в среде (%), R^2 – коэффициент детерминации.

По данным этого опыта доли *N*, *P*, *K* в соотношении макроэлементов для березы повислой и карельской березы составили 65, 12, 23 и 68, 12, 20 %, соответственно. Сумма этих величин в обоих случаях равна 100 %. Адекватность моделей подтверждается данными рис. 6. Разность между соотношениями была незначительной и составила всего 4 %. Т. А. Шуляковская с соавторами [2010] также отмечает сходство физиолого-биохимических показателей, в частности липидного, жирнокислотного состава, и азотсодержащих соединений для растений березы повислой и карельской березы на ранних этапах онтогенеза.

Таким образом, в результате расчета оптимальных соотношений питательной среды мы установили, что для сеянцев березы повислой и ее формы - карельской березы соотношения макроэлементов во внешней среде, соответствующие внутреннему оптимуму, были близкими и составили 65 : 12 : 23 и 68 : 12 : 20 соответственно. Соотношение N: P: K во внешней среде, обеспечивающее максимальный рост растений, было одинаковым для исследуемых форм берез - 59: 26: 15. Сопоставление биологического и хозяйственного оптимумов березы повислой и карельской березы показало, что они значимо различаются. Различие между ними составило 17 % (р < 0,05). Для удовлетворения собственных биологических потребностей (внутренний оптимум) растений березы повислой и ее формы - карельской березы по сравнению с максимальным накоплением ими биомассы (хозяйственный оптимум) требуется несколько более высокая доля N в тройном соотношении в среде, соответственно, 65-68 и 59 %. Кроме того, равновесное соотношение N: P: К отличается также в 1,5 раза большей долей K в сумме трех основных элементов минерального питания. Однако доля P в «хозяйственном» оптимуме исследуемых форм берез была выше в 2 раза, чем в равновесном соотношении, отражающем биологический оптимум. Различие по продуктивности (сухой массе) между этими соотношениями различалось и составило 10 %.

Можно было бы предположить, что причиной более высокой доли Р в «хозяйственном» оптимуме является ювенильный возраст опытных растений. Однако аналогичная тенденция ранее была обнаружена как для травянистых растений, выращенных в песчаной культуре до полного созревания [Вахмистров и др., 1986;

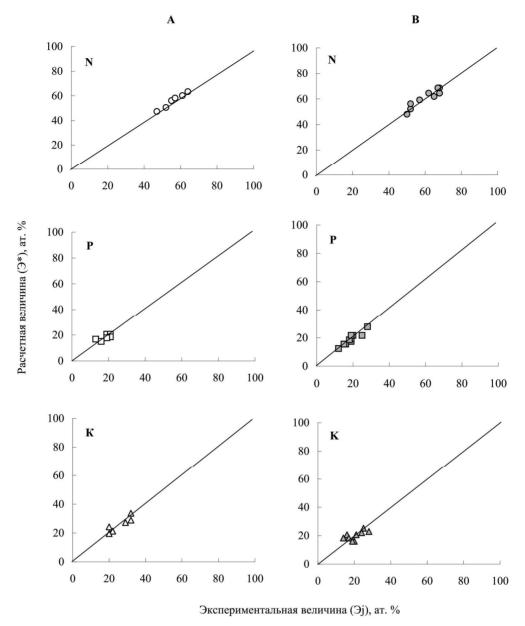


Рис. 6. Соответствие долей каждого из трех элементов в соотношении N:P:K в сеянцах березы повислой (A) и карельской березы (B), рассчитанных по уравнениям (1), (2) и (3) (\mathfrak{I}), их экспериментальным величинам (\mathfrak{I}) (прямые – биссектрисы прямого угла)

Вахмистров, Воронцов, 1997], так и для саженцев хвойных растений [Сазонова, Придача, 2002]. Такой результат может быть связан с рядом причин. Известно, что оптимальная обеспеченность растений Р способствует высокой интенсивности физиологических процессов, в частности, возрастает сопряженность процессов окисления и фосфорилирования, происходит интенсификация процессов фотосинтеза, а также стимуляция оттока сахаров из мезофилла в проводящие пути и к корням и, как следствие, повышение продукционного процесса [Сабинин, 1971; Курсанов, 1976; Мокроносов, Гавриленко, 1992 и др.]. Кроме того, наиболее чувствительными к недостатку Р оказываются рост и развитие растений - процессы, тесно

связанные с обменом нуклеиновых кислот. Также отмечают, что недостаток в среде этого макроэлемента практически не компенсируется поглощением других анионов, в то время как уровень Р во многом определяет устойчивость равновесия катионов в системе корень питательный раствор [Барбер, Marschner, 1995; Schachtman et al., 1998]. При этом считают, что именно P следует вносить в 2-3 раза больших количествах по сравнению с его относительным содержанием в растениях [Вахмистров и др., 1986]. Объясняют это как свойствами питательной среды, где фосфатионы в нейтральной среде образуют труднорастворимые соли с двухвалентными катионами, что уменьшает их доступность для растений, так и свойствами самого поглотительного аппарата корневых клеток, которые поглощают фосфат менее эффективно, чем другие элементы питания. В этом случае повышенный относительный уровень *P* в среде будет компенсировать дефицит его поглощения растениями. Таким образом, все вышеизложенное позволяет нам предположить, что именно высокая доля *P* в хозяйственном оптимуме обеспечивает наибольшее накопление биомассы и максимальный рост, поскольку ростовые процессы требуют высоких энергетических затрат.

Следует отметить, что эти закономерности были выявлены нами в модельной системе «среда - растение» в контролируемых условиях (освещенность, влажность, температура, доступность элементов минерального питания во внешней среде). Сравнение наших расчетных величин внутреннего оптимума (65:12:23 и 68: 12: 20) с полученным ранее соотношением *N : P : K* для березы (68 : 9 : 23) в результате листовой диагностики в естественных условиях произрастания [Морозова, 1991] показало их близость. Разность между расчетными и экспериментальными соотношениями макроэлементов составила 4 %. Этот факт свидетельствует о том, что оптимизация минерального питания в природе идет по пути стабилизации биологического оптимума, что согласуется с представлениями о стратегии развития растительного организма, которая ориентирована не на достижение максимальной продуктивности, а на поддержание некоторого устойчивого состояния, благоприятного для жизнедеятельности данного вида [Северцов, 1990; Яблоков, Юсуфов, 1998], в частности, максимальной надежности воспроизведения и сохранения вида [Вахмистров, Воронцов, 1997].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 09-04-00299-а).

Литература

Барбер С. А. Биологическая доступность питательных веществ в почве. М.: Наука, 1988. 376 с.

Барильская Л. А. Сравнительный структурный анализ древесины березы повислой и карельской березы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л., 1979. 24 с.

Вахмистров Д. Б. О двух механизмах избирательности при поглощении растениями элементов минерального питания // Физиология растений. 1966. Т. 13, № 5. С. 807–813.

Вахмистров Д. Б., Воронцов В. А. Соотношение элементов минерального питания в среде и рост растений. 2. Уточнение формы купола отклика // Физиология растений. 1994. Т. 41, № 1. С. 64–69.

Вахмистров Д. Б., Воронцов В. А. Избирательная способность растений не направлена на обеспече-

ние их максимального роста // Физиология растений. 1997. Т. 44. № 3. С. 404–412.

Вахмистров Д. Б., Вильямс М. В., Шарма Г., Ягодин Б. А. Соотношение N:P:K в среде и избирательная способность растений (теоретический анализ) // Физиология и биохимия культ. растений. 1986. Т. 18, \mathbb{N}^2 4. С. 326–333.

Ветчинникова Л. В. Береза: вопросы изменчивости (морфофизиологические и биохимические аспекты). М.: Наука, 2004. 183 с.

Гродзинский А. М., Гродзинский Д. М. Краткий справочник по физиологии растений. Киев: Наук. думка, 1973. 591 с.

Евдокимов А. П. Биология и культура карельской березы. Л.: ЛГУ, 1989. 226 с.

Ермаков В. И. Механизмы адаптации березы к условиям Севера. Л.: Наука, 1986. 144 с.

Ивантер Э. В., Коросов А. В. Введение в количественную биологию. Петрозаводск, 2003. 304 с.

Казимиров Н. И., Морозова Р. М., Куликова В. К. Органическая масса и потоки веществ в березняках средней тайги. Л.: Наука, 1978. 216 с.

Комшилов Н. Ф., Селиванова Т. А. Химический состав древесины карельской березы // Вопросы лесоведения и лесной энтомологии в Карелии. М., 1962. С. 47–52.

Коровин В. В., Новицкая Л. Л., Курносов Г. А. Структурные аномалии стебля древесных растений. М.: Наука, 2002. 258 с.

Курсанов А. Л. Транспорт ассимилятов в растении. М.: Наука, 1976. 646 с.

Любавская А. Я. Карельская береза. М.: Лесная промышленность, 1978. 158 с.

Методическое руководство по ускоренному анализу золы растений и определению азота. Петрозаводск, 1990. 45 с.

Мокроносов А. Т., Гавриленко В. Ф. Фотосинтез. Физиолого-экологические и биохимические аспекты. М.: МГУ, 1992. 320 с.

Морозова Р. М. Минеральный состав растений лесов Карелии. Петрозаводск, 1991. 99 с.

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

Придача В. Б., Позднякова С. В. Метрические параметры листьев и биохимические особенности Betula pendula var. pendula и В. pendula var. carelica // Ботан. журн. 2010. № 11. С. 1595–1605

Ремезов Н. П., Быкова Л. Н., Смирнова К. М. Потребление и круговорот азота и зольных элементов в лесах Европейской части СССР. М.: МГУ, 1959. 284 с

Сабинин Д. А. Избранные труды по минеральному питанию растений. М.: Наука, 1971. 512 с.

Сазонова Т. А., Придача В. Б. Оптимизация минерального питания хвойных растений // Агрохимия. 2002. № 2. С. 23–30.

Северцов А. С. Направленность эволюции. М.: МГУ, 1990. 272 с.

Шуляковская Т. А., Ильинова М. К., Репин А. В. и др. Физиолого-биохимические особенности особей Betula pubescens и В. pendula (Betulaceae) на ранних

этапах онтогенеза // Растительные ресурсы. 2010. T. 46. № 1. C. 57-66.

Яблоков А. Я., Юсуфов А. Г. Эволюционное учение. М.: Высшая школа, 1998. 336 с.

Ferm A., Markkola A. Nutritional variation of leaves, twigs and buds on Betula pubescens stands during the growing season // Folia For. 1985. Vol. 613. P. 1-28.

Ingestad T. Nitrogen stress in birch seedlings, II. N. P. K. Ca and Mg nutrition // Physiol. Plantarum. 1979. Vol. 45. P. 149-57.

Margolis H. A., Vezina L. P. Nitrate content, amino acid composition and growth of yellow birch seedlings in response to light and nitrogen source // Tree Physiol. 1988. Vol. 4. P. 245-253.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Придача Владислава Борисовна

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

тел.: (8142) 578216

Позднякова Светлана Васильевна

старший инженер Институт леса Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: pridacha@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 578216

Сазонова Татьяна Аркадьевна

ведущий научный сотрудник, д. б. н. Институт леса Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: sazonova@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 578216

Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. London: Acad. Press. 1995, 363 p.

Oleksyn J., Zytkowiak R., Reich P. B. et al. Ontogenetic patterns of leaf CO₂ exchange, morphology and chemistry in Betula pendula // Trees. 2000. Vol. 14. P. 271-281.

Schachtman D. P., Reid R. J., Ayling S. M. Phosphorus uptake by plants: From soil to cell // Plant Physiol. 1998. Vol. 116. P. 447-453.

Wendler R., Millard P. Impact of water and nitrogen supplies on the physiology, leaf demography and nitrogen dynamics of Betula pendula // Tree Physiol. 1996. Vol. 16. P. 153-159.

Pridacha, Vladislava

Forest Research Institute, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences

11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia e-mail: pridacha@krc.karelia.ru

tel.: (8142) 578216

Pozdnyakova, Svetlana

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

tel.: (8142) 578216

Sazonova, Tatiana

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

tel.: (8142) 578216

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ СВF1 И DREB1 В ЛИСТЬЯХ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

Н. С. Репкина, В. В. Таланова, Л. В. Топчиева, Ю. В. Батова, А. Ф. Титов

Институт биологии Карельского научного центра РАН

В условиях контролируемой среды изучали влияние кадмия на экспрессию генов, кодирующих транскрипционные факторы CBF1 и DREB1, в листьях проростков озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с. Московская 39. Установлено, что в первые 5 ч воздействия кадмия (100 мкМ) на корни проростков его содержание в листьях практически не увеличивается, но через 1 сут резко возрастает, продолжая повышаться в течение всего опыта (7 сут). В отличие от этого, уровень экспрессии генов *CBF1* и *DREB1* существенно увеличивался уже через 15 мин воздействия кадмия на проростки и достигал максимума через 1 ч. В дальнейшем (через 5 ч) экспрессия гена *DREB1* несколько снижалась, но оставалась на повышенном уровне до конца эксперимента (7 сут). Содержание транскриптов гена *CBF1* снижалось через 5–48 ч воздействия кадмия, а затем вновь возрастало и сохранялось на достигнутом уровне (3–7 сут). Высказано предположение об участии генов транскрипционных факторов *CBF1* и *DREB1* в неспецифических защитно-приспособительных реакциях растений пшеницы на действие ионов кадмия.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., содержание кадмия, экспрессия генов, транскрипционный фактор.

N. S. Repkina, V. V. Talanova, L. V. Topchieva, Yu. V. Batova, A. F. Titov. EFFECT OF CADMIUM ON GENE EXPRESSION OF THE TRANSCRIPTION FACTORS CBF1 AND DREB1 IN WHEAT SEEDLING LEAVES

We studied the effect of cadmium on the expression of genes encoding the transcription factors CBF1 and DREB1 in leaves of cv. Moscovskaya 39 winter wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings in a controlled environment. In the first 5 h of cadmium impact (100 μ M) on the roots of the seedlings its content in the leaves remained nearly unchanged, but after 1 day of the impact it rose sharply and continued to grow throughout the experiment (7 full days). Contrastingly, the level of *CBF1* and *DREB1* gene expression rose significantly after just 15 min of the cadmium impact on the seedlings, and peaked in an hour. Further on (in 5 h) *DREB1* gene expression decreased somewhat, but remained elevated until the end of the experiment (7 full days). The content of *CBF1* gene transcripts decreased in the 5th –48th h of the cadmium impact, and then rose again to remain at the level reached thereafter (3–7 full days). The assumption was made that CBF1/DREB1 transcription factor genes take part in nonspecific protective and adaptive responses of wheat plants to cadmium ion impact.

 $Key\ words: \ \textit{Triticum aestivum}\ L.,\ cadmium\ content,\ gene\ expression,\ transcription\ factor.$

Введение

Исследования многих авторов показывают, что важную роль в процессах адаптации растений к неблагоприятным факторам внешней среды играют подавление экспрессии генов и соответственно торможение синтеза белков, характерных для жизнедеятельности клетки в обычных условиях, и активизация генов, кодирующих белки, которые принимают участие в адаптивных реакциях [Титов и др., 2006; Колупаев, Карпец, 2010]. В последние годы такие данные появились в литературе, посвященной воздействию на растения различных по своей природе стрессоров, включая тяжелые металлы. В них, в частности, рассматривается влияние тяжелых металлов на экспрессию генов, кодирующих транспортные белки [Morel et al., 2009], металлотионеины [Cobett, Goldsbrough, 2002], ферменты синтеза фитохелатинов [Wojas et al., 2008] и глутатиона [Bogs et al., 20031.

Как показывают подобные исследования, ключевую роль в активации генов и синтезе стрессовых белков под влиянием тех или иных стресс-факторов, в том числе тяжелых металлов, играют транскрипционные факторы. К ним, например, относятся и продукты генов CBF1 и DREB1 – CBFs (C-repeat-binding factors) и DREB1s (dehydration-responsive elementbinding factors 1) [Purdy et al., 2011]. Ha moдельном генетическом объекте Arabidopsis thaliana L. установлена роль этих генов в индукции транскрипции за счет связывания регуляторным элементом CRT/DRE (C-repeat/dehydration responsive element), pacположенным в промоторном участке многих регулируемых стресс-факторами [Medina et al., 2011]. В частности, появились данные об участии генов CBF1 и DREB1 в процессах адаптации растений к действию холода [Gilmour et al., 1998; Fowler, Thomashow, 2002; Van Buskirk, Thomashow, 2006] и засухи [Haake et al., 2002; De Leonardis et al., 2007]. Показано также, что транскрипция других генов этого семейства транскрипционных факторов (AP2/ERF), таких как DREB2A и DREB2B, peryлируется засолением [Dubouzet et al., 2003; Matsui et al., 2008], высокими температурами et al., 2011] и обезвоживанием [Nakashima et al., 2000]. Однако сведения об экспрессии генов этого семейства, в том числе транскрипционных факторов *CBF1* и *DREB1* в условиях действия на растения тяжелых металлов, в известной нам литературе отсутствуют.

Исходя из этого целью нашей работы явилось исследование влияния кадмия на экспрессию генов транскрипционных факторов *CBF1* и *DREB1* у проростков пшеницы.

Материал и методы

Эксперименты проводили с проростками озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39, выращенными в рулонах фильтровальной бумаги на питательном растворе Кнопа (рН 6,2–6,4) в камере искусственного климата при температуре воздуха 25 °С, его относительной влажности 60–70 %, освещенности 10 клк и фотопериоде 14 ч. По достижении недельного возраста проростки подвергали действию сульфата кадмия (100 мкМ) в течение 7 сут при сохранении прочих условий неизменными.

Реакцию растений на действие кадмия оценивали по изменению ростовых параметров, таких как длина побега и длина 1-го листа.

Содержание кадмия в листьях растений определяли методом инверсионной вольтамперометрии с использованием полярографа ABC-1.1. («Вольт», Россия). Разложение растительных образцов проводили в смеси HNO_3 и H_2O_2 в соотношении 4:1 с использованием микроволновой системы пробоподготовки MC-6 («Вольта»).

Для выделения РНК навеску листьев пшеницы (50 мг) растирали в жидком азоте. Тотальную РНК выделяли с помощью набора Yellow Solve («Силекс», Россия). кДНК синтезировали, используя набор для обратной транскрипc M-MLV обратной транскриптазой и случайными (random) гексапраймерами («Силекс»). Количество и качество кДНК проверяли спектрофотометрически на приборе SmartSpec Plus («Bio-Rad», США). Уровень экспрессии генов в листьях пшеницы анализировали методом ПЦР в режиме реального времени. Амплификацию проводили в приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 («Bio-Rad», США), используя набор для амплификации с интеркалирующим красителем SYBR Green («Синтол», Россия). Смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала 1 мкл кДНК (100 нг), 10 мкл реакционной смеси, по 1 мкл прямого и обратного праймера, 1 мкл MgCl₂ и 17 мкл деионизованной воды, свободной от нуклеаз. Для ПЦР в режиме реального времени использовали праймеры («Синтол», Россия), представленные в табл. 1. В качестве референсного гена использовали актин. Протокол ПЦР: 5 мин при 95 °C, 30 с при 56 °C, 30 с при 72 °C (40 циклов). Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР фрагментов: 1 мин при 95 °C, 1 мин при 56 °C, 10 с при 56 °C (80 циклов, повышая в каждом цикле температуру на 0,5 °C). Относительный уровень экспрессии генов растений, подвергнутых воздействию кадмия (100 мкМ), вычисляли по формуле:

 $OY9 = 2^{CT (КОНТРОЛЬНЫЙ) - CT (ТЕСТОВЫЙ ОБРАЗЕЦ)},$ где OY9 - относительный уровень экспрессии; CT - значение пороговых циклов.

В качестве контрольных образцов были выбраны кДНК, выделенные из растений, не подвергнутых воздействию металла.

Таблица 1. Праймеры для проведения ПЦР в режиме реального времени

Ген	Нуклеотидная последовательность					
ген	прямого праймера 5'3'	обратного праймера 5'3'				
DREB1	GTGGCTAATCTCAGGAA	GCCCGATAATAAGCACATA				
CBF1	TCGCCATACTGCCGTTCC	CCTGAATCACTGCCCAC				
Actin	GGACCCACGGATAATCTAATG	AACCTCCACTGAGAACAACATTAC				

На рисунках приведены средние арифметические значения из двух независимых опытов и их стандартные отклонения. Повторность при анализе ростовых показателей 50-кратная, при химическом анализе – 3-кратная, а при проведении ПЦР-анализа – 2-кратная. В статье обсуждаются величины, достоверные при $P \le 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что кадмий в концентрации 100 мкМ отрицательно влияет на рост проростков пшеницы. Так, за 7 сут эксперимента прирост побега у обработанных кадмием проростков составил всего 7 %, в то время как у проростков контрольного варианта – 26 % (табл. 2). Увеличение длины 1-го листа составило в опытном варианте 9 %, а в контрольном – 12 %. Таким образом, кадмий ингибировал рост проростков пшеницы, хотя их видимого повреждения при этом не происходило.

Таблица 2. Влияние кадмия на рост проростков пшеницы

	Прирост по отношению к исходному					
Концентрация			ypoi	зню, %		
кадмия, мкМ			Экспоз	виция, с	ут	
	0	1	2	3	6	7
Длина побега						
0	100	100	101	101	125*	126*
100	100	100	101	101	106*	107*
Длина 1-го листа						
0	100	100	100	103*	111*	112*
100	100	100	100	101	109*	109*

Примечание. * – различия с исходным уровнем достоверны при P ≤ 0,05.

Анализ содержания кадмия в листьях показал следующее. В первые 1–5 ч воздействия кадмия на корни проростков его концентрация в листьях практически не повышалась. Спустя 1 сут содержание кадмия в листьях возрастало с 0,03 до 0,2 мкг/г сырой массы (рис. 1) и в дальнейшем продолжало нарастать, достигая максимального значения (2,59 мкг/г сырой массы) на 7-е сутки эксперимента.

Крайне важно, что уже 15-минутное воздействие кадмия на проростки пшеницы приводило к существенному усилению (в 1,5-2 раза по сравнению с исходным уровнем) экспрессии как CBF1, так и DREB1 генов в листьях (рис. 2). Через 1 ч уровень экспрессии гена CBF1 возрастал в 4 раза, а гена DREB1 - в 5,5 раза и достигал максимального уровня. В дальнейшем (через 5 ч) содержание транскриптов гена DREB1 несколько снижалось, но даже через 6-7 сут от начала эксперимента оно примерно в 3 раза превышало исходные значения. Содержание транскриптов гена CBF1 в последующие 5-48 ч действия кадмия снижалось, однако на третьи сутки вновь возрастало до максимального уровня и в дальнейшем оставалось неизменным до конца опыта.

Установленный нами при воздействии кадмия на проростки пшеницы сходный характер изменения экспрессии генов CBF1 и DREB1 может объясняться тем, что они относятся к одной подгруппе (DREB1/CBF) генов AP2/ERF семейства транскрипционных факторов. Как показывает геномный анализ A. thaliana, CBF гены организованы в тандемы (DRB1A/CBF3, DREB1B/CBF1 и DREB1C/CBF2) на 4-й хромосоме [Medina et al., 2011]. Полученные нами результаты о повышении уровня экспрессии генов транскрипционных факторов CBF1 и DREB1 уже в самый начальный период действия кадмия (15-30 мин) и достижении его максимального значения через 1 ч согласуются данными, полученными на растениях A. thaliana, подвергнутых охлаждению. В частности, у A. thaliana гены CBF1 и DREB1 также экспрессируются уже через 15 мин от начала действия температуры 4 °C, достигая максимального значения через 2 ч [Fowler Thomashow, 2002]. Как известно, СВF транскрипционные факторы арабидопсиса играют ключевую роль в процессах адаптации к низким температурам, контролируя экспрессию более 100 генов, обеспечивающих повышение морозоустойчивости [Canella et al., 2010].

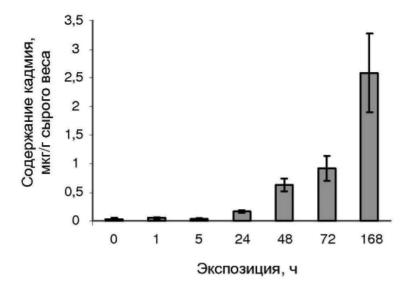


Рис. 1. Влияние продолжительности воздействия кадмия (100 мкМ) на его содержание в листьях проростков пшеницы

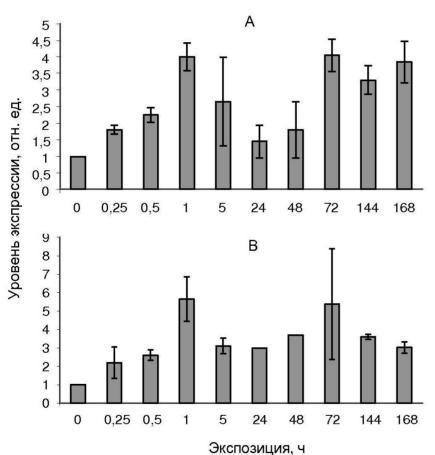


Рис. 2. Влияние продолжительности воздействия кадмия (100 мкМ) на экспрессию генов, кодирующих транскрипционные факторы CBF1 (A) и DREB1 (B) в листьях проростков пшеницы

Уровень экспрессии генов у растений контрольного варианта (без обработки кадмием) принят за единицу

Обнаружено, что транскрипционные факторы, кодируемые генами *CBF1* и *DREB1*, содержат AP2/ERF DNA-binding домены, которые распознаются CRT/DRE элементом, находящимся в промоторном участке *COR* генов (cold-regulated), продуктами которых являются COR белки, участвующие в процессе формирования высокой морозоустойчивости [Gilmour al., 1998; Purdy et al., 2011].

Следует отметить, что нами было выявлено повторное значительное повышение содержания транскриптов гена *CBF1* на третьи сутки воздействия кадмия. Учитывая это, можно предположить, что увеличение экспрессии гена *CBF1* в листьях проростков пшеницы связано с их реакцией не только на кратковременное (минуты, часы) воздействие кадмия, но и на более продолжительное (сутки), когда за ука-

занный период времени происходит значительное накопление металла в листьях. Не исключено, что в дальнейшем это может привести к усилению экспрессии генов СОR белков. Подчеркнем, однако, что в известной нам литературе данные, касающиеся динамики экспрессии гена *CBF1* при длительных (суточных) воздействиях стресс-факторов, включая низкую температуру, отсутствуют.

Отметим также, что имеющиеся в литературе данные о роли генов CBF1 и DREB1 в адаптивных реакциях растений на действие низких температур [Gilmour et al., 1998; Van Buskirk et al., 2006] и засухи [Haake et al., 2002; Matsui et al., 2008] касаются в основном A. thaliana. Между тем гены AP2/ERF семейства и гомологи CBF генов обнаружены и у других видов растенапример *CBF1* – v картофеля [Pennycooke et al., 2008], HvCBF2 - у ячменя [Xue, 2003], DREB1/CBF - у риса [Dubouzet et al., 2003], DREB1A – у пшеницы [De Leonardis et al., 2007], CBF - у огурца [Таланова и др., 20081.

Таким образом, анализ полученных нами результатов и данных других авторов позволяет заключить, что возрастание уровня экспрессии генов транскрипционных факторов *CBF1* и *DREB1* можно рассматривать как свидетельство их участия в неспецифических защитноприспособительных реакциях растений пшеницы на действие ионов кадмия.

Литература

Колупаев Ю. Е., Карпец Ю. В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. Киев: Основа, 2010. 352 с.

Таланова В. В., Титов А. Ф., Топчиева Л. В., Малышева И. Е. Влияние стресс-факторов на экспрессию гена транскрипционного фактора СВF у растений огурца // Докл. АН. 2008. Т. 423, № 2. С. 283–285.

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

Bogs J., Bourbouloux A., Cagnac O. et al. Functional characterization and expression analysis of a glutathione transporter, BjGT1 from *Brassica jncea*: evidence for regulation by heavy metal exposure // Plant Cell Environ. 2003. Vol. 26. P. 1703–1711.

Canella D., Gilmour S. J., Kuhn L. A., Thomashow M. F. DNA binding by the Arabidopsis CBF1 transcription factor requires the KKP/RAGRxKFxTRHP signature sequence // Biochim. Biophys. Acta. 2010. Vol. 1799. P. 454–462.

Cobett C., Goldsbrough P. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis // Annu. Rev. Plant Biol. 2002. Vol. 53. P. 159–182.

De Leonardis A. M., Marone S., Mazzucotelli E. et al. Durum wheat genes up-regulated in the early phases of cold stress are modulated by drought in a developmental and genotype dependent manner // Plant Scie. 2007. Vol. 172. P. 1005–1016.

Dubouzet J. G., Sakuma Y., Ito Y. et al. OsDREB genes in rice, Oryza sativa L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold – responsive gene expression // Plant J. 2003. Vol. 33. P. 751–763.

Fowler S., Thomashow M. F. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway // Plant Cell. 2002. Vol. 14. P. 1675–1690.

Gilmour S. J., Zarka D. G., Stockinger E. J., Salazar M. P., Houghton J. M., Thomashow M. F. Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in coldinduced COR gene expression // Plant J. 1998. Vol. 16, N 6. P. 433–442.

Haake V., Cook D., Riechmann J. L. et al. Transcription factor CBF4 is regulator of drought adaptation in Arabidopsis // Plant Physiol. 2002. Vol. 130. P. 639–648.

Kang H.-G., Kim J., Kim B. et al. Overexpression of FTL1/DDF1, AN AP2 transcription factor, enhances tolerance to cold, drought, and heat stresses in Arabidopsis thaliana // Plant Scie. 2011. Vol. 180. P. 634–641.

Matsui A., Ishida J., Morosawa T. et al. Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array // Plant Cell Physiol. 2008. Vol. 49. P. 1135–1149.

Medina J., Catala R., Salinas J. The CBFs: Three Arabidopsis transcription factors to cold acclimate // Plant Sci. 2011. Vol. 180. P. 3–11.

Morel M., Crouzet., Gravot A. et al. AtHMA3, a P_{1B} -ATPase Allowing Cd/Zn/Co/Pb Vacuolar Storage in Arabidopsis 10M // Plant Physiol. 2009. Vol. 149. P. 894–904.

Nakashima K., Shinwari., Sakuma Y. et al. Organization and expression of two Arabidopsis DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression // Plant Mol. Biol. 2000. Vol. 42. P. 657–665.

Pennycooke J. C., Cheng H., Roberts S. M. et al. The low temperature-responsive, Solanum CBF1 genes maintain high identity in their upstream regions in genomic environment undergoing gene duplications, deletions, and rearrangements // Plant. Mol. Biol. 2008. Vol. 67. P. 483–497.

Purdy S. J., John D. B., Nelson D. C. et al. A nuclear-localized protein, KOLD SENSITIV-1, affects the expression of cold-responsive genes during prolonged chilling in Arabidopsis // J. Plant Physiol. 2011. Vol. 168. P. 263–269.

Van Buskirk H. A., Thomashow M. F. Arabidopsis transcription factors regulating cold acclimation // Physiol. Planta. 2006. Vol. 126, N 1. P. 72–80.

Wojas S., Clemens S., Hennig J. et al. Overexpression of phytohelatatin synthase in tobacco: distinctive effects of AtPCS1 and CePCS genes on plant

response to cadmium // J. Exp. Bot. 2008. Vol. 59, N. 8. P. 2205–2219.

Xue G. P. The DNA-binding activity of an AP2 transcriptional activator HvCBF2 involved in regulation

of low-temperature responsive genes in barley is modulated by temperature // Plant J. 2003. Vol. 33. P. 373–383.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Репкина Наталья Сергеевна

аспирант

Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: nrt9@ya.ru тел.: (8142) 762712

Таланова Вера Викторовна

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

тел.: (8142) 762712

Топчиева Людмила Владимировна

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

тел. (8142) 571879

Батова Юлия Валерьевна

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

эл. почта: batova@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 762706

Титов Александр Федорович

председатель КарНЦ РАН, чл.-корр. РАН, д. б. н. Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: krcras@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 769710

Repkina, Natalia

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

Talanova, Vera

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

Topchieva, Lyudmila

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

Batova, Yulia

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

Titov, Alexandr

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences 11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia e-mail: krcras@krc.karelia.ru tel.: (8142) 769710 УДК 581.1: 581.2.02

ГЕНЕРАЦИЯ СУПЕРОКСИДНОГО АНИОН-РАДИКАЛА В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

К. А. Сазанова, Д. И. Башмаков, А. С. Лукаткин

Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва

Спектрофотометрическим методом определяли генерацию супероксидного анион-радикала (O_2) в листьях молодых растений пшеницы, кукурузы и огурца при хроническом (7 суток) действии ионов Zn^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} (от 10 мкМ до 1 мМ). Скорость генерации O_2 повышалась с увеличением концентрации Pb^{2+} и Ni^{2+} в среде, тогда как в опыте с Zn^{2+} не возрастала. Среди исследованных видов растения пшеницы оказались более устойчивыми к хроническому действию TM по сравнению с растениями огурца и кукурузы.

Ключевые слова: Cucumis sativus L., Triticum aestivum L., Zea mays L., тяжелые металлы, супероксидный анион-радикал.

K. A. Sazanova, D. I. Bashmakov, A. S. Lukatkin. GENERATION OF SUPEROXIDE ANION IN LEAVES OF SEEDLINGS UNDER LONG-TERM EXPOSURE TO HEAVY METALS

The generation of the superoxide anion in leaves of young *Cucumis sativus* L., *Triticum aestivum* L., *Zea mays* L. exposed to Zn^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} in different concentrations (from 10 μ M to 1 mM) was investigated by spectrophotometry. The rate of O_2^- generation increased with growing Pb^{2+} or Ni^{2+} , whereas in the Zn^{2+} treatment no increase was recorded. Wheat plants were more resistant to heavy metals than cucumber or maize.

Key words: Cucumis sativus L., Triticum aestivum L., Zea mays L., heavy metals, superoxide anion.

Введение

Среди многочисленных загрязнителей окружающей среды наиболее токсичными для живых организмов, в том числе растений, являются тяжелые металлы (ТМ). Естественные концентрации ТМ в природе, как правило, невелики [Казнина и др., 2009]. Загрязнение биосферы ТМ резко увеличилось с 1900 г. и во всем мире представляет серьезную проблему для окружающей среды и здоровья человека

[Ensley, Raskin, 2000]. В пределах наиболее густонаселенных территорий, где обитает более половины человечества, техногенное поступление многих химических элементов в среду превышает их природное содержание в гумусовой оболочке в сотни и тысячи раз [Бондарев, 1976; Башмаков, Лукаткин, 2009]. Значительное увеличение содержания ТМ в окружающей среде сопровождается их накоплением в растениях, что оказывает негативное влияние на рост, развитие и продуктивность. В связи с

этим изучение реакции растений на действие ТМ вызывает не только большой научный, но и практический интерес [Титов и др., 2007].

В последние годы развивается теория возникновения окислительного стресса при действии ТМ [Briat, Lebrun, 1999; Деви, Прасад, 2005; Полесская, 2007; Башмаков, Лукаткин, 2009; Прадедова и др., 2011]. Известно, что в растениях активированные формы кислорода (АФК) образуются главным образом в хлоропластах, митохондриях и плазмалемме как результат возбуждения атомов кислорода или окислительно-восстановительных реакций [Лукаткин, 2002а; Колупаев, Карпец, 2010]. Показано, что ТМ могут индуцировать образование отдельных АФК в клетках растений [Mittler, 2002; Lehotai et al., 2011]. Индуцированная ТМ продукция АФК может происходить вследствие непосредственного переноса электронов в реакциях, опосредованных ионами переходных металлов; нарушений метаболических процессов, приводящих к возрастанию генерации АФК; инактивации антиоксидантных ферментов; а также подавления неферментативных антиоксидантов [Dietz et al., 1999; Башмаков, Лукаткин, 2009]. В то же время не доказано, что все ТМ в различных концентрациях могут индуцировать усиление генерации АФК. Поскольку ведущую роль среди АФК играет супероксидный анион-радикал (О,), реакция систем его образования на действие ТМ наиболее важна для адаптивных или повреждающих процессов в растениях. Однако в литературных данных показаны неоднозначные изменения генерации АФК (в первую очередь 0,) у разных видов растений при действии различных концентраций ТМ.

Целью данного исследования явилось сравнительное изучение генерации супероксидного анион-радикала при хроническом действии различных концентраций эссенциальных (цинк и никель) и неэссенциальных (свинец) ТМ на проростки различных видов – огурца, пшеницы и кукурузы.

Материал и методы

Объектами исследования служили 7-дневные проростки растений огурца (*Cucumis sativus* L.) сорта Изящный, пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Мироновская 808 и кукурузы (*Zea mays* L.) гибрида РОСС-299 МВ.

Семена растений, предварительно обработанные $KMnO_4$, проращивали в чашках Петри на растворах, содержащих 10 мкМ, 0,1 или 1 мМ ионов Pb^{2+} , Ni^{2+} или Zn^{2+} (для пшеницы использовали только 10 мкМ и 1 мМ). Контролем

служили растения, выращенные на дистиллированной воде. Эксперимент проводили в водной культуре в факторостатных условиях (освещенность около 80 мкМ фотонов/м²·с, фотопериод 14 ч, температура 21 °C). На 7-е сутки определяли скорость генерации супероксидного анион-радикала по восстановлению адреналина в адренохром [Лукаткин, 2002б]. Высечки листьев (300 мг) гомогенизировали в 15 мл дистиллированной воды, затем гомогенат центрифугировали 15 мин при 4000 g. К 3 мл супернатанта добавляли 100 мкл 0,01 % раствора адреналина и инкубировали 45 мин при комнатной температуре и освещенности 80 мкМ фотонов/м²·с. Сразу после инкубации измеряли оптическую плотность образовавшегося адренохрома против гомогената с водой на спектрофотометре UV-mini 1240 (Shimadzu, Япония) при длине волны 480 нм. Скорость генерации $O_2^{\cdot-}$ рассчитывали в мкМ/г·мин $(\epsilon = 4020 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}).$

Повторности и статистическая обработка результатов. Все опыты проводили в 3 повторностях. Каждый опыт состоял из 2–3 биологических повторностей (высечек листьев с 10–15 проростков), каждый вариант включал 3 аналитические повторности. Результаты обрабатывали статистически по общепринятым биометрическим формулам с использованием пакетов прикладных программ «Microsoft Excel».

Результаты

Для оценки уровня генерации супероксида в листьях опытных растений, подвергнутых хроническому действию ТМ, использовали его реакцию с адреналином, приводящую к образованию адренохрома. Было обнаружено, что ионы ТМ индуцируют генерацию О2 в листьях, но с разной интенсивностью. Так, в проростках огурца максимальный уровень генерации супероксидного анион-радикала зарегистрирован в присутствии 1 мМ ионов Pb²⁺ (700 % к контролю) (табл. 1), меньшее усиление генерации О, в листьях выявлено при длительном действии ионов Zn²⁺ и Ni²⁺. При этом концентрационные зависимости действия ТМ также различались: минимальный уровень 0, -- на фоне Ni^{2+} и Pb^{2+} был при дозе 0,1 мМ (153 и 223 % к контролю, соответственно), более высокий - при дозах 10 мкМ и 1 мМ. Уровень генерации супероксида увеличивался от дозы 10 мкМ к дозе 1 мМ на 62 и 185 % для Ni²⁺ и Pb²⁺, соответственно (без учета концентрации ТМ 0,1 мМ, где он снижался на 254 и 292 % соответственно). На фоне ионов цинка картина была противоположной, т. е. при 1 мМ ионов Zn²⁺

отмечали минимальную скорость генерации O_2 . (161 % к контролю), а при 10 мкМ – максимальную (584 %).

Таблица 1. Скорость генерации супероксидного анион-радикала в листьях огурца при действии тяжелых металлов, мкМ/гр мин

Концентрация ТМ	Ni	Zn	Pb
0 (вода)		$1,3 \pm 0,16$	
10 мкМ	$5,29 \pm 0,25$	$7,59 \pm 0,12$	$6,70 \pm 0,16$
0,1 мМ	$1,99 \pm 0,21$	$4,99 \pm 0,31$	$2,90 \pm 0,22$
1 мМ	$6,1 \pm 0,20$	$2,09 \pm 0,14$	$9,10 \pm 0,11$

Выявлено, что в проростках пшеницы ионы ТМ в некоторых вариантах индуцировали повышенную генерацию супероксидного анион-радикала по отношению к контролю (табл. 2). Максимальный уровень супероксида зафиксирован при внесении в среду 1 мМ Ni^{2+} (157 % к контролю), тогда как при экспозиции растений на 10 мкМ Pb^{2+} отмечена минимальная скорость генерации $\mathrm{O_2}^{--}$ (ниже контроля). В опыте с Pb^{2+} увеличение концентрации ТМ в среде приводило к повышению скорости генерации супероксида в листьях пшеницы, тогда как в остальных случаях увеличение концентрации ТМ (цинка и никеля) достоверно не изменяло стационарный уровень $\mathrm{O_2}^{--}$.

Таблица 2. Скорость генерации супероксидного анион-радикала в листьях пшеницы при действии тяжелых металлов, мкМ/гр мин

Концентрация ТМ	Ni	Zn	Pb
0 (вода)			
10 мкМ	4,56 ± 1,81	$3,25 \pm 0,13$	$2,26 \pm 0,41$
1 мМ	$5,07 \pm 0,82$	$2,79 \pm 0,35$	$4,33 \pm 0,36$

У 7-дневных растений кукурузы скорость образования супероксидного анион-радикала в контроле была самой низкой среди трех изученных видов (табл. 3). Действие ТМ на генерацию О2- было наиболее выражено в опыте с Pb²⁺, который индуцировал максимальное возрастание уровня O₂ (327 и 320 % к контролю соответственно при концентрациях 1 мМ и 10 мкМ Pb^{2+}). Ионы Zn^{2+} также повышали скорости генерации О2-, в этом опыте заметна тенденция к почти линейному повышению генерации О₂ с возрастанием концентрации металла. Так, при 10 мкМ Zn²⁺ генерация супероксида в листьях кукурузы составляла 155 % к уровню контроля, при концентрации 0,1 мМ - 181 %, а при самой высокой концентрации (1 мМ) – 242 %. Ионы Ni²⁺ оказали неоднозначное влияние на скорость образования супероксида: если при 10 мкМ Ni²⁺ стационарный уровень O₃.был ниже контроля (59 %), при 0,1 мМ значение было на уровне контроля, то при 1 мМ генерация О₂ превышала контрольный уровень (160 %).

Таблица 3. Скорость генерации супероксидного анион-радикала в листьях кукурузы при действии тяжелых металлов, мкМ/гр мин

Концентрация ТМ	Ni	Zn	Pb
0 (вода)		0.83 ± 0.06	
10 мкМ	$0,49 \pm 0,05$	$1,29 \pm 0,12$	
0,1 мМ	0.88 ± 0.11	$1,50 \pm 0,10$	$2,13 \pm 0,13$
1 мМ	$1,33 \pm 0,12$	$2,01 \pm 0,16$	$2,72 \pm 0,07$

Обсуждение

Многие ТМ принадлежат к числу эссенциальных элементов, т. е. необходимых для жизнедеятельности организмов микроэлементов, участвующих в широком круге ферментативных окислительно-восстановительных реакций. Среди исследованных нами ТМ к такому типу металлов принадлежат Zn и Ni, которые проявляют высокую степень как биологической активности, так и токсичности [Серегин, Кожевникова, 2006; Wang et al., 2009]. Они активно вовлечены в клеточный метаболизм благодаря присутствию в молекулах многих белков [Clemens, 2006; Wang et al., 2009]. Например, Ni оказывает неспецифическое действие на целый ряд металло-ферментных комплексов [Кузнецов, Дмитриева, 2006]; при его недостатке наблюдаются нарушения азотистого обмена, цикла трикарбоновых кислот и дыхания [Башмаков, Лукаткин, 2009]. Цинк как микроэлемент необходим для роста и нормального развития растений; при недостатке Zn в растениях накапливаются редуцирующие сахара, небелковые соединения азота, органические кислоты, уменьшается содержание сахарозы и крахмала, ауксина, нарушается синтез белка, уменьшается митотическая активность клеток корневой меристемы, увеличивается число хромосомных аберраций [Obata et al., 2001; Серегин, Иванов, 2001; Башмаков, Лукаткин, 2009]. Однако в высоких концентрациях они токсичны для живых организмов [Иванова и др., 2010].

Свинец обнаружен в каждом растении, но не относится к эссенциальным элементам. В небольших количествах он повышает содержание крахмала, ускоряет прорастание растений; с другой стороны, Рb влияет на поглощение воды растением, ингибирует дыхание, биосинтез хлорофилла, минеральное питание, изменяет проницаемость клеточных мембран, гормональный баланс, а также нарушает транспорт кальция [Malcová, Gryndler, 2003; Atici et al., 2005; Rucinska, Gwozdz, 2005].

Токсическое действие ТМ проявляется угнетением роста, задержкой прорастания семян, торможением метаболизма [Серегин, Иванов, 2001]. Но очевидно, что первичные эффекты

ТМ связаны с генерацией АФК, происходящей на уровне клеток и их органелл. Например, 24-часовая обработка Cd растений риса приводила к повышенному образованию супероксидного радикала в развивающихся корнях [Choudhury, Panda, 2004]. Показано, что накопление супероксидного аниона и содержание H_2O_2 в обработанных 5 и 20 мкМ Cu^{2+} корнях $Panax\ ginseng\$ не возрастало, но увеличивалось при 50 мкМ Cu^{2+} [Babar et al., 2006].

Для сравнительной оценки степени токсичности ряда ТМ мы исследовали в листьях огурца, пшеницы и кукурузы уровень генерации одной из наиболее быстро образующихся в клетках растений АФК - супероксидного анион-радикала [Mittler, 2002; Stancheva et al., 2010]. При этом из данных литературы известно, что стресс-индуцированное усиление генерации О, преходящий характер; это показано при действии как пониженных температур на теплолюбивые растения [Лукаткин, 2002б], так и тяжелых металлов [Lukatkin et al., 2010; Lehotai et al., 2011]. В наших опытах с хроническим действием ТМ на растения разных видов выявлено, что ионы металлов в большинстве вариантов индуцируют повышенную генерацию O_2 в клетках растений, но с разной интенсивностью. Наибольшее возрастание генерации O_2^{-} отмечено в листьях огурца, а наименьшее - в листьях пшеницы. Возможно, это связано с исходным содержанием данной АФК в растениях, которое было максимальным у пшеницы и значительно более низким - у огурца и особенно у кукурузы. В то же время необходимо учитывать и фактор времени, поскольку в течение 7 суток выращивания растений на растворах ТМ скорость генерации АФК как сигнальной молекулы могла существенно измениться. Так, после обработки растений пшеницы 10 мкМ Ni на 3-й день уровень супероксида и Н₂О₂ составлял примерно 250 % по отношению к контролю, на 6-й и 9-й дни данные показатели несколько снижались, но превышали контроль [Gajewska, Sklodowska, 2007)]. В молодых растениях гороха обработка 100 мкМ CdCl₂ или CuSO₄ приводила к первоначальному (2 ч) возрастанию образования О2-, однако в последующем уровень суперок-СИДНОГО анион-радикала резко снижался [Lehotai et al., 2011].

Реакция растений была металлоспецифичной. Генерация супероксидного анион-радикала возрастала при действии на растения Ni^{2+} (кроме кукурузы в дозах 10 и 100 мкМ), Zn^{2+} (кроме пшеницы) и Pb^{2+} (кроме пшеницы в дозе 10 мкМ). При этом по степени увеличения токсичности для растений (при суммировании эф-

фектов разных концентраций) тяжелые металлы распределились в ряду Ni < Zn < Pb для огурца и кукурузы и Zn ≤ Pb < Ni для пшеницы. При этом не выявлено каких-либо существенных различий в генерации супероксидного анион-радикала в листьях растений при воздействии эссенциальных (Zn и Ni) и неэссенциального (Pb) TM.

Отклик растений на присутствие тяжелых металлов видоспецифичен. Так, на растения огурца и кукурузы наиболее токсичное действие оказали ионы Pb2+, на растения пшеницы ионы Ni²⁺. По степени ТМ-индуцированного возрастания О, изученные растения можно расположить в следующем ряду: пшеница < кукуруза < огурец. Разница в уровнях супероксидного анион-радикала при действии ионов ТМ на проростки растений, возможно, связана с различной способностью аккумулировать ТМ. Растения, относящиеся к разным семействам, заметно различаются по способности накапливать ТМ. В зависимости от вида растений содержание в них ТМ может изменяться во много раз (до 100 и более) [Титов и др., 2007].

Существует ряд метаболических путей, приводящих к генерации АФК при действии тяжелых металлов.

- 1) Повышенный уровень АФК в растениях в присутствии ТМ может быть результатом негативного влияния этих металлов на метаболические процессы, связанные с переносом электронов. Так, при избыточных концентрациях Ni²⁺ возникает дисбаланс между способностью утилизировать энергию в ходе ферментативных процессов фотосинтеза и количеством абсорбированного света [Серегин, Кожевникова, 2006]. Когда плотность потока фотонов велика, необходимо, чтобы происходила ассимиляция О, -, иначе нарушается электрон-транспортная цепь. В результате электроны переходят на альтернативные акцепторы, главным образом на молекулы кислорода, образуя О2. Более уязвим к ингибированию ТМ транспорт электронов в фотосистеме II [Gajewska, 2009].
- 2) Индуцированное ТМ снижение антиоксидантной активности. Спад антиоксидантной способности клеток в результате действия металлов считают причиной увеличения различных АФК в растениях, обработанных ТМ. В частности, недостаток низкомолекулярных антиоксидантов при стрессе металлов может привести к накоплению АФК и последующим окислительным повреждениям. Считается, что высокие концентрации аскорбата и глутатиона являются решающими в защите растений от окислительного стресса [Mittler, 2002]. Показано,

что экспозиция растений с TM снижала уровни глутатиона [Kukkola et al., 2000; Madhava Rao, Sresty, 2000) и аскорбата [Mishra, Agrawal, 2006) в тканях. Кроме того, TM могут вызывать снижение активности антиоксидантных ферментов. Так, снижение активности супероксиддисмутазы в листьях пшеницы, подвергнутых воздействию Ni^{2+} , сопровождалось накоплением O_2 ⁻⁻ в этих органах [Gajewska, Sklodowska, 2007].

3) АФК могут появляться в реакциях, катализируемых НАДФ-оксидазами [Gajewska, 2009]. При использовании НАДФ антиоксидантными ферментами в качестве донора электронов необходимо соответствующее количество этого вещества для эффективного функционирования антиоксидантной системы. В растениях НАДФ генерируется главным образом в пентозофосфатном пути (в цитозоле) и во время транспорта электронов в процессе фотосинтеза (в хлоропластах). Экспозиция растений с ТМ может воздействовать на метаболизм НАДФ путем ингибирования ферментов, вовлеченных в ее синтез [Randhawa et al., 2001].

Заключение

Согласно результатам исследований, ионы ТМ вызывают повышенную генерацию супероксидного анион-радикала в листьях огурца, пшеницы и кукурузы. Наиболее токсичное действие на растения оказали 1 мМ растворы ТМ (за исключением ионов Zn²+). Среди исследованных видов наиболее устойчивы к действию ТМ растения пшеницы. Выявленные различия в ответной реакции растений на действие ионов ТМ могут быть связаны с видовыми особенностями металлоустойчивости, а также неодинаковой эффективностью адаптационных механизмов, вовлеченных в защитно-приспособительные реакции растений.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы», проект 2.1.1/624).

Литература

Башмаков Д. И., Лукаткин А. С. Эколого-физиологические аспекты аккумуляции и распределения тяжелых металлов у высших растений. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2009. 236 с.

Бондарев Л. Г. Ландшафты, металлы и человек. М.: Мысль, 1976. 72 с.

Деви С. Р., Прасад М. Н. В. Антиокислительная активность растений *Brassica juncea*, подвергнутых действию высоких концентраций меди // Физиология растений. 2005. Т. 52, № 6. С. 233–237.

Иванова Е. М., Холодова В. П., Кузнецов Вл. В. Биологические эффекты высоких концентраций солей меди и цинка и характер их взаимодействия в растениях рапса // Физиология растений. 2010. Т. 57. С. 864–873.

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

Колупаев Ю. Е., Карпец Ю. В. Формирование адаптивных реакций на действие абиотических стрессоров. Киев: Основа, 2010. 352 с.

Кузнецов Вл. В., Дмитриева Г. А. Физиология растений. М.: Высшая школа, 2006. 742 с.

Лукаткин А. С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2002а. 208 с.

Лукаткин А. С. Вклад окислительного стресса в развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. 1. Образование активированных форм кислорода при охлаждении растений // Физиология растений. 2002б. Т. 49, № 5. С. 697–702.

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

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

Серегин И. В., Иванов В. Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // Физиология растений. 2001. Т. 48. С. 606–630.

Серегин И. В., Кожевникова А. Д. Физиологическая роль никеля и его токсическое действие на высшие растения // Физиология растений. 2006. Т. 53, № 2. С. 285–308.

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

Atici Ö., Ağar G., Battal P. Changes in phytohormone contents in chickpea seeds germinating under lead or zinc stress // Biologia Plantarum. 2005. Vol. 49, N 2. P. 215–222.

Babar A. M., Hahn Eun-Joo, Paek Kee-Yoeup. Copper-induced changes in the growth, oxidative metabolism, and saponin production in suspension culture roots of *Panax ginseng* in bioreactors // Plant Cell Repts. 2006. Vol. 25, N 10. P. 1122–1132.

Briat J. F., Lebrun M. Plant responses to metal toxity // Plant Biology and Pathology. 1999. Vol. 322, N 1. P. 43–54.

Choudhury S., Panda S. K. Role of salicylic acid in regulating cadmium induced oxidative stress in *Oryza sativa* L. roots // Bulg. J. Plant Physiol. 2004. Vol. 30, N 3-4. P. 95-110.

Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants // Biochemistry. 2006. Vol. 88. P. 1707–1719.

Dietz K.-J., Baier M., Kramer U. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants // Heavy metal stress in plants – From

biomolecules to ecosystems / Eds. M. N. V. Prasad, J. Hagemeyer, Berlin: Springer-Verlag, 1999, P. 73-97.

Doncheva S., Stoyanova Z., Velikova V. Influence of succinate on zinc toxicity of pea plants // J. Plant Nutrition. 2001. Vol. 24, N 6. P. 789-804.

Ensley B. D., Raskin Eds. I. Rational for use of phytoremediation // Phytoremediation of toxic metals -Using plants to clean up the environment, 2000, P. 3-12.

Gajewska E. Nickel toxicity in plants: oxidative stress // Nickel in relation to plants / Eds.: Barket Ali, S. Hayat, A. Ahmad. New Delhi; Chennai; Mumbai; Kolkata: Narosa Publishing House, 2009. Chapter 5. P. 89-116.

Gaiewska E., Sklodowska M. Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves // BioMetals. 2007. Vol. 20. P. 27-36.

Kukkola E., Rautio P., Huttunen S. Stress indications in copper- and nickel-exposed Scots pine seedlings // Environ. Exp. Bot. 2000. Vol. 43. P. 197-210.

Lehotai N., Pető A., Bajkán S. et al. In vivo and in situ visualization of early physiological events induced by heavy metals in pea root meristem. Physiologiae Plantarum (In Press). DOI: 10.1007/s11738-011-0759-z

Lukatkin A. S., Kistenjova T. E., Teixeira da Silva J. A. Oxidative stress in cucumber (Cucumis sativus L.) leaf cells. Short-term influence of heavy metals (lead and copper) // Plant Stress. 2010. Vol. 4. P. 44-49.

Madhava Rao K. V., Sresty T. V. S. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (Cajanus cajan (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses // Plant Sci. 2000. Vol. 157. P. 113-128.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Сазанова Кристина Александровна

аспирант кафедры ботаники и физиологии растений Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева ул. Большевистская, 68, Саранск, Республика Мордовия, Россия, 430005

эл. почта: krissaz@rambler.ru

тел.: (8342) 322507

Башмаков Дмитрий Идрисович

старший научный сотрудник кафедры ботаники и физиологии растений, к. б. н., доцент

Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева ул. Большевистская, 68, Саранск, Республика Мордовия, Россия, 430005

эл. почта: aslukatkin@yandex.ru

тел.: (8342) 322507

Лукаткин Александр Степанович

заведующий кафедрой ботаники и физиологии растений, д. б. н., профессор

Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева ул. Большевистская, 68, Саранск, Республика Мордовия, Россия, 430005

эл. почта: dimabashmakov@yandex.ru

тел.: (8342) 322507

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

Mishra S., Agrawal S. B. Interactive effects between supplemental ultraviolet-B radiation and heavy metals on the growth and biochemical characteristics of Spinacia oleracea L. Braz. // J. Plant Physiol. 2006. Vol. 18. P. 307-314.

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

Obata H., Kawamura S., Jshnnoyama A. et al. Free radical injury in rice leaf under Zn deficiency // Soil. Sci. Plant. Nutr. 2001. Vol. 47, N 1. P. 205-211.

Randhawa V. K., Zhou F., Jin X. et al. Role of oxidative stress and thiol antioxidant enzymes in nickel toxicity and resistance in strains of the green alga Scenedesmus acutus L. alternans // Can. J. Microbiol. 2001. N 7. P. 987-993.

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

Stancheva I., Geneva M., Hristozkova M. et al. Antioxidant capacity of sage grown on heavy metalpolluted soil // Физиология растений. 2010. Т. 57. C. 857-863.

Wang C., Zhang S. H., Wang P. F. et al. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedling // Chemosphere. 2009. Vol. 75. P. 1468-1476.

Sazanova, Kristina

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

Bashmakov, Dmitry

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

Lukatkin, Aleksandr

Mordovia State University 68 Bolshevistskay St., 430005 Saransk, Mordovia, Russia e-mail: dimabashmakov@vandex.ru

tel.: (8342) 322507

УДК 574.24: 595.371: 556.166.2

РЕАКЦИЯ БАЙКАЛЬСКОЙ АМФИПОДЫ GMELINOIDES FASCIATUS STEBBING НА ДЕЙСТВИЕ ЛИВНЕВЫХ СТОКОВ ГОРОДА ПЕТРОЗАВОДСКА

А. И. Сидорова¹, Н. М. Калинкина¹, И. В. Дыдик²

За последнее десятилетие в Онежском озере по всей литоральной зоне распространилась амфипода *Gmelinoides fasciatus* Stebbing 1899 (Gammaridae). Рачок был интродуцирован в водоемы европейской части России из байкальского региона в 1970-х гг. В целом на литорали Онежского озера численность и биомасса G. fasciatus достигают высоких значений (численность — более 5000 экз./м² и биомасса — более 5,5 г/м²). В то же время в Петрозаводской губе, в районе городского побережья, численность данного вида невысока — 132-462 экз./м². Поскольку в залив поступают ливневые стоки города Петрозаводска, возникла необходимость определения их токсичности для этого вида и эколого-токсикологической оценки состояния прибрежной части залива. В статье представлены результаты биотестирования ливневых стоков с использованием двух видов — G. fasciatus и стандартного тест-объекта Ceriodaphnia affinis.

K лючевые слова: ливневые стоки, биотестирование, региональный тестобъект, *Gmelinoides fasciatus, Ceriodaphnia affinis*, Петрозаводская губа Онежского озера.

A. I. Sidorova, N. M. Kalinkina, I. V. Dydik. REACTION OF THE BAIKALIAN AMPHIPOD *GMELINOIDES FASCIATUS* STEBBING TO THE IMPACT OF STORMWATER FROM THE CITY OF PETROZAVODSK

The amphipod *Gmelinoides fasciatus* has spread throughout the littoral zone of Lake Onego over the past decade. The species was introduced into inland waterbodies of European Russia from the Baikal region in the 1970s. In Lake Onego the population indices of the species are relatively high (abundance – over 5000 ind./ m^2 , biomass – over 5.5 g/ m^2). At the same time, in the Petrozavodsk Bay, near the city of Petrozavodsk, the species abundance is quite low – 132–462 ind./ m^2 . Great volumes of stormwater flow into the bay from the city of Petrozavodsk necessitating an assessment of the toxicity of the stormwater for *G. fasciatus* and of the environmental and toxicological status of the Petrozavodsk Bay littoral ecosystem. The results of stormwater bioassays using two species – *G. fasciatus* and the standard test organism *Ceriodaphnia affinis* are presented in this paper.

Key words: stormwater, bioassay, regional test organism, *Gmelinoides fasciatus, Ceriodaphnia affinis*, Petrozavodsk Bay of Lake Onego.

¹ Институт водных проблем Севера Карельского научного центра РАН

²Петрозаводский государственный университет

Введение

В 2001 г. в Онежском озере был обнаружен вид-вселенец Gmelinoides fasciatus Stebbing 1899, имеющий байкальское происхождение [Березина, Панов 2003; Матафонов и др., 2005]. Амфипода G. fasciatus широко использовалась в ряде работ по акклиматизации беспозвоночных животных в водоемы-реципиенты в целях увеличения их продуктивности. Рачок G. fasciatus был интродуцирован в 1960-1970-х гг. в ряд озер и водохранилищ европейской части России из Байкала. Впоследствии вид-вселенец успешно акклиматизировался и начал проникать в другие водоемы. К 1996 г. вид заселил всю литоральную зону Ладожского озера [Панов, 1994; Матафонов и др., 2005].

В последнее десятилетие вселенец G. fasciatus широко распространился в литоральной зоне Онежского озера [Кухарев и др., 2008]. Показатели его численности достигают более 5000 экз./м², биомассы – более 5,5 г/м². В то же время на литорали Петрозаводской губы, в районе водозабора питьевой воды для г. Петрозаводска, зарегистрированы низкие показатели численности G. fasciatus – 132–462 экз./м². [Калинкина и др., 2006].

Побережье Петрозаводской губы подвергается действию ливневых стоков, объемы которых достигают 10 млн м³/год [Сабылина, 2007]. Загрязнение прибрежной зоны в районе водозабора приводит к заметному изменению химического состава воды и донных отложений Петрозаводской губы. Так, в мае 2003 г. в районе водозабора концентрация в донных отложениях нефтяных углеводородов была весьма высока (0,023 %) и значительно превышала содержание нефтепродуктов в районе пляжа «Пески» (0,006 %) [Белкина, 2007].

Уменьшение численности популяции *G. fasciatus* в районе водозабора могло быть связано с загрязнением прибрежной зоны Петрозаводской губы ливневыми стоками. Для проверки этого предположения, а также для оценки экологической ситуации в районе водозабора были запланированы эксперименты по оценке токсичности ливневых стоков для вида *G. fasciatus*. Одновременно в опытах использовали стандартный тест-объект – ветвистоусого рачка *Ceriodaphnia affinis* Lillijeborg 1900 [Чалова, Крылов, 2007].

Цель настоящей работы – изучить реакцию видов G. fasciatus и C. affinis на действие ливневых вод, поступающих в Петрозаводскую губу в районе водозабора. Задачи, которые ре-

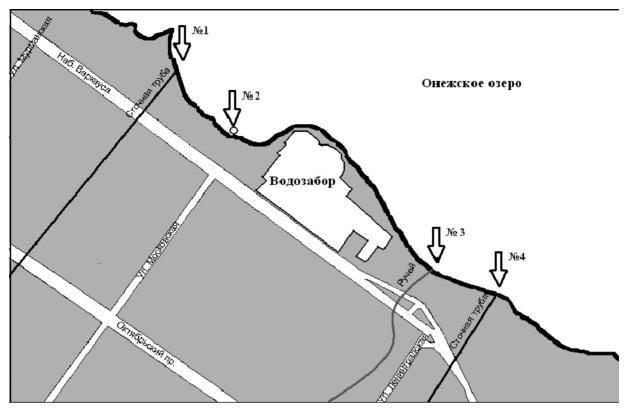
шались в ходе исследования: выполнить оценку токсичности ливневых стоков для двух видов ракообразных *G. fasciatus* и *C. affinis*; оценить возможность использования *G. fasciatus* как регионального тест-объекта при биотестировании сточных вод; оценить экологическую ситуацию в зоне водозабора на основе результатов биотестирования.

Материал и методы

Оценка экологической ситуации в районе водозабора и исследование токсичности ливневых стоков были выполнены методами биотестирования [Строганов, 1971], которые позволяют оценить совокупное влияние компонентов ливневых стоков, тогда как гидрохимические методы дают информацию о содержании отдельных токсикантов. Преимуществом методов биотестирования является способность живых организмов воспринимать более низкие концентрации веществ, чем любой аналитический датчик [Биологический контроль..., 2010; Штамм и др., 2011].

Исследования по биотестированию проводились в июле в 2010 г. и в мае – июле 2011 г. Пробы воды отбирали на 4 станциях (рис.): станции № 1, 4 – выходы труб, по которым ливневые стоки попадают в Петрозаводскую губу; № 2 – озерная станция, расположенная на расстоянии 1 м от берега и глубине 30 см; № 3 – это устье ручья, впадающего в Петрозаводскую губу в районе ул. Ленинградской. В 2010 г. пробы воды отбирались 3 раза с периодичностью один раз в неделю, в 2011 г. – также 3 раза с периодичностью один раз в 15—20 дней.

В опытах использовали индивидуальную посадку животных. Амфиподу G. fasciatus (молодь размером 1,5-3 мм) отлавливали на литорали Онежского озера в районе пригорода г. Петрозаводска, здесь же отбирали воду для контрольного варианта. В 2010 г. было поставлено 3 серии опытов в 7 повторностях, в 2011 г. – 2 серии опытов в 7 повторностях (всего использовано 700 экземпляров). Рачков кормили 1 раз в сутки нитчатыми водорослями. Биотестирование ливневых стоков с использованием вида C. affinis проводили согласно методическим рекомендациям [Жмур, 2001]. В качестве контроля применяли воду, взятую из родника на ул. Вольной (г. Петрозаводск). В 2010 и 2011 гг. было поставлено по 3 серии опытов в 7 повторностях (всего использовано 840 экземпляров). Рачков кормили один раз в сутки суспензией зеленых водорослей. Воду заменяли на свежую через сутки.



Карта-схема расположения станций отбора проб ливневых вод:

ст. 1 – сточная труба, из которой ливневые стоки поступают в озеро в районе ул. Мурманской; ст. 2 – литоральная часть озера с левой стороны от водозабора; ст. 3 – ручей, впадающий в озеро с правой стороны от водозабора; ст. 4 – сточная труба, из которой ливневые стоки поступают в озеро в районе ул. Ленинградской

Продолжительность опытов с каждым видом рачков в 2010 г. составила 7 суток, в 2011 г. – 14 суток. Исследовали действие неразбавленных образцов воды, а также их 2-кратного, 5-кратного и 10-кратного разведений. Во время опытов температура варьировала в пределах 19–23 °С. Достоверность различий между опытными и контрольными показателями выживаемости оценивали с использованием критерия Фишера (F) с φ -преобразованием [Ивантер, Коросов, 2003].

Результаты и обсуждение

Результаты исследований за 2010 г., когда продолжительность опытов составила 7 дней, показали, что наиболее токсичные неразбавленные пробы ливневых стоков были обнаружены на станции № 1 (табл. 1). Выживаемость *G. fasciatus* в этих пробах снижалась до 14 %. С увеличением разведения выживаемость возрастала до 100 %. В пробах воды из ручья (станция № 3) выживаемость вида-вселенца также оказалась весьма низкой – 29 %. Согласно классификации токсичности сточных вод [Строганов, 1971], пробы воды со станций № 1 и 3 можно охарактеризовать как сильно токсичные. Ливневая вода со стока № 4 имела наи-

меньшую степень токсичности, так как выживаемость *G. fasciatus* в этих пробах варьировала в пределах 71–100 %.

Особо выделяется озерная станция № 2 (литоральная зона вблизи водозабора). В пробе, взятой 6 июля 2010 г., наблюдали полное вымирание вида *G. fasciatus*. Разбавление пробы контрольной водой в 2–10 раз не снижало ее токсического действия на рачков (см. табл. 1). Токсичность озерной воды со станции № 2 характеризуется как весьма сильная. Важно отметить, что сроки обнаружения токсичности озерной воды (6 июля) совпали со сроками высокой токсичности ливневых стоков (станции № 1 и 3). Следовательно, именно ливневые стоки обусловливают неблагоприятную ситуацию в литоральной зоне Петрозаводской губы.

В 2010 г. на протяжении всего периода исследования неразбавленная вода ливневых стоков, а также ее разведения не оказали существенного влияния на выживаемость рачков *С. affinis* (см. табл. 1). Исключение составила озерная станция № 2: в пробах воды с этой станции выживаемость ветвистоусых рачков снижалась до 29 %. Таким образом, по данным 2010 г. вид *G. fasciatus* оказался более чувствителен к воздействию ливневых стоков, чем ветвистоусый рачок *С. affinis*.

Таблица 1. Выживаемость (%) Gmelinoides fasciatus и Ceriodaphnia affinis в ливневых стоках в 2010 г., экспозиция 7 суток

Nº	Разбав-	_	Gmelinoides fasciatus			Ceriodaphnia affinis		
стан-	ление	6	13	21	6	13	21	
ции		июля	июля	июля	июля	июля	июля	
1	K	100	100	100	100	100	100	
	н/р	14*	57*	71	100	86	71	
	2x	71	86	86	100	100	71	
	5x	86	86	86	86	86	86	
	10x	100	100	100	100	100	86	
2	K	100	100	100	100	100	100	
	н/р	0*	86	100	29*	71	100	
	2x	0*	100	86	43*	86	86	
	5x	14*	100	100	86	100	100	
	10x	29*	86	100	86	86	100	
3	K	100	100	100	100	100	100	
	н/р	29*	57*	86	86	86	100	
	2x	71	71	86	71	100	100	
	5x	43*	86	86	86	100	100	
	10x	71	86	86	100	86	100	
4	K	100	100	100	100	100	100	
	н/р	86	71	100	86	100	100	
	2x	71	71	86	100	100	100	
	5x	100	86	100	100	100	100	
	10x	86	100	86	100	86	100	

Примечание. Здесь и в табл. 2–3: К – контроль; н/р – неразбавленный ливневый сток; 2x – двукратное разведение ливневых стоков; 5x – пятикратное разведение ливневых стоков; 10x – десятикратное разведение ливневых стоков. № 2 – озерная станция (объяснения см. в тексте). * – отличия от контроля достоверны (р < 0,05).

Данные опытов за 2011 г. при продолжительности 7 суток в целом совпадают с материалами, полученными в 2010 г. (табл. 2). Однако пробы воды со станции № 1 оказали менее негативное воздействие (средней степени токсичности) на G. fasciatus по сравнению с 2010 г. Вода из ручья (станция № 3) характеризовалась также сильной токсичностью: 20 июня 2011 г. была зафиксирована полная гибель тест-объектов. В течение двух лет исследований ливневый сток № 4 оказывал самое слабое токсическое действие на тест-объекты. Образцы воды со станции № 2, которая находится на литорали Петрозаводской губы, оказывали сильное токсическое влияние на байкальскую амфиподу, выживаемость организмов снижалась до 29 %.

При экспозиции 7 суток в 2010 г. для вида *G. fasciatus* (см. табл. 1) было отмечено 58 % случаев слабой токсичности стоков от числа всех опытов, проведенных в этом году, в то время как в 2011 г. число таких случаев составило 38 % (см. табл. 2). Число случаев средней токсичности стоков в 2010 г. составляло 17 %, в 2011 г. – 38 %. В первый год исследования было обнаружено 8 % случаев очень сильного токсического действия стоков и 17 % сильного воздействия на байкальскую амфиподу. В 2011 г. было установлено

25 % случаев сильной токсичности стоков *G. fasciatus* от общего количества опытов. Эти данные позволяют считать ситуацию в районе водозабора на литорали Петрозаводской губы крайне неблагополучной.

Таблица 2. Выживаемость (%) Gmelinoides fasciatus и Ceriodaphnia affinis в ливневых стоках в 2011 г., экспозиция 7 суток

№ стан-	Разбав-		Gmelinoides fasciatus		Ceriodaphnia affinis		
ции	ление	20 июня	4 июля	30 мая	20 июня	4 июля	
1	K	100	100	100	100	100	
	н/р	57*	86	86	71	86	
	2x	86	100	100	100	100	
	5x	86	100	86	86	100	
	10x	100	100	100	100	100	
2	K	100	100	100	100	100	
	н/р	29*	57*	71	57*	86	
	2x	100	71	100	100	100	
	5x	86	86	86	86	100	
	10x	100	100	100	100	100	
3	K	100	100	100	100	100	
	н/р	0	29*	43*	57*	86	
	2x	71	71	86	100	100	
	5x	71	71	86	86	100	
	10x	100	100	100	100	100	
4	K	100	100	100	100	100	
	н/р	86	86	71	71	71	
	2x	100	100	86	100	100	
	5x	86	100	86	86	86	
	10x	86	100	100	100	100	

В период исследования 2011 г. при экспозиции 7 суток ветвистоусый рачок C. affinis вновь проявил большую устойчивость по сравнению с видом G. fasciatus. В целом выживаемость C. affinis в разных пробах варьировала в пределах 71–100 %, исключение составляли станции № 2 и 3, где в неразбавленных пробах выживаемость цериодафний снижалась до 57 и 43 %, соответственно.

В 2011 г. продолжительность опытов была увеличена до 14 суток (табл. 3). Это привело к существенному усилению токсического действия исследуемых образцов воды на тест-объекты. Выживаемость *G. fasciatus* в разных пробах снизилась на 14–57 % по сравнению с данными опытов, продолжительность которых составляла 7 суток (см. табл. 2).

Выживаемость *С. affinis* при экспозиции 7 суток варьировала в пределах 43–86 % (см. табл. 2), при увеличении продолжительности опытов до 14 суток выживаемость ветвистоусых рачков уменьшилась до 14–71 % (см. табл. 3). Согласно разработанной классификации [Строганов, 1971], показатели токсичности тестируемых образцов воды для *С. affinis* возросли от слабой степени до средней.

Таблица 3. Выживаемость (%) Gmelinoides fasciatus и Ceriodaphnia affinis в ливневых стоках в 2011 г., экспозиция 14 суток

Nº	Раз-	Gmelir	noides	Ceriodaphnia		
стан-	бав-	fasci	iatus	affinis		
ции	ление	20 июня	4 июля	30 мая	20 июня	4 июля
1	K	100	86	100	100	100
	н/р	14*	43*	71	57*	29*
	2x	43*	71	86	86	71
	5x	71	86	100	86	86
	10x	86	86	100	100	86
2	K	86	100	100	100	100
	н/р	14*	14*	43*	43*	29*
	2x	43*	43*	71	71	57*
	5x	71	57*	86	86	86
	10x	86	86	100	100	86
3	K	86	100	100	100	100
	н/р	0	14*	14*	57*	43*
	2x	0	43*	71	86	71
	5x	29*	57*	86	100	86
	10x	43*	86	100	100	100
4	K	86	100	100	100	100
	н/р	43*	57*	57*	71	71
	2x	57*	86	71	86	86
	5x	71	100	71	86	100
	10x	71	100	100	100	100

Таким образом, результаты биотестирования ливневых стоков свидетельствуют о крайне неблагоприятной экологической ситуации на побережье Петрозаводской губы в районе водозабора. Ливневые стоки, поступающие с берега в этот район, характеризовались в основном высокой степенью токсичности, что, повидимому, объясняет низкую численность G. fasciatus на этом участке Петрозаводской губы.

В литературе имеются сведения о применении вида-вселенца при изучении токсичности отдельных химических компонентов. Так, изучалась реакция G. fasciatus на действие калия, кальция, натрия и магния [Березина, 2003], хлорида кадмия [Тимофеев, 2010] и лигносульфоната натрия [Высоцкая и др., 2011]. В наших экспериментах установлена более высокая чувствительность G. fasciatus к ливневым стокам по сравнению со стандартным тест-объектом C. affinis. Эти данные хорошо согласуются с результатами биотестирования техногенных вод Костомукшского ГОКа, согласно которым вид G. fasciatus оказался значительно более чувствительным по сравнению с видом C. affinis [Калинкина и др., 2011]. Это позволяет рекомендовать G. fasciatus в качестве регионального тест-объекта для оценки токсичности не только ливневых стоков, но и сточных вод различных видов производств, поступающих в водные объекты Карелии.

Выводы

1. Биотестирование ливневых стоков, поступающих в Петрозаводскую губу Онежского озе-

ра в районе водозабора, с использованием двух видов тест-объектов – *Gmelinoides fasciatus* и *Ceriodapnia affinis* – позволило обнаружить их токсичность, которая варьировала от слабой до весьма высокой.

- 2. Эколого-токсикологическая ситуация на литорали Петрозаводской губы в районе водозабора питьевой воды для г. Петрозаводска характеризуется как крайне неблагоприятная.
- 3. В опытах по биотестированию ливневых и промышленных стоков вид *G. fasciatus* по сравнению со стандартным тест-объектом *C. affinis* проявил большую чувствительность, что позволяет рекомендовать его как региональный тест-объект для оценки токсичности сточных вод различных видов производств, поступающих в водные объекты Карелии.

Литература

Белкина Н. А. Химический состав донных отложений // Состояние водных объектов Республики Карелия. По результатам мониторинга 1998–2006 гг. Петрозаводск: Карельский НЦ РАН, 2007. С 40–49.

Березина Н. А. Резистентность пресноводных беспозвоночных к изменению минерализации воды // Экология. 2003. № 4. С. 296–301.

Березина Н. А., Панов В. Е. Вселение байкальской амфиподы *Gmelinoides fasciatus* (Amphipoda, Crustacea) в Онежское озеро // Зоологический журнал. 2003. Т. 82, № 6. С. 731-734.

Биологический контроль окружающей среды: Биоиндикация и биотестирование: Учебное пособие для студ. высш. учеб. заведений / Ред. О. П. Мелехова, Е. И. Сарапульцева. 3-е изд., стереотип. М.: Академия, 2010. 288 с.

Высоцкая Р. У., Калинкина Н. М., Кононова (Ткач) Н. П. Изменение липидного состава амфипод Gmelinoides fasciatus под влиянием лигносульфаната натрия // Современные проблемы водной токсикологии: Материалы конф. (17–19 мая 2011 г., г. Петрозаводск). Петрозаводск: ПетрГУ, 2011. С. 29–32.

Жмур Н. С. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости цериодафний. М.: АКВАРОС, 2001. 52 с.

Ивантер Э. В., Коросов А. В. Введение в количественную биологию: Учеб. пособие. Петрозаводск: ПетрГУ, 2003. 304 с.

Калинкина Н. М., Сярки М. Т., Федорова А. С. Динамика популяционных показателей инвазионного вида Gmelinoides fasciatus (Stebbing) в Петрозаводской губе Онежского озера // Северная Европа в 21 веке: Природа, культура, экономика. Материалы Междунар. конф., посвящ. 60-летию КарНЦ РАН (24–27 окт. 2006 г., г. Петрозаводск). Секция «Биологические науки». Секция «Науки о земле». Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2006. С. 269–271.

Калинкина Н. М., Чекрыжева Т. А., Куликова Т. П., Рябинкин А. В. Особенности реакции биоты водоемов Карелии на изменение ионного состава воды в условиях воздействия отходов горнорудного производства // Тр. Карельского НЦ РАН. 2011. № 4. C. 29–34.

Кухарев В. И., Полякова Т. Н., Рябинкин А. В. Распространение байкальской амфиподы *Gmelinoides fasciatus* (Amphipoda, Crustacea) в Онежском озере // Зоологический журнал. 2008. Т. 87, № 10. С. 1270–1273.

Матафонов Д. В., Итигилова М. Ц., Камалтынов Р. М., Фалейчик Л. М. Байкальский эндемик Gmelinoides fasciatus (Micruropodidae, Gammaroidae, Amphipoda) в озере Арахлей // Зоологический журнал. 2005. Т. 84, № 3. С. 321–329.

Панов В. Е. Байкальская эндемичная амфипода Gmelinoides fasciatus Steb. в Ладожском озере // Доклады Академии Наук. 1994. Т. 336, № 2. С. 279–282.

Сабылина А. В., Рыжаков А. В. Химический состав воды озера // Состояние водных объектов Республики Карелия. По результатам мониторинга

1998–2006 гг. Петрозаводск: Карельский НЦ РАН, 2007. C. 29–40.

Строганов Н. С. Методика определения токсичности водной среды // Методики биологических исследований по водной токсикологии. М.: Наука, 1971. С. 14–60.

Тимофеев М. А. Экологические и физиологические аспекты адаптации к абиотическим факторам среды эндемичных байкальских и палеарктических амфипод: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Томск, 2010. 44 с.

Чалова И. В., Крылов А. В. Оценка качества природных сточных вод методами биотестирования с использованием ветвистоусых ракообразных (Cladocera, Crustacea). Рыбинск: Рыбинский дом печати. 2007. 73 с.

Штамм Е. В., Скурлатов Ю. В., Козлова Н. Б. и др. Биотестирование в оценке эффективности технологий очистки сточных вод // Водные ресурсы. 2011. Т. 38. № 2. С. 232–238.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Сидорова Анастасия Ивановна

аспирант

Институт водных проблем Севера Карельского научного центра РАН

пр. А. Невского, 50, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185003

эл. почта: bolt-nastya@yandex.ru

Калинкина Наталия Михайловна

зав. лаб. гидробиологии, д. б. н.

Институт водных проблем Севера Карельского научного центра РАН

пр. А. Невского, 50, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185003

эл. почта: Kalina@nwpi.krc.karelia.ru

тел.: (8921) 4555547

Дыдик Ирина Владимировна

студентка 5 курса ЭБФ ПетрГУ Петрозаводский государственный университет пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: Kalina@nwpi.krc.karelia.ru

Sidorova, Anastasia

Northern Water Problems Institute, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences 50 A. Nevsky St., 185030 Petrozavodsk, Karelia, Russia e-mail: bolt-nastya@yandex.ru

Kalinkina, Natalia

Northern Water Problems Institute, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences 50 A. Nevsky St., 185030 Petrozavodsk, Karelia, Russia e-mail: Kalina@nwpi.krc.karelia.ru tel.: (8921) 4555547

Dydik, Irina

Petrozavodsk State University 33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia e-mail: Kalina@nwpi.krc.karelia.ru УДК 577.155: 594.124

СПЕКТР ИЗОФОРМ КИСЛОЙ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗЫ В ТКАНЯХ МИДИЙ *MYTILUS EDULIS* В УСЛОВИЯХ МОДЕЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ НЕФТЕПРОДУКТАМИ

В. С. Скидченко, Р. У. Высоцкая, Н. Н. Немова

Институт биологии Карельского научного центра РАН

В аквариальных экспериментах изучено влияние различных концентраций (1,9—38,8 мг/л) нефтепродуктов (дизельное топливо) на активность лизосомальной дезоксирибонуклеазы беломорских мидий *Mytilus edulis* L. Установлено, что наиболее значительные изменения в активности и наборе изоформ ДНКазы происходили в мягких тканях моллюсков под воздействием малых (1,9 мг/л) и умеренных (8,4 и 17,4 мг/л) доз дизельного топлива. При высоких концентрациях нефтяных углеводородов (38,8 мг/л) нуклеазная активность и фракционный состав фермента в опыте и контроле отличались незначительно. Обсуждаются возможные механизмы, обеспечивающие высокую устойчивость мидий к нефтяному загрязнению, и роль нуклеаз в выбираемых стратегиях биохимической адаптации, отличающихся степенью вовлечения генома в реализацию компенсаторных перестроек метаболизма, при воздействии на моллюсков разных доз поллютанта.

Ключевые слова: *Mytilus edulis* L., кислая ДНКаза, изоформы, влияние нефтепродуктов.

V. S. Skidchenko, R. U. Vysotskaya, N. N. Nemova. THE RANGE OF ACID DEOXYRIBONUCLEASE ISOFORMS IN THE TISSUES OF *MYTILUS EDULIS* MUSSELS IN MODEL EXPERIMENTS WITH PETROLEUM HYDROCARBON POISONING

The effect of various concentrations (1.9–38.8 mg/l) of oil products (diesel fuel) on the activity of lysosomal deoxyribonuclease in White Sea mussels *Mytilus edulis* L. were studied in aquarium experiments. The most significant changes in the activity and range of DNase isoforms occurred in soft tissues under the impact of low (1.9 mg/l) and medium (8.4 & 17.4 mg/l) doses of diesel fuel. When the concentrations of petroleum hydrocarbons were high (38.8 mg/l) differences in the nuclease activity and the fractional composition of the enzyme between the treatment and the control were minor. We discuss the potential mechanisms behind the high resistance of the mussels to oil pollution, and the role of nucleases in the selected biochemical adaptation strategies, which differ in the involvement of the genome in the compensatory adjustments of the metabolism in response to different doses of the pollutant.

Key words: Mytilus edulis L., acid DNase, isoforms, effect of oil products.

Введение

Изучению биологических эффектов нефти и нефтепродуктов (НП) уделяется большое внимание [Яблоков, Остроумов, 1985; Патин, 2001]. В последние десятилетия, однако, среди такого рода работ наблюдается некоторый дисбаланс. Подавляющее большинство исследований направлено на тестирование токсичности индивидуальных компонентов нефти, главным образом, ароматических и полициклических нефтеуглеводородов как наиболее опасных поллютантов нефтяного происхождения [Миронов и др., 1990; Головина, Бочко, 2005; Гайсина, 2007]. В реальности же организмы, как правило, подвергаются воздействию многокомпонентных смесей, каковыми являются сырая нефть, различные виды тяжелого и легкого топлива, попадающие в воды морей и океанов при аварийных сбросах нефтепродуктов. Токсичность смеси часто выше, чем отдельных ее составляющих. В связи с этим, на наш взгляд, особенно важно изучать биологические эффекты нефтепродуктов именно в этих формах, что позволит экстраполировать данные, полученные в модельных экспериментах, на реальные экологические ситуации.

Двустворчатые моллюски рода Mytilus традиционно используются в биотестировании состояния морских экосистем. Обоснование этого детально изложено в публикациях проекта «The Mussels Watch» [Farrington et al., 1983; Goldberg, 1986].

В клетках эукариот лизосомальный аппарат представляет собой «вторую линию защиты» [Moore et al., 2007] от различного рода токсикантов, вступающую в действие после ферментов биотрансформации и детоксификации. Протекторная функция лизосом заключается в удалении из клетки поврежденных макромолекул, белков, синтезированных с ошибочной первичной или пространственной структурой, поврежденных органелл и даже частей ядра с содержащейся в нем ДНК [Bergamini et al., 2003; Cuervo, 2004; Ji, Kaplowitz, 2006)]. В случае, когда аутофагической защиты оказывается недостаточно, лизосомы могут инициировать апоптоз необратимо поврежденных клеток [Lockshin, Zakeri, 2004; Kiffin et al., 2007]. Из сказанного понятно, что исследование состояния лизосомального аппарата клетки позволяет не только диагностировать наличие токсического эффекта поллютанта, но и составить прогноз о возможности восстановления организма после этого воздействия [Высоцкая, Немова, 2008; Köhler et al., 2002: Moore et al., 2006a, b].

В последние десятилетия опубликован ряд работ, рассматривающих возможность использования лизосомальных нуклеаз в биомониторинге состояния морских и пресноводных экосистем [Попов и др., 2003; Коничев и др., 2005; Амелина, 2006; Мензорова, Рассказов, 2007]. Активация лизосомальных нуклеаз направлена на реализацию компенсаторных перестроек нуклеинового и тесно связанного с ним белкового обмена. В качестве индикаторных показателей предлагается как общий уровень ферментативной активности нуклеаз в различных органах гидробионтов, так и состав изоформ ферментов.

В свете сказанного целью данной работы было исследование изменения активности и фракционного состава кислой ДНКазы в тканях двустворчатых моллюсков *Mytilus edulis* (Linnaeus 1758) под воздействием различных концентраций дизельного топлива.

Материал и методы

Схема эксперимента. Эксперимент был поставлен на базе Беломорской биологической станции Зоологического института РАН, расположенной в устье губы Чупа Кандалакшского залива [Bakhmet et al., 2009].

Объектом исследования служили двустворчатые моллюски вида мидия съедобная *Mytilus edulis* L., собранные с обрастаний искусственных субстратов в непосредственной близости от биостанции. Для работы отбирали одноразмерных мидий (средняя длина раковины 66,5 ± 3,9 мм), возраст – 7+. В период проведения эксперимента (октябрь) моллюски находились преимущественно в состоянии посленерестового покоя.

До начала эксперимента мидий акклимировали к лабораторным условиям в течение семи суток. Моллюсков содержали в аквариумах из оргстекла в аэрируемой морской воде с соленостью 25 %, при постоянной температуре 10 °С и круглосуточном освещении. Ежедневно проводили частичную смену воды. При акклимации и на протяжении всего эксперимента дополнительного кормления мидий не производилось.

За сутки до начала эксперимента мидий рассадили в пять аквариумов объемом 15 л по 15 особей в каждый. В качестве нефтепродуктов использовали дизельное топливо. Во избежание расслоения дизтопливо вносили в экспериментальные аквариумы в виде смеси, приготовленной следующим образом: 100 мл дизтоплива добавляли к 900 мл морской воды и энергично взбалтывали в течение 10 минут. В

каждый из четырех аквариумов добавляли 15, 50, 75 и 150 мл полученной смеси. Расчетные концентрации нефтепродуктов приведены в таблице. Концентрации выбирали с расчетом охвата от ПДК до сублетальных. Добавление эмульсии нефтепродуктов производили ежесуточно после частичной смены морской воды в аквариумах. В пятый аквариум нефтепродукты не добавляли. Моллюски из этого аквариума служили контролем. Экспозиция опыта составляла 6 суток. По окончании экспозиции из каждого варианта отбирали по три мидии, у которых извлекали мягкие ткани. Общую активность ДНКазы определяли в мантии и краевой части мантии. Пробы, предназначенные для изучения фракционного состава ферментов, готовили из мидий целиком, не разделяя на органы. Использование проб цельных моллюсков является общепризнанной техникой [Shepard et al., 2000; Fung et al., 2004]. Для нивелирования индивидуальных различий полученные три образца объединяли в одну сборную пробу. Число определений каждого биохимического показателя составляло не менее трех.

Концентрации нефтепродуктов в эксперименте

Номер аквариума	1	2	3	4	Контроль
Объем					
добавленной					
смеси, мл	150	75	50	15	0
Расчетные, мл/л	1,0	0,5	0,3	0,1	0
Расчетные, мг/л	700	350	210	70	0
Истинные, мг/л	38,80	17,40	8,41	1,88	0,35

Определение биохимических показателей. Из тканей моллюсков готовили 10%-е гомогенаты в 0,25 М растворе сахарозы (рН 7,4), содержащем 0,001 М ЭДТА и 0,1% неионного детергента тритона X-100, для учета мембранносвязанной ферментативной активности. Гомогенаты центрифугировали при 10 000 д в течение 30 минут при 4 °С. Полученный супернатант использовали для определения общей активности кислой ДНКазы (КФ 3.1.4.6) и разделения множественных молекулярных форм фермента.

Активность кислой ДНКазы определяли спектрофотометрически по методу А. А. Покровского с соавт. [1968]. Содержание общего белка в пробе определяли по методу Лоури [Lowry et al., 1951]. Активность фермента выражали в единицах прироста поглощения при λ 260 нм в минуту на мг белка (Δ E 260/мин/мг б).

Фракционирование изоформ кислой ДНКазы осуществляли с помощью энзим-электрофореза в ПААГ по методике J. B. Boyd [1970] в модификации, описанной А. П. Поповым с соавторами [2003].

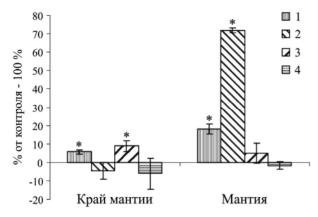
Определение концентрации нефтепродуктов. Учитывая то, что отдельные фракции добавленных нефтеуглеводородов могли испаряться, а другие оседать на стенках аквариума и раковинах моллюсков, уменьшая, таким образом, действующую концентрацию дизтоплива в эксперименте, ежедневно перед каждой сменой воды из опытных аквариумов брали пробы для определения истинной концентрации нефтепродуктов (см. табл.). Количественное определение нефтеуглеводородов в воде проводили методом ИК-фотометрии после хроматографического отделения нефтепродуктов от сопутствующих органических соединений других классов на колонке, заполненной оксидом алюминия [РД 52.24.476-95].

Результаты исследований обрабатывали общепринятыми статистическими методами, оценивая достоверность различий по непараметрическому критерию U Вилкоксона-Манна-Уитни [Гублер, Генкин, 1969].

Результаты

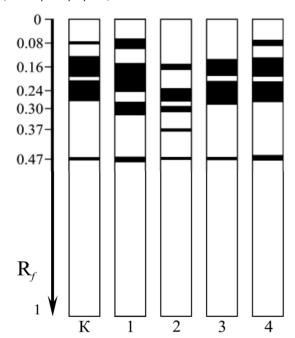
Активность кислой ДНКазы. Изменение активности кислой ДНКазы в опыте представлено на рис. 1. Выдерживание мидий в растворе дизельного топлива наименьшей концентрации 1,88 мг/л приводило к статистически значимому повышению активности фермента в обоих исследованных органах (край мантии U = 0, p = 0.049; мантия U = 0, p = 0.049). В краевой мантии активность ДНКазы также была выше контрольного уровня у мидий из аквариума содержанием нефтепродуктов в воде 17,40 мг/л (U = 0, p = 0,049). При концентрации нефтепродуктов 8,41 мг/л у моллюсков наблюдалось резкое (порядка 170 %) повышение активности ДНКазы в мантии по сравнению с контролем (U = 0, p = 0.049). У моллюсков, выдержанных в среде с максимальной дозой нефтепродуктов 38,80 мг/л, отличий в активности кислой ДНКазы от показателя контрольной группы выявлено не было.

Изоформы фермента. Спектры изоформ кислой ДНКазы мидий в норме и при интоксикации нефтепродуктами представлены на схеме (рис. 2). Согласно полученным энзимограммам, у моллюсков контрольной группы было выявлено четыре белка, обладающих способностью гидролизовать ДНК в кислой среде, с относительной электрофоретической подвижностью (R₁) 0,08, 0,16, 0,24 и 0,47. Максимальную и приблизительно равную между собой гидролитическую активность демонстрировали изоформы с R, 0,16 и 0,24.



Puc. 1. Изменение активности кислой ДНКазы у мидий *M. edulis* L. под действием различных концентраций дизтоплива

Данные представлены в виде отклонений от контрольного значения. Содержание нефтепродуктов в мг/л: $1-1,88;2-8,41;\ 3-17,4;\ 4-38,80.\ *-$ отличие от контроля достоверно при р $\leq 0,05$



Puc. 2. Схема энзимограмм изоформ кислой ДНКазы в мягких тканях мидий *M. edulis* L. под действием различных концентраций дизтоплива

Содержание нефтепродуктов в мг/л: 1 - 1,88; 2 - 8,41; 3 - 17,4; 4 - 38,80; K - контроль

У мидий, выдержанных при концентрации нефтепродуктов 1,9 мг/л, проявлялась одна дополнительная полоса активности с $R_{\rm f}$ 0,30, сравнимая по интенсивности гидролиза с основными формами фермента ($R_{\rm f}$ 0,16 и 0,24) в контроле. В то же время у моллюсков этой экспериментальной группы две наиболее активные изоформы ($R_{\rm f}$ 0,16 и 0,24) не разделялись при элекрофорезе, обнаруживаясь на энзимограммах в виде одной широкой полосы активности с промежуточным значением $R_{\rm f}$ 0,2.

В тканях мидий, помещенных в среду с содержанием нефтепродуктов 8,4 мг/л, отмечено две дополнительные формы с R₁ 0,30 и 0,37, не обнаруживавшиеся на энзимограмме контроля. Активность наиболее медленно мигрирующей формы фермента с R₁ 0,08 не проявлялась.

При концентрации нефтепродуктов 17,4 мг/л на энзимограммах моллюсков наблюдалось лишь одно отличие от контрольной группы – отсутствие полосы активности в зоне R, 0,08.

У подопытных мидий, содержавшихся в аквариуме с максимальным уровнем нагрузки 38,8 мг/л, качественных изменений в спектре множественных форм ДНКазы в сравнении с контролем не происходило.

Обсуждение

Биологические эффекты нефти и различных ее производных могут проявляться на организменном, клеточном и молекулярно-генетическом уровнях. В частности, у морских моллюсков под действием нефтепродуктов отмечено повышение содержания РНК [Дивавин, Ерохин, 1978], повреждение ДНК [Taban et al., 2004], подавление протеолиза в цитозоле [Канцерова, Лысенко, 2010], изменение иммунного ста-Tyca [Dyrynda et al., 2000; Ordas et al., 2007], структурные и функциональные изменения лизосом и эндоплазматического ретикулума [Nott, Moore, 1987; Axiak et al., 1988; Moore et al., 2007]. Согласно результатам нашей работы, эффект нефтепродуктов проявляется и на уровне лизосомальной ДНКазы. В экспериментальных условиях у моллюсков под влиянием эмульсии дизельного топлива наблюдались как количественные, так и качественные изменения лизосомальной ДНКазы.

Наибольшие изменения в активности и наборе изоформ тестируемого фермента происходили у моллюсков под действием наименьших в условиях данного эксперимента концентраций нефтепродуктов – 1,9 и 8,4 мг/л, которые, однако, превышают ПДК (ПДК нефти и НП для морских вод составляет 0,05 мг/л). У мидий из этих групп наблюдалась активация лизосомальной ДНКазы, выражавшаяся в резком повышении активности и появлении новых форм фермента на энзимограммах. Максимальная активация происходила в тканях мидий, выдержанных в среде, содержащей нефтепродукты в концентрации 8,41 мг/л.

Наблюдаемая у экспериментальных моллюсков активация лизосомальной дезоксирибонуклеазы, по всей видимости, имеет адаптивное значение. В ряде исследований показано, что мидии, будучи помещенными в среду с не-

большим содержанием нефтеуглеводородов, способны не только накапливать, но и до определенной степени метаболизировать некоторые компоненты нефти благодаря собственным детоксикационным системам или с участием микрофлоры [Проблемы химического загрязнения..., 1985]. Значение повышения нуклеазной активности при этом, вероятно, заключается в перераспределении ресурсов клетки для обеспечения новых синтезов в соответствии с изменившимися условиями среды. Подтверждением высказанного предположения может служить тот факт, что у мидий при экспонировании с сырой нефтью значительно увеличивается содержание нуклеиновых кислот в клетках [Дивавин, Ерохин, 1978; Pisoni et аl., 2004]. Причем в большей степени стимулируется синтез РНК, нежели ДНК [Проблемы химического загрязнения..., 1985]. Однако следует заметить, что существуют данные, указывающие на пониженную способность мидий Mytilus edulis метаболизировать нефтяные углеводороды [Lee et al., 1972; Narbonne et al., 1991], что несколько противоречит высказанному выше предположению. Вполне вероятно, что большая часть поглощенных углеводородов выводится из организма мидий путем экзоцитоза.

Признаки становления у мидий неспецифического адаптационного синдрома под действием нефтепродуктов в концентрациях 1,9–17,4 мг/л отмечены также нашими коллегами по изменению показателей системы кальций-зависимого протеолиза [Канцерова, Лысенко, 2010].

В отличие от эффекта «умеренных доз» нефтепродуктов, в тканях моллюсков, содержавшихся при более высоких концентрациях дизтоплива в воде (17,4 и 38,8 мг/л), обнаруживают незначительные отличия от контроля как в активности, так и в спектрах изоформ кислой ДНКазы.

Как известно, основной адаптивной стратегией литоральных мидий является пережидание неблагоприятного воздействия с максимальной экономией энергетических и пластических ресурсов организма за счет снижения общего уровня метаболизма. Невыраженная биохимическая и физиологическая акклимация при обитании в изменчивой среде может компенсироваться адаптивным поведением, направленным на избегание или минимизацию воздействия фактора. У мидий такой поведенческой реакцией является изоляция от окружающей среды путем рефлекторного смыкания створок раковины [Хлебович, 1981]. Кроме того, при высокой концентрации нефтепродуктов у мидий развивается гипоксия и переход на анаэробные пути обеспечения энергией [Головина, Бочко, 2005]. Данное положение подтверждают и полученные нами ранее результаты, свидетельствующие о значительном повышении активности ферментов углеводного обмена, в частности лизосомальных гликозидаз, в органах мидий при интоксикации нефтепродуктами [Высоцкая и др., 2009].

Дозозависимый эффект действия нефтепродуктов на биохимические показатели мидий, помимо прочего, может быть обусловлен хорошо изученной неспецифической реакцией лизосомального аппарата на метаболический стресс. Она заключается в вариабельности активности лизосомальных гидролаз и дифференциальном изменении стабильности мембран лизосом в зависимости от химической структуры, дозы и продолжительности воздействия ксенобиотиков [Viarengo et al., 1981; Regoli, 1992; Marigómes, Baybay-Villacorta, 2003; Moore et al., 2007; Высоцкая, Немова, 2008]. Обсуждая причины высокой устойчивости мидий к воздействию нефтепродуктов в проведенных экспериментах, следует учитывать еще одно обстоятельство. Из-за «всепроникающей» способности нефтяных углеводородов очень трудно избавиться от их присутствия в воде. Как показал специально проведенный анализ, в контрольных аквариумах, куда дизельное топливо не вносили, всегда присутствует некоторый фоновый уровень нефтяных углеводородов. Моллюски, используемые в эксперименте, могут адаптироваться к данному виду воздействия. При повышении дозы действующего вещества (минимальные средние концентрации) наблюдается адаптивный всплеск в активности ферментов, изменения их фракционного состава и другие преобразования метаболизма. При дозах поллютанта, достигающих некоего порога (высокие концентрации), мидии избирают другую стратегию биохимической адаптации: резкого снижения интенсивности метаболизма и поддержания жизнедеятельности за счет анаэробного обеспечения энергией. При этом геном активно не вовлекается в происходящие перестройки, о чем можно судить по незначительным отличиям от контроля как общей активности ДНКазы, так и ее изоформ при воздействии на мидий максимальной дозы дизельного топлива.

Заключение

Проведенные исследования показали, что под влиянием различных концентраций дизельного топлива в мягких тканях беломорских мидий происходили адаптивные перестройки

обмена веществ, которые проявлялись, в частности, на уровне лизосомальной ДНКазы. Выявленные изменения в активности и качественном составе молекулярных форм фермента свидетельствуют об участии лизосомальных нуклеаз в частичной биотрансформации поллютанта, поддержании гомеостаза и обеспечении процессов жизнедеятельности в токсичной среде.

Изменение активности фермента и спектра его изоформ зависело от дозы испытуемого вещества, а также от специфики выполняемых органом функций. Самое большое адаптивное повышение общей активности ДНКазы под влиянием малых и умеренных доз нефтяных углеводородов отмечено в мантии моллюсков. В краевой части мантии колебания уровня активности этой лизосомальной гидролазы были менее выраженными. При высоких концентрациях нефтепродуктов в среде обитания мидий нуклеазная активность и фракционный состав фермента в опыте и контроле отличались незначительно. Это позволяет сделать вывод о том, что при воздействии различных концентраций нефтепродуктов на мидий включаются разные стратегии биохимической адаптации, отличающиеся степенью вовлечения генома в реализацию компенсаторных перестроек метаболизма.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президента РФ для ведущих научных школ НШ-3731.2010.4 и НШ-1642.2012.4, программ ОБН РАН «Биологические ресурсы 2009–2011» и Президиума РАН «Биоразнообразие 2009–2011».

Литература

Амелина В. С. Кислые нуклеазы и их роль в приспособительных реакциях водных организмов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 2006. 26 с.

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

Высоцкая Р. У., Амелина В. С., Бахмет И. Н. Влияние нефтепродуктов на активность лизосомальных ферментов мидий в аквариальных экспериментах // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов европейского Севера: Материалы XXVIII междунар. конф. (Петрозаводск, 5–8 окт. 2009 г.). Петрозаводск: Карельский НЦ РАН, 2009. С. 123–126.

Гайсина А. А. Динамика активности серотонинергической системы в эмбриогенезе под влиянием нефтяного загрязнения // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: Материалы 2-й науч. конф. с участием стран СНГ (Петрозаводск, 11-14 сент. 2007 г.). Петрозаводск: Карельский НЦ РАН, 2007. С. 38-39.

Головина И. В., Бочко О. Ю. Влияние полихлорбифенилов на активность ферментов в тканях мидий Mytilus galloprovincialis // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Петрозаводск: Карельский НЦ РАН, 2005. С. 45–48.

Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение критериев непараметрической статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследованиях. М.: Медицина, 1969. 29 с.

Дивавин И. А., Ерохин В. Е. Изменение биохимических показателей некоторых прибрежных гидробионтов Баренцева моря при экспериментальной нефтяной интоксикации // Гидробиол. журн. 1978. Т. 14. № 5. С. 73–77.

Канцерова Н. П., Лысенко Л. А. Влияние нефтепродуктов на кальций-зависимую протеолитическую активность в тканях мидий Mytilus edulis L. // Молодежь в науке – 2009. Прил. к журн. «Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі». Ч. 4. Минск: Беларуская навука, 2010. С. 132–135.

Коничев А. С., Попов А. П., Цветков И. Л., Филков П. В. Ферменты как биохимические маркеры загрязнения воды // Приложение к Вестнику МГОУ. Сер. «Естественные науки». География, экология, экономика: актуальные проблемы науки и образования. М.: МГОУ, 2005. С. 151–153.

Мензорова Н. И., Рассказов В. А. Использование различных тест-систем и биохимической индикации для мониторинга экологического состояния бухты Троицы (Японское море) // Биология моря. 2007. Т. 33, № 2. С. 144–149.

Миронов О. Г., Писарева Н. А., Щекатурина Т. Л., Лапин Б. П. Исследование состава аренов в черноморских мидиях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) // Гидробиол. журн. 1990. Т. 26, № 4. С. 59–62.

Патин С. А. Нефть и экология континентального шельфа. М.: ВНИРО, 2001. 247 с.

Покровский А. А., Арчаков А. И. Методы разделения и ферментной идентификации субклеточных фракций // Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1968. С. 5–59.

Попов А. П., Коничев А. С., Цветков И. Л. Влияние токсичных соединений техногенного происхождения на активность и множественные формы кислой ДНКазы живородки речной (Viviparus viviparous L.) // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. Т. 39, № 5. С. 518–523.

Проблемы химического загрязнения вод Мирового океана. Т. 4: Влияние нефти и нефтепродуктов на морские организмы и их сообщества / Ред. О. Г. Миронов. Л.: Гидрометеоиздат, 1985. 136 с.

РД 52.24.476-95 Методические указания. ИК-фотометрическое определение нефтепродуктов в водах. Утверждены Росгидрометом. Гидрохимический институт. Ростов-на-Дону, 1995. 14 с.

Хлебович В. В. Акклимация водных животных. Л.: Наука, 1981. 136 с.

Яблоков А. Я., Остроумов С. А. Уровни охраны живой природы. Л.: Наука, 1985. 176 с.

Axiak V., George J. J., Moore M. N. Petroleum hydrocarbons in the marine bivalve Venus verrucosa: accumulation and cellular responses // Mar. Biol. 1988. Vol. 97. P. 225–230.

Bakhmet I. N., Fokina N. N., Nefedova Z. A., Nemova N. N. Physiological-biochemical properties of blue mussel *Mytilus edulis* adaptation to oil contamination // Environ. Monit. Assess. 2009. Vol. 155. P. 581–591.

Bergamini E., Cavallini G., Donati A., Gori Z. The anti-ageing effects of caloric restriction may involve stimulation of macroautophagy and lysosomal degradation, and can be intensified pharmacologically // Biomed. Pharmacother. 2003. Vol. 57. P. 203–208.

Boyd J B. Characterization of an acid active deoxyribonuclease from the larval salivary gland of Drosophila hydei // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Nucleic Acids and Protein Synthesis. 1970. Vol. 209, N 2. P. 349–356.

Cuervo A. Autophagy: in sickness and in health // Trends Cell. Biol. 2004. Vol. 14. P. 70–77.

Dyrynda E. A., Law R. J., Dyrynda P. E. J. et al. Changes in immune parameters of natural mussel Mytilus edulis populations following a major oil spill («Sea Empress», Wales, UK) // Mar. Ecol. Prog. Ser. 2000. Vol. 206. P. 155–170.

Farrington J. W., Goldberg E. D., Risebrough R. W. et al. U.S. «Mussel Watch», 1976–1978: An overview of the trace metal. DDT, PCB, hydrocarbon and artificial radionuclide data // Environ. Sci. and Technol. 1983. Vol. 17. P. 490–496.

Fung C. N., Lam J. C. W., Zheng G. J. et al. Mussel-based monitoring of trace metal and organic contaminants along the east coast of China using *Perna viridis* and *Mytilus edulis* // Environ. Poll. 2004. Vol. 127. P. 203–216.

Goldberg E. D. The Mussel watch concept // Environ. Monit. Assess. 1986. Vol. 7. P. 101–125.

Ji C., Kaplowitz N. ER stress: can the liver cope? // J. Hepatol. 2006. Vol. 45. P. 321-333.

Kiffin R., Kaushik S., Zeng M. et al. Altered dynamics of the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy with age // J. Cell. Biol. 2007. Vol. 120, N 5. P. 782–791.

Köhler A., Wahl E., Soffker K. Functional and morphological changes of lysosomes as prognostic biomarkers of toxic liver injury in a marine flatfish (*Platichthys flesus* (L.)) // Environ. Toxicol. Chem. 2002. Vol. 21, N 11. P. 434–444.

Lee R. F., Sauerheber R., Benson A. A. Petroleum hydrocarbons: uptake and discharge by the marine mussel Mytilus edulis // Science. 1972. Vol. 177. P. 344–346.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Скидченко Виолетта Сергеевна

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

эл. почта: amelina_violetta@mail.ru

тел.: (8142) 571879

Lockshin R. A., Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more // Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2004. Vol. 36. P. 2405–2419.

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

Marigómez I., Baybay-Villacorta L. Pollutant-specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemicals // Aquat. Toxicol. 2003. Vol. 64. P. 235–257.

Moore M. N., Allen J. I., McVeigh A. Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status // Mar Environ Res. 2006a. Vol. 61, N 3. P. 278–304.

Moore M. N., Allen J. I., Somerfield P. J. Autophagy: role in surviving environmental stress // Mar Environ Res. 2006b. Vol. 62. P. S420–S425.

Moore M. N., Viarengo A., Donkin P., Hawkins A. J. S. Autophagic and Iysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels // Aquatic Toxicology. 2007. Vol. 84, Issue 1. P. 80–91.

Narbonne J. F., Aarab N., Clerandeau C. et al. Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in Mediterranean coastes and temporal trends // Biomarkers. 2005. Vol. 10. P. 58–71.

Nott J. A., Moore M. N. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on molluscan lysosomes and endoplasmic reticulum // Histochem. J. 1987. Vol. 19. P. 357–368.

Ordas M. C., Costa M. M., Roca F. J. et al. Turbot TNF-alpha gene: molecular characterization and biological activity of the recombinant protein // Mol. Immunol. 2007. Vol. 44. P. 389–400.

Pisoni M., Cogotzi L., Frigeri A. et al. DNA adducts, benzo(a)pirene monooxygenase activity, and lysosomal membrane stability in *Mytilis galloprovincialis* from different areas in Taranto coastal waters (Italy) // Environ. Res. 2004. Vol. 96. P. 163–175.

Regoli F. Lysosomal responses as a sensitive index in biomonitoring heavy metal pollution // Mar. Ecol. Prog. Ser. 1992. Vol. 84. P. 63–69.

Shepard J. L., Olsson B., Tedengren M., Bradley B. Protein expression signatures identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs, copper and salinity stress // Mar. Environ. Res. 2000. Vol. 50, N 1–5. P. 337–340.

Taban I. C., Bechmann R. K., Torgrinsen S. et al. Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using comet assay // Mar. Environ. Res. 2004. Vol. 58. P. 701–705.

Viarengo A., Zanicchi G., Moore M. N., Orumsu M. Accumulation and detoxication of cooper by the mussel Mytilus galloprovincialis // Aquat. Toxicol. 1981. Vol. 1. P. 147–157.

Skidchenko, Violetta

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

Высоцкая Римма Ульяновна

главный научный сотрудник, д. б. н., проф. Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: rimma@bio.krc.karelia.ru

тел.: (8142) 571879

Немова Нина Николаевна

директор ИБ КарНЦ РАН, чл.-корр. РАН, д. б. н. Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: nemova@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 783615

Vysotskaya, Rimma

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

Nemova, Nina

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

tel.: (8142) 783615

УДК 575.174: 581.145.1

ПОЛИМОРФИЗМ ПО ВРЕМЕНИ НАЧАЛА ЦВЕТЕНИЯ У ARABIDOPSIS THALIANA (L.) HEYNH. НА СЕВЕРНОЙ ГРАНИЦЕ ЕГО АРЕАЛА

О. М. Федоренко, М. В. Грицких, Т. С. Николаевская

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Изучены сроки зацветания растений шести природных популяций (двух островных и четырех континентальных) Arabidopsis thaliana (L.), расположенных на северной периферии ареала вида (Карелия), и дана сравнительная оценка приспособленности этих популяций. Установлено, что карельские популяции представлены в основном поздноцветущими формами растений. Тем не менее выявленное разнообразие по срокам зацветания и неодинаковая реакция на яровизацию A. thaliana свидетельствуют о полиморфизме генов, контролирующих проявление данного признака, что может быть своеобразной адаптивной стратегией вида в нестабильных условиях на северной периферии его ареала. Показано, что приспособленность карельских популяций A. thaliana к условиям окружающей среды обеспечивается высокой всхожестью семян и значительным уровнем варьирования их плодовитости, при этом островные популяции лучше адаптированы по сравнению с континентальными. По-видимому, для высокосамофертильного вида A. thaliana усиление инбридинга как следствие изоляции островных популяций не является существенным фактором снижения их приспособленности.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., природные популяции, время начала цветения, яровизация, приспособленность.

O. M. Fedorenko, M. V. Gritskikh, T. S. Nikolaevskaya. POLYMORPHISM BASED ON THE ONSET OF FLOWERING IN *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. AT THE NORTHERN LIMIT OF THE DISTRIBUTION RANGE

Timing of flowering in six natural populations (two insular and four continental) of *Arabidopsis thaliana* (L.), occupying northern limits of the species range (Karelia), was studied. Average fitness of these populations was estimate as well. It was revealed that Karelian populations are mainly represented by late-flowering forms. However, diversity in the timing of flowering and different reaction to vernalization indicates that there is polymorphism of genes which control this trait in Karelian populations. Perhaps it is the original adaptive strategy of *A. thaliana* in the unstable environment at the northern limits of the species range. It was demonstrated that adaptation of Karelian populations is facilitated by the high viability potential and high level of fertility variation. In addition to that, insular populations turned out to be better adapted than continental ones. Evidently, intensification of inbreeding, as a result of insular populations isolation, does not lead to any significant fitness decrease in the highly selfing species *A. thaliana*.

Key words: Arabidopsis thaliana (L.)., natural populations, flowering time, vernalization, fitness.

Введение

Проблема адаптации живых организмов к условиям окружающей среды является одной из актуальных в современной биологии. Эволюция идет путем отбора адаптивных фенотилов и основывается на генетических различиях в приспособленности между индивидуумами популяций. Для понимания эволюционного процесса важно знать, какова природа генетической изменчивости, контролирующей эти различия [Левонтин, 1978; Алтухов, 2003].

В пределах зоны распространения вида климатические условия варьируют. Многие абиотические факторы среды, такие как световые и температурные условия, изменяются постепенно вдоль географической широты и долготы. В связи с этим адаптивные признаки нередко проявляют клинальную изменчивость вдоль средовых градиентов, особенно у широко распространенных видов [Endler, 1977]. Так, высоко вариабельный признак «время начала цветения» является одной из важнейших физиологических характеристик растений и четко связан с приспособленностью. В популяциях Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. - одного из наиболее изученных объектов генетики растений и молекулярной биологии - отмечена высокая вариабельность ПО времени зацветания [Pigliucci, 1998]. В последнее время среди исследователей сложилось представление, что этот признак является определяющим в адаптации арабидопсиса к условиям окружающей среды [Koornneef et al., 1991; Coupland, 1995; Kuittinen, 1997; Koornneef et al., 1998], к тому же он проявляет широтную клинальную изменчивость [Stinchcombe et al., 2004]. Вместе с прорастанием семян эта характеристика синхронизирует рост и репродукцию растений с наиболее благоприятным периодом вегетации [Symonides, 1987] и таким образом обеспечивает сохранение вида в череде поколений. Наличие клинальной изменчивости часто служит прямым доказательством действия естественного отбора [Левонтин, 1978] и участия в адаптации генов, контролирующих эту изменчивость.

Как показали генетические исследования, признак «время начала цветения» характеризуется полигенным наследованием [Cetl, 1990; Coupland, 1995], однако два гена являются определяющими в естественной изменчивости растений по темпам зацветания – FRIGIDA (FRI) и FLOWERING LOCUS С (FLC) [Napp-Zinn, 1987; Lee et al., 1993]. Причем примерно 70 % изменчивости по этому признаку является результатом аллельной изменчивости локуса FRI, а сам

локус находится под жестким селективным давлением [Clarke, Dean, 1994; Simpson, Dean, 2002; Gazzani et al., 2003; Shindo et al., 2005]. B природе растения A. thaliana представлены озимыми и яровыми формами, различия между которыми определяются аллелями генов FRI и FLC. Для озимых растений характерны доминантные аллели FRI и FLC, в то время как у яровых форм присутствуют нефункциональный аллель fri или слабый flc аллель. Локус FRI предотвращает раннее цветение арабидопсиса без яровизации, поддерживая высокую экспрессию гена *FLC*, который, в свою очередь, кодирует белок MADS-домен, репрессирующий цветение [Sheldon et al., 1999]. Показано, что в природных образцах арабидопсиса, собранных со всего мира, распространены 20 различных нефункциональных FRI-гаплотипов [Shindo et al., 2005]. При этом предполагается, что мутации потери функции локуса FRI, приводящие к раннему цветению без яровизации, могут иметь значительное селективное преимущество.

Для A. thaliana территория Карелии является северной периферией ареала вида. Известно, что самые поздние по срокам зацветания экотипы арабидопсиса часто произрастают в северных широтах [Kranz, Kirchheim, 1987]. Повидимому, это связано с особенностями световых и температурных условий Севера. Гены, контролирующие время зацветания, находятся в общих путях с генами фитохромов, способными оценивать световую ситуацию в красной области света и детерминировать многие процессы фотоморфогенеза, в том числе и время начала цветения растений [Медведев, 2004]. Гены, отвечающие за функционирование фитохромов и темпы зацветания, оказывают влияние и на приспособленность растений к конкретным условиям окружающей среды. Жизнеспособность и плодовитость растений являются основными компонентами, из которых складывается общая приспособленность популяции [Алтухов, 2003; Хедрик, 2003].

Изолированные популяции арабидопсиса, произрастающего на островах Онежского озера, представляют собой удобную модель для изучения микроэволюционных процессов и возможных путей адаптивной эволюции. Особенности этих процессов в островных популяциях (уменьшение скорости миграции генов, усиление роли дрейфа генов и др.) способствуют снижению уровня панмиксии, что не всегда благоприятно сказывается на средней приспособленности этих популяций, которая основывается на плодовитости и жизнеспособности особей и представляет собой сумму отно-

сительных вкладов каждого из возможных генотипов популяции [Хедрик, 2003].

В настоящей работе мы сообщаем результаты изучения разнообразия карельских популяций арабидопсиса по срокам начала цветения (с яровизацией и без нее) и даем сравнительную оценку средней приспособленности этих популяций.

Материал и методы

A. thaliana – самоопыляющееся, диплоидное (2n = 10), однолетнее растение, имеющее небольшой размер генома (125 млн пар нуклеотидов) с низкой долей высокоповторяющейся ДНК [The Arabidopsis Genome Initiative, 2000].

Анализировали шесть природных популяций, находящихся на северной периферии ареала вида, в Карелии. Популяции расположены вдоль широтного градиента на протяжении примерно 200 км. Географическое положение их и характеристика мест произрастания арабидопсиса приведены в табл. 1. Две популяции расположены на островах Онежского озера Радколье и Большой Климецкий; остальные на континенте. Названия континентальных популяций даны в соответствии с близлежащими населенными пунктами, а островных – по географическим названиям островов.

Таблица 1. Характеристика мест произрастания карельских популяций A. thaliana

Популя-	Географическое	Место произрастания
ции	положение	Место произрастания
	Островные	9
Радколье	62 05′ с. ш. 35 15′ в. д.	На скале, рядом
		с берегом озера
Б. Кли-	61 49′ с. ш. 35 10′ в. д.	На скале, рядом
мецкий		с берегом озера
	Континенталь	ные
Шуйская	62 00′ с. ш. 34 07′ в. д.	Вдоль автодороги, на
		скале
Царевичи	62 01′ с. ш. 34 07′ в. д.	Вдоль автодороги, на
		скале у озера
Косалма	62 01′ с. ш. 34 07′ в. д.	Вдоль автодороги, на
		скале
Кончезеро	62 08′ с. ш. 34 01′ в. д.	В деревне, вдоль тропы
		на скальное возвышение

Собранные во время экспедиции 2008 г. семена проращивали в чашках Петри на агаризованной питательной среде по Гихнеру-Велеминскому [Иванов и др., 1966] под люминесцентными лампами. Десятидневные проростки пересаживали в почву (смесь земли и песка, 2:1) и выращивали при температуре 22 С в люминостате при постоянном освещении. Условия лабораторного эксперимента представлены тремя вариантами: в одном из них время начала цветения растений определяли без хо-

лодовой обработки, во втором и третьем – семена после посева в чашки Петри выдерживали 24 часа при комнатной температуре и затем яровизировали в течение 14 и 30 дней при температуре 2–4 С, согласно данным литературы [Kuittinen et al., 1997; Michaels, Amasino, 1999; Lempe et al., 2005]. Во всех вариантах анализировали по 30 растений, случайно выбранных из каждой популяции. Количество дней от посева семян до появления первого распустившегося цветка составило срок зацветания растения.

Оценку приспособленности популяций производили по формуле: $W = \kappa \cdot v$, где κ и v – стандартизованные величины плодовитости и жизнеспособности растений отдельной популяции, соответственно [Алтухов, 2003]. Количество стручков на одно растение составило плодовитость, которую определяли у 30 индивидумов популяции. Поскольку в одинаковых лабораторных условиях выживаемость растений была примерно одинаковой, в качестве жизнеспособности использовали показатель «всхожесть семян». Для оценки всхожести семена каждого из 30 материнских растений популяции проращивали в чашках Петри в четырех повторностях по 50 штук в каждой. Достоверность различий популяций по показателям плодовитости и всхожести семян определяли с помощью критерия Стьюдента [Зайцев, 1984].

Результаты и обсуждение

Изучение полиморфизма A. thaliana по времени начала цветения показало, что карельские популяции представлены в основном поздноцветущими формами. Это подтверждает вывод А. R. Kranz, В. Kirchheim [1987] о том, что самые поздние экотипы арабидопсиса часто произрастают в северных регионах. Вероятно, они имеют селективное преимущество в условиях короткого и холодного лета по сравнению с раннецветущими формами.

По литературным данным, самые раннецветущие линии арабидопсиса зацветают через 21 день [Coupland, 1995]. Однако для естественных популяций такими считаются растения, зацветающие в течение 28 дней от прорастания семян [Cetl, 1990]. По мнению других авторов, к раннецветущим растениям относятся те, которые зацветают через 30–60 дней [Jalas, Suominen, 1994] или не более чем через 75 дней от прорастания семян [Johanson et al., 2000].

По нашим данным, растения четырех популяций (Б. Климецкий, Кончезеро, Косалма, Шуйская) без предварительной холодовой обработки семян зацветали через 90–180 дней

(рис. 1). В популяции Радколье только 7 % растений зацветали через 76–90 дней, а остальные были поздноцветущими (зацветали через 90–180 дней). Популяция Царевичи оказалась полиморфной по времени начала цветения и представлена как поздноцветущими, так и от-

носительно раннецветущими формами. Так, 16 % растений зацветали на 36–45-й день, 70,5 % (большая часть растений этой популяции) зацветали через 46–75 дней, на долю поздноцветущих (через 90 дней и более) приходилось 13,5 %.

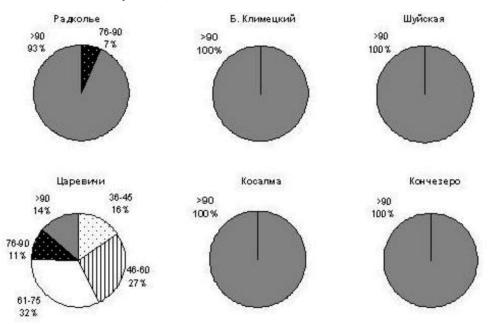


Рис. 1. Полиморфизм карельских популяций *A. thaliana* по времени начала цветения растений (без предварительной холодовой обработки). Напротив секторов указана доля растений (в %), имеющих определенную продолжительность периода (дни) до начала цветения

Успешное воспроизведение популяций A. thaliana, расположенных в северных широтах на северной границе его ареала, в значительной степени определяется генетически обусловленной способностью растений реагировать на низкие положительные температуры, поскольку естественная яровизация способствует ускорению развития и зацветания растений. Мы исследовали влияние яровизации на изменение сроков до начала цветения A. thaliana. Поскольку большая часть растений арабидопсиса северных широт являются озимыми, учет времени начала цветения растений был проведен после холодовой обработки семян. Известно, что продолжительность периода яровизации для A. thaliana обычно составляет 1-5 недель [Kuittinen et al., 1997; Michaels, Amasino, 1999; Lempe, 2005]. В наших экспериментах после 30-дневной яровизации выявилось значительное, но неодинаковое сокращение периода времени до начала цветения во всех исследованных популяциях (рис. 2). Так, в двух островных (Радколье и Б. Климецкий) и одной континентальной (Кончезеро) влияние яровизации можно считать значительным, так как существенно сократилось время до начала цветения у большинства растений. В популяции Кончезеро в группе поздноцветущих (более 90

дней) осталось менее 6 % растений. В островных популяциях доля позднецветущих снизилась до 21 % на о. Радколье и 34 % на о. Б. Климецком. Особым образом на яровизацию отозвались растения популяции Царевичи, где доля растений, зацветающих через 46-60 дней, увеличилась в 2 раза. В то же время растения популяций Шуйская и Косалма оказались нечувствительными к яровизации, и у 70-75 % растений не произошло сокращения периода до начала цветения. Таким образом, северные природные популяции арабидопсиса представлены, в основном, поздноцветущими формами растений. Однако неодинаковый ответ на яровизацию в отдельных популяциях свидетельствует о полиморфизме по генам, контролирующим темпы зацветания.

Анализ влияния длительности яровизации на время до начала цветения был выполнен на трех континентальных популяциях: Шуйская, Царевичи, Кончезеро (рис. 3). На диаграммах видно, что увеличение длительности яровизации приводит к сокращению доли поздноцветущих растений. Причем увеличение периода холодовой обработки в 2 раза, по сравнению с двухнедельной, вызвало неодинаковые изменения в отдельных популяциях. В популяциях

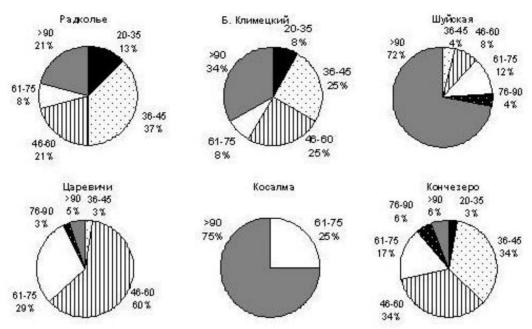
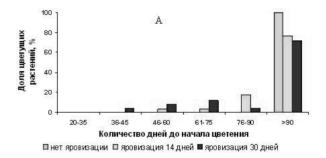
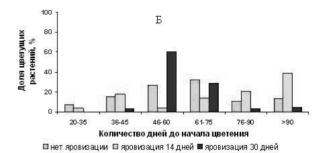


Рис. 2. Влияние яровизации (30 сут при 2-4 С) на продолжительность периода до начала цветения у растений *A. thaliana* в карельских популяциях. Напротив секторов указана доля растений (в %), имеющих определенную продолжительность периода (дни) до начала цветения

Кончезеро и Царевичи оно способствовало сокращению доли поздноцветущих растений соответственно в 3 и 7 раз. В отличие от них популяция Шуйская проявила намного более слабый ответ на увеличение сроков яровизации.

Известно, что различия между озимыми и яровыми формами A. thaliana контролируются всего лишь несколькими локусами, при этом наибольший эффект имеют 2 гена - FRI и FLC [Shindo et al., 2005]. Установлено, что локус FRI наиболее часто отвечает за потребность в яровизации среди поздних экотипов Центральной Европы и Скандинавии и является доминантным [Napp-Zinn, 1987; Clarke, Dean, 1994]. Поскольку в островных популяциях (Радколье и Климецкий) и в популяции Кончезеро наблюдается существенное увеличение доли раннецветущих растений после яровизации, то можно предположить, что в них высока частота доминантного FRI-аллеля. В популяциях Шуйская и Косалма, где эффект от яровизации ниже, вероятно, существенный вклад в контроль за временем цветения вносит ряд других генов (LD, PHYs, CO, GI, GA, COP1 и др.). Высокая частота относительно ранних форм арабидопсиса в популяции Царевичи может быть следствием накопления мутантных аллелей по локусу FRI и, возможно, по FLC. Таким образом, разнообразие по срокам зацветания растений в карельских популяциях и неодинаковая реакция их на яровизацию, по-видимому, представляет собой адаптационный фонд вида в нестабильных условиях произрастания на северной периферии ареала вида.





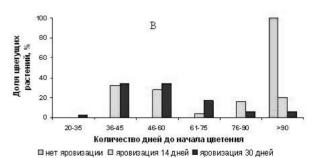


Рис. 3. Влияние длительности яровизации на время цветения растений *A. thaliana*:

А – популяция Шуйская, Б – популяция Царевичи, В – популяция Кончезеро

В целом исследованные популяции арабидопсиса характеризовались довольно высокой для природных популяций всхожестью семян - одного из компонентов общей жизнеспособности растений (табл. 2). Среди континентальных популяций обнаружились межпопуляционные различия: высокой жизнеспособностью семян отличалась популяция Кончезеро, а наиболее низкой – Царевичи. У островных популяций эти различия отсутствовали. Активное и одновременное прорастание семян островных популяций, по-видимому, связано с микроклиматическими особенностями - более поздний сход снежного покрова в результате влияния Онежского озера, в отличие от материка [Семенов, 1993]. Характеризуя плодовитость, необходимо отметить отсутствие различий между отдельными популяциями, за исключением популяции Шуйская, где количество стручков на растение было минимальным и более чем в 2 раза ниже по сравнению с другими популяциями (табл. 2).

 Таблица
 2.
 Компоненты
 приспособленности

 северных природных популяций A. thaliana

Популяции	Жизне-	٧	Плодови-	V	
	способность		тость		
	Остро	вные			
Радколье	$96,1 \pm 0,9$	9,7	$12,1\pm0,9$	50,9	
Б. Климецкий	$95,8 \pm 0,6$	6,8	11,7 ± 0,8	44,6	
Среднее 96,0 ± 0,7***		8,3	11,9 ± 0,9	47,7	
	Континен	тальные	e		
Царевичи	$74,6 \pm 2,8$	40,5	$10,9 \pm 0,7***$	41,7	
Шуйская	87,6 ± 1,3**	15,2	$4,6 \pm 0,8$	74,1	
Косалма	89,1 ± 1,3***	12,7	11,2 ± 1,2***	89,9	
Кончезеро	92,2 ± 0,8***	8,0	10,5 ± 0,7***	42,8	
Среднее	$80,4 \pm 1,8$	19,4	9.8 ± 0.9	61,3	

Примечание. Жизнеспособность – всхожесть семян в %; плодовитость – количество стручков на растение. *** – различия между средними значениями жизнеспособности островных и континентальных популяций достоверны при $p \le 0,001$; ** и *** – отличия континентальных популяций от популяции с наименьшим значением признака достоверны при $p \le 0,01$ и $p \le 0,001$, соответственно; V – коэффициент вариации.

Сравнение континентальных и островных популяций в целом показало, что последние отличаются более высокой жизнеспособностью (табл. 2). Плодовитость тех и других оказалась на одном уровне. Островные и континентальные популяции различались между собой по варьированию признаков: у островных популяций размах изменчивости показателей всхожести и плодовитости был более низким по сравнению с континентальными. Показатель плодовитости варьировал значительнее, чем жизнеспособность растений.

На основе стандартизованных величин плодовитости и жизнеспособности вычислены значения приспособленности популяций A. thaliana, представленные в табл. 3. Островные популяции, отличающиеся высокой плодовитостью и жизнеспособностью растений, проявили более высокую приспособленность по сравнению с континентальными популяциями. Возможно, это связано с особенностями микроэволюционных процессов в островных популяциях - со снижением уровня панмиксии и усилением инбридинга из-за ослабления миграционного потока генов, увеличением роли дрейфа генов при изоляции. Эти процессы должны оказывать влияние на среднюю приспособленность популяции, которая основывается на плодовитости и жизнеспособности особей и представляет собой сумму относительных вкладов каждого из возможных генотипов популяции [Алтухов, 2003; Хедрик, 2003]. По-видимому, для высокосамофертильного вида A. thaliana усиление инбридинга как следствие изоляции островных популяций не является существенным фактором снижения их приспособленности.

 Таблица
 3.
 Приспособленность
 популяций

 A. thaliana на северной периферии ареала вида

Популяции v		K	W
	Остр	овные	
Радколье	1,000	1,000	1,000
Б. Климецкий	0,997	0,967	0,964
·	Контине	нтальные	
Царевичи	0,777	0,901	0,700
Шуйская	0,912	0,380	0,347
Косалма	0,927	0,926	0,858
Кончезеро	0,960	0,868	0,831

Примечание. v и κ – стандартизованные величины жизнеспособности и плодовитости растений; W – средняя приспособленность популяции.

Выявленные особенности жизнеспособности и плодовитости растений островных и континентальных популяций характеризуют, прежде всего, уровень их приспособленности к конкретным условиям произрастания. Так, низкий уровень плодовитости Шуйской популяции компенсируется довольно высокой выживаемостью. Невысокий показатель всхожести семян в популяции Царевичи, возможно, является следствием наличия у растений большой частоты мутаций по морфо-физиологическим признакам, таким как карликовость, многорозеточность, положительный геотропизм, этиолированность проростков, пигментные мутации. Однако уровень плодовитости достаточен для воспроизводства популяции, которая возобновляется, как показали наши наблюдения, в течение многих лет.

В целом приспособленность A. thaliana к условиям произрастания на северной периферии ареала вида осуществляется за счет адаптивной стратегии, которая заключается в поддержании полиморфизма по генам, контролирующим время начала цветения, и характеризуется сочетанием высокой жизнеспособности организмов со значительным внутрипопуляционным уровнем варьирования их плодовитости.

Выводы

- 1. Карельские природные популяции A. thaliana представлены в основном поздноцветущими формами растений. Однако гетерогенность по срокам начала цветения растений одной из изученных популяций (Царевичи) и различия в реакции на яровизацию отдельных популяций свидетельствуют о полиморфизме генов, контролирующих время зацветания и потребность в яровизации. Это может служить основой адаптивных изменений в генетической структуре популяций при тех или иных условиях вегетации растений за счет изменения приспособленности генотипов.
- 2. Приспособленность карельских популяций *A. thaliana* к условиям окружающей среды на северной периферии его ареала обеспечивается хорошей всхожестью семян одного из компонентов общей жизнеспособности растений и значительным уровнем варьирования их плодовитости, при этом островные популяции отличаются лучшей приспособленностью по сравнению с континентальными.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 11-04-01306-а).

Литература

Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях. М.: Академкнига, 2003. 431 с.

Иванов В. И., Касьяненко А. Г., Санина А. В., Тимофеева-Ресовская Е. А. Опыты по радиационной генетике Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. Сообщ. І // Генетика. 1966. № 8. С. 55–70.

Зайцев Г. Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. М.: Наука, 1984. 424 с.

Левонтин Р. С. Генетические основы эволюции. М.: Мир, 1978. 351 с.

Медведев С. С. Физиология растений. СПб.: СПбГУ, 2004. 334 с.

Семенов В. Н. Климат и гидрология поверхностных вод // Кижский вестник. № 2. Петрозаводск, 1993. С. 53–59.

Хедрик Ф. Генетика популяций. М.: Техносфера, 2003. 588 с.

Cetl I. Genetic polymorphism for allels of floweringtime in natural populations of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. // AIS. 1990. N 27. P. 27–42.

Clarke J. H., Dean C. Mapping FRI, a locus controlling flowering time and vernalization response in Arabidopsis thaliana // Molecular and General Genetics. 1994. Vol. 242. P. 81–89.

Coupland G. Genetic and environmental control of flowering time in *Arabidopsis* // Trends Genet. 1995. Vol. 11. P. 393–397.

Endler J. A. Geographic variation, speciation, and clines. Princeton University Press, Princeton, NJ. 1977.

Gazzani S., Gendall A. R., Lister C., Dean C. Analysis of the molecular basis of flowering time variation in arabidopsis accessions // Plant Physiology. 2003. Vol. 132. P. 1107–1114.

Jalas J., Suominen J. Atlas Florae Europaea. Distribution of vascular plants in Europe. Cruciferae (Sisymbrium to Aubrieta). Helsinki: Helsinki University Printing House, 1994. Vol. 10. 224 p.

Johanson U., West J., Lister C. et al. Molecular analysis of FRIGIDA, major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time // Science. 2000. Vol. 290. P. 344–347.

Koornneef M., Hanhart C. J., van der Veen J. H. A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana* // Mol. Gen. Genet. 1991. N 229. P. 57–66.

Koornneef M., Alonso-Blanco C., Peeters A. J. M., Soppe W. Genetic control of flowering time in Arabidopsis // Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 1998. Vol. 49. P. 345–370.

Kranz A. R., Kirchheim B. Genetic resources in Arabidopsis // AIS. 1987. N 24.

Kuittinen H., Sillanpaa M. J., Savolainen O. Genetic basis of adaptation: flowering time in Arabidopsis thaliana // Theor. Appl. Genet. 1997. Vol. 95. P. 573–583

Lee I., Bleecker A., Amasino R. Analysis of naturally occurring late flowering in Arabidopsis thaliana // Molecular and General Genetics. 1993. Vol. 237. P. 171–176.

Lempe J., Balasubramanian S., Sureshkumar S. et al. Diversity of flowering responses in wild Arabidopsis thaliana strains // PLoS Genetics. 2005. Vol. 1 (1). P. 109–118.

Michaels S. D., Amasino R. M. FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering // The Plant Cell. 1999. Vol. 11. P. 949–956.

Napp-Zinn K. Vernalization – environmental and genetic regulation // J. G. Atherton. Manipulation of flowering. Butterworths, 1987. P. 123–304.

Pigliucci M. Ecological and evolutionary genetics of *Arabidopsis* // TREE. 1998. N 3. P. 485–489.

Sheldon C. C., Burn J. E., Perez P. P. et al. The FLC MADS box gene. A repressor of flowering in Arabidopsis by vernalization and methylation // Plant Cel. 1999. Vol. 11. P. 445–458.

Shindo Ch., Aranzana M. J., Lister C. et al. Role of FRIGIDA and FLOWERING LOCUS C in determining variation in flowering time of Arabidopsis // Plant Physiology. 2005. Vol. 138. P. 1163–1173.

Simpson G. G., Dean C. Arabidopsis, the Rosetta stone of flowering time? // Science. 2002. Vol. 296. P. 285–289.

Stinchcombe J. R., Weinig C., Ungerer M. et al. A latitudinal cline in flowering time in *Arabidopsis thaliana* modulated by the flowering time gene *FRIGIDA* // PNAS. 2004. Vol. 101. N 13. P. 4712– 4717.

Symonides E. Population dynamics of annual plants // Davy A. J., Hutchings M. J., Watkinson A. R. (Eds.).

28th Symposium of the British Ecological Society, Sussex. Blackwell, 1987. P. 221–248.

The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana // Nature. 2000. Vol. 408. P. 796–815.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Федоренко Ольга Михайловна

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

эл. почта: fedorenko_om@mail.ru

тел.: (8142) 573107

Грицких Марина Витальевна

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

тел.: (8142) 573107

Николаевская Татьяна Сергеевна

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

тел.: (8142) 573107

Fedorenko, Olga

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

tel.: (8142) 573107

Gritskikh, Marina

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

Nikolaevskaya, Tatiana

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences 11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia e-mail: nicoltn@mail.ru tel.: (8142) 573107 УДК 591.145.2: 636.934

ВИДОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ СОДЕРЖАНИЯ РТУТИ В ОРГАНАХ ХИЩНЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ РАЗЛИЧНОГО ЭКОГЕНЕЗА

Е. А. Хижкин¹, В. А. Илюха^{1,2}, В. Т. Комов³, И. В. Паркалов⁴, Т. Н. Ильина¹, И. В. Баишникова¹, С. Н. Сергина¹, В. А. Гремячих³, Т. Б. Камшилова³, Е. С. Степина³

Накопление ртути у разводимых в неволе хищных млекопитающих зависело от экологических особенностей вида и могло определяться кормовой базой исследованных животных. Генотипические особенности животных также отражаются на способности накапливать соединения ртути. Изменения антиоксидантной системы связаны с участием ее отдельных компонентов в детоксикации.

Ключевые слова: ртуть, хищные млекопитающие, антиоксидантная система.

E. A. Khizhkin, V. A. Ilyukha, V. T. Komov, I. V. Parkalov, T. N. Ilyina, I. V. Baishnikova, S. N. Sergina, V. A. Gremyachikh, T. B. Kamshilova, E. S. Stepina. SPECIES-SPECIFIC FEATURES OF MERCURY CONTENT IN ORGANS OF CARNIVOROUS MAMMALS OF DIFFERENT ECOGENESIS

Accumulation of mercury in carnivorous mammals reared in captivity depends on the ecological characteristics of the species and could be related to the diet of the animals in question. The genotypic features of the animals also tell on the mercury storage capacity. Changes in the antioxidant system occur in correlation with the participation of its individual components in detoxication.

Key words: mercury, carnivorous mammals, antioxidant system.

Введение

Экологическая опасность ртути и последствия ее негативного влияния на организм представляют на сегодняшний день серьезную проблему. Ртуть занимает особое место среди поллютантов в связи с аномально высокой эффективностью ее усвоения, биодоступностью, чрезвычайно низкой скоростью выведения и высокой токсичностью для жи-

вотных и человека. Отдельные соединения ртути различаются по своей токсичности и устойчивости, но наиболее опасным и стабильным является метилртуть [Немова, 2005; Медведев, Ивантер, 2007]. Аккумулируясь в тканях, ртуть и ее соединения блокируют белки-ферменты, контролирующие жизненно важные функции, нарушают структуру молекулы ДНК, а также обмен витаминов и микроэлементов.

¹ Институт биологии Карельского научного центра РАН

²Петрозаводский государственный университет

³ Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН

⁴000 «Северная пушнина»

В отличие от того внимания, которое уделяется исследованию аккумуляции ртути и метилртути водными экосистемами [Немова, 2005], подобные процессы в наземной фауне остаются малоизученными [Grigal, 2003]. Основная масса исследований по накоплению ртути млекопитающими проводится при нагрузке сублетальными или летальными дозами токсиканта с использованием в качестве объектов преимущественно лабораторных животных [Basu et al., 2007]. При этом взаимосвязь между физиолого-биохимическим статусом, систематической принадлежностью, экологическими особенностями млекопитающих и интенсивностью накопления поллютанта практически не изучена. Наряду с животными, обитающими в природе, введенные в зоокультуру хишные млекопитающие представляют уникальный объект для исследований такого рода, поскольку, несмотря на достаточно длительное время разведения в условиях неволи, у них сохранились характерные для диких предков особенности: моноэстричность, строгая сезонная цикличность многих процессов и др.

Цель настоящего исследования – сравнительно-видовое изучение накопления ртути и выявление взаимосвязи этого процесса с физиолого-биохимическими и экологическими особенностями норок, лисиц, песцов, енотовидных собак и лисо-песцовых гибридов, являющихся в связи с особенностями их питания потенциальными объектами интоксикации соединениями ртути.

Материал и методы

Исследовали 7-месячных животных (самцы и самки) клеточного содержания семейства Canidae – енотовидные собаки (Nyctereutes procyonoides Gray), вуалевые песцы (Alopex lagopus L.), серебристо-черные лисицы (Vulpes vulpes L.) и лисо-песцовые гибриды (Alopex-Vulpes hybrids) и семейства Mustelidae - серебристо-голубые и пастелевые норки (Neovison vison Shr.). Лисо-песцовые гибриды были получены при скрещивании самок песца шедоу с самцами серебристо-черных лисиц (светлый окрас) и при скрещивании самок вуалевого песца с самцами серебристо-черных лисиц (темный окрас). Песцы, лисицы и норки двух окрасов были выращены в зверохозяйстве ЗАО «Пряжинское» (Республика Карелия), енотовидные собаки и гибриды - на звероферме 000 «Северная пушнина» (филиал «Знаменка», Псковская область).

Образцы тканей печени, почек и скелетной мышцы отбирали в период планового забоя животных. Содержание ртути в образцах определяли на ртутном анализаторе РА-915+ с приставкой ПИРО (Люмэкс) атомно-абсорбционным методом холодного пара без предварительной пробоподготовки. Точность аналитических методов измерения контролировали с использованием сертифицированного биологического материала DORM-2 и DOLM-2 (Институт химии окружающей среды, Оттава, Канада). Концентрации ретинола и α-токоферола определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [Скурихин, Двинская, 1989], стандартами служили ретинол и α-токоферол фирмы «Sigma» (США). Активность антиоксидантных ферментов (АОФ) измеряли спектрофотометрически: супероксиддисмутазы (СОД) - по модифицированной адренохромной методике [Misra, Fridovich, 1972] и каталазы – по количеству разложенной Н₂О₂ [Bears, Sizer, 1952]. Уровень восстановленного глутатиона определяли по методу Эллмана [Sedlak, 1968].

Полученные данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики, сравнение проводили с применением непараметрического критерия Вилкоксона – Манна – Уитни [Коросов, Горбач, 2007]. Работа выполнена с соблюдением правил проведения работ с использованием экспериментальных животных [Этическая экспертиза..., 2005].

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований были выявлены различия в концентрациях ртути в органах и тканях: у всех исследованных представителей семейств Canidae и Mustelidae больше всего ртути содержалось в почках, меньше - в печени и мышцах. Отмечены значительные межвидовые и внутривидовые различия в уровне накопления ртути. Как и в природе, ее максимальное количество отмечено у енотовидной собаки (рис. 1). Если у отловленных в природе енотовидных собак содержание металла в печени было максимально (0,5-1,0 мг/кг) и кратно выше, чем в почках и мышцах [Комов, 2010], то у выращенных на ферме животных уровень поллютанта был ниже и одинаковым в печени и почках (0,13-0,25 мг/кг). В отличие от лисиц и песцов (рис. 1), у которых содержание ртути во всех исследованных органах было минимальным среди представителей семейства Canidae, у лисо-песцовых гибридов обоих окрасов уровень металла был значительно выше - 0,07-0,10 мг/кг в печени,

0,17-0,22 мг/кг в почках и 0,02-0,03 мг/кг в мышцах. Одной из причин довольно высокой степени аккумуляции поллютанта у енотовидных собак и гибридов и низкой у лисиц и песцов могут являться различия в кормовом рационе на звероферме ООО «Северная пушнина» и в зверохозяйстве ЗАО «Пряжинское». Помимо этого, высокое содержание ртути в органах енотовидной собаки может быть связано с особенностями ее экологии - в осенний период у нее происходит интенсификация анаболических процессов и накопление больших запасов жира, в котором способно откладываться значительное количество метилртути. Период биологического полураспада этого токсиканта, особенно в организмах с низким уровнем обмена веществ, необычайно длителен (у человека 70 дней), поэтому яд не выделяется, а, наоборот, задерживается в организме.

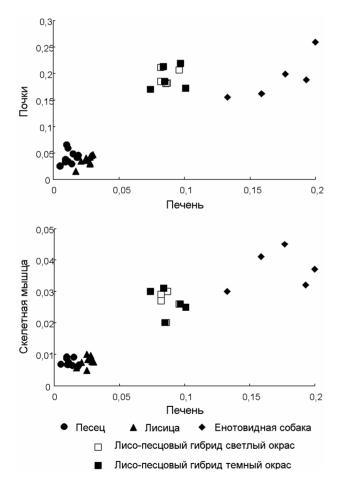


Рис. 1. Содержание ртути (мг/кг ткани) в органах млекопитающих семейства *Canidae*

Для природных популяций установлено [Комов, 2010], что представители мелких куньих (ласка, горностай) содержали ртуть в меньших количествах (до 0,3 мг/кг), чем крупные (норка, выдра, хорь). У последних среднее содержание

металла в мышечной ткани составило 0,3–0,5, в печени и почках – 0,5–0,7 мг/кг сырой массы. В отличие от этого у разводимых в неволе норок двух окрасов (серебристо-голубых и пастелевых) во всех исследованных тканях отмечена более высокая (в 2–6 раз) концентрация ртути (рис. 2), по сравнению с лисами и песцами (рис. 1). Наблюдаемое явление, как и в случае с енотовидной собакой, могло быть обусловлено более высокой интенсивностью удельного метаболизма.

Известно, что активность антиоксидантных ферментов зависит в значительной степени от уровня метаболизма, присущего для каждого организма [Зенков и др., 2001]. Чем он выше, тем, как правило, больше активность АОФ. У норок ввиду их морфо-анатомических особенностей (вытянутая форма тела и др.) уровень основного обмена существенно больше, чем у песцов и лисиц [Casey et al., 1979]. По всей видимости, именно по этой причине в нашем исследовании установлена прямая корреляционная зависимость между уровнем ртути и активностью СОД и каталазы в печени (рис. 3). Активность АОФ и содержание поллютанта были выше у исследованных представителей семейства Mustelidae, по сравнению с песцами и лисицами.

То, что у норок содержание ртути в органах выше, чем у песцов и лисиц, также может быть связано с особенностями кормления этих животных - в период забоя норкам скармливают тушки лисиц и песцов. Такой зоотехнический прием не представляет для норок опасности, так как пороговая концентрация ртути в пище норки, вызывающая функциональные нарушения, равна 1,1 мг/кг сырой массы [Scheuhammer et al., 2007]. Имеется как минимум один документально зарегистрированный факт смерти наземного хищника от отравления ртутью - пантеры [Facemire et al., 1995]. Основным источником ртути для пантеры послужили еноты - рыбоядные наземные хищники.

Имеющиеся данные свидетельствуют о различной чувствительности представителей даже одного вида к воздействию токсиканта. Так, в исследованиях на человеке установлено [James et al., 2004], что аутисты и страдающие болезнью Альцгеймера более чувствительны к токсическим влияниям ртути и содержащим ее препаратам, поскольку их организм не способен эффективно выводить эти токсические вещества [Haley, 2005]. При этом мужские половые гормоны увеличивают восприимчивость к нейротоксичности ртути, а женские обеспечивают хорошую степень защиты. Для норок

отмечена высокая внутривидовая вариабельность накопления токсиканта – его уровень во всех органах был выше у пастелевых норок, чем у серебристо-голубых (рис. 2). Внутривидовые различия по способности накапливать даже эссенциальные микроэлементы отмечаются практически у всех пушных животных [Плотников и др., 2008]. По всей видимости, генотипические различия в концентрации ртути связаны и с неодинаковой интенсивностью метаболизма у норок разных генотипов [Ильина и др., 2007].

В органах всех видов, разводимых в неволе, отмечены концентрации ртути более низкие, чем в природных популяциях [Evans et al., 2000; Комов, 2010], и значительно ниже тех, которые вызывают токсические эффекты. Так, для норки и выдры содержание ртути в мозге, превышающее 10 мг/кг, и в печени в пределах 20–100 мг/кг несовместимо с жизнью [Dansereau et al., 1999]. У лисиц острый токсикоз с летальным исходом наблюдался при содержании ртути в печени и почках на уровне 30 мг/кг [Borg et al., 1969].

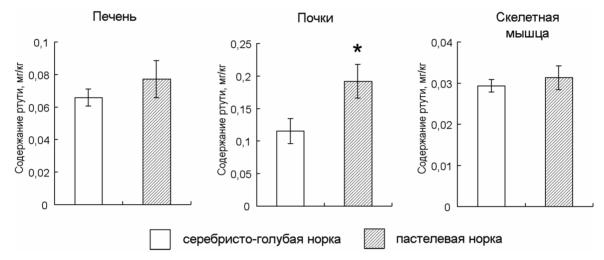


Рис. 2. Содержание ртути в органах норок разных окрасов $(M \pm m)$

 $[\]star$ – различия достоверны по сравнению с серебристо-голубой норкой (p < 0,05)

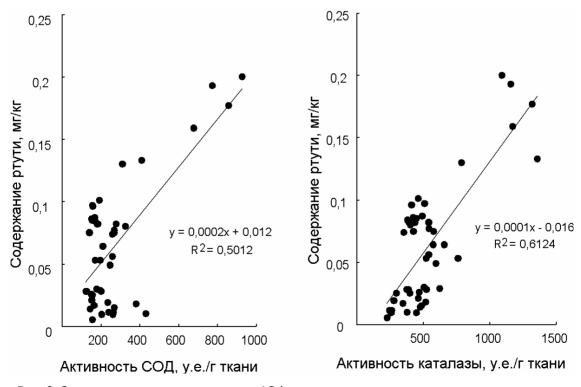


Рис. 3. Зависимость между активностью АОФ и содержанием ртути в печени у исследованных млекопитающих

Токсические эффекты ртути связаны со способностью метилртути связываться с сульфгидрильными группами ферментов, ионных каналов и рецепторов, что приводит к нарушению работы антиоксидантной системы и усиленной генерации свободных радикалов и активных форм кислорода [Lund, Miller, 1993; Mozaffarian, Rimm, 2006]. Исследование состояния систем генерации и тушения активных форм кислорода показало, что при наблюдаемых концентрациях поллютанта не происходит их существенного изменения. Не было обнаружено зависимости между содержанием ртути и количеством витаминов Е и А, что свидетельствует об отсутствии существенной нагрузки на антиоксидантную систему животных. Отмечена прямая корреляционная зависимость между уровнем ртути и содержанием небелковых SHгрупп в почках (рис. 4). Это, очевидно, связано с тем, что для выведения из организма вначале должен образоваться комплекс ртути с глутатионом, который затем выделяется из клеток в кровь и в дальнейшем с участием печени выводится из организма. Установлено, что при низких концентрациях ртути в органе (до 0,15 мг/кг ткани) количество небелковых SHгрупп, с которыми может связаться металл для последующего выведения, возрастает параллельно с увеличением концентрации поллютанта (рис. 4). При дальнейшем увеличении его концентрации организм не способен обеспечить достаточное количество соединений с сульфгидрильными группами, чтобы эффективно выводить ртуть из организма.

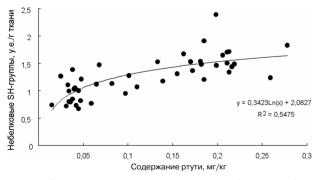


Рис. 4. Зависимость между уровнем небелковых SH-групп и содержанием ртути в почках у исследованных млекопитающих

Заключение

Таким образом, накопление ртути у разводимых в неволе хищных млекопитающих зависело от экологических особенностей вида (интенсивности клеточного и тканевого метаболизма) и могло определяться кормовой базой исследованных животных. Генотипические

особенности животных также отражаются на способности накапливать соединения ртути. При достаточно низком содержании ртути в органах зверей, разводимых в неволе, по сравнению с дикими животными, существенных нарушений в работе антиоксидантной системы выявлено не было. Обнаруженные изменения уровня небелковых сульфгидрильных групп были направлены на детоксикацию ртути и ее соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ НШ-3731.2010.4, НШ-1642.2012.4 и ФЦП ГК № 02.740.11.0700.

Литература

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

Ильина Т. Н., Илюха В. А., Калинина С. Н. и др. Влияние генотипа на сезонные изменения антиоксидантной системы и изоферментного спектра лактат-дегидрогеназы американских норок (*Mustela vision* Schreber 1777) // Вестник ВОГиС. 2007. Т. 11, № 1. С. 145–154.

Комов В. Т. Содержание ртути в органах и тканях рыб, птиц и млекопитающих европейской части России // Ртуть в биосфере: эколого-геохимические аспекты: Материалы Междунар. симпоз. (Москва, 7–9 сент. 2010 г.). М., 2000. С. 14–19.

Коросов А. В., Горбач В. В. Компьютерная обработка биологических данных: Метод. пособие. Петрозаводск: ПетрГУ, 2007. 76 с.

Медведев Н. В., Ивантер Э. В. Экологическая токсикология природных популяций птиц и млекопитающих Севера. М.: Наука, 2007. 229 с.

Немова Н. Н. Биохимическая адаптация накопления ртути у рыб. М.: Наука, 2005. 164 с.

Плотников И. А., Орлов П. П., Федосеева Г. А. Микроэлементная обеспеченность клеточных степных сурков (Marmota bobak) в сравнении с дикими // Вопросы физиологии, содержания, кормопроизводства и кормления, селекции с.-х. животных, биологии пушных зверей и птиц, охотоведения: Материалы междунар. науч.-практ. конф. Киров, 2008. С. 281–286.

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

Этическая экспертиза биомедицинских исследований. Практические рекомендации / Ред. Ю. Б. Белоусова. М., 2005. 156 с.

Basu N., Scheuhammer A. M., Bursian S. J. et al. Mink as a sentinel species in environmental health // Environ Res. 2007. Vol. 103, N 1. P. 130–144.

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.

Borg K., Wanntorp H., Erne K., Hanko E. Alkyl mercury poisoning in terrestrial Swedish wildlife // Viltrevy. 1969. Vol. 6. P. 301–379.

Casey T. M., Withers P. C., Casey K. K. Metabolic and respiratory responses of arctic mammals to ambient temperature during the summer // Comp. Biochem. Physiol. 1979. Vol. 64A, N 2. P. 331–341.

Dansereau M., Lariviere N., Tremblay D. D., Belanger D. Reproductive performance of two generations of female semidomesticated mink fed diets containing organic mercury contaminated freshwater fish // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1999. Vol. 36. P. 221–226.

Evans R. D., Addison E. M., Villeneuve J. Y. et al. Distribution of inorganic and methylmercury among tissues in mink (*Mustela vison*) and otter (*Lutra canadensis*) // Environ Res. 2000. Vol. 84, N 2. P. 133–139.

Facemire C., Augspurger T., Bateman D. et al. Impacts of mercury contamination in the southeastern United States // Water Air Soil Pollut. 1995. Vol. 80. P. 923–926.

Grigal D. F. Mercury Sequestration in Forests and Peatlands: A Review // J. Environ. Qual. 2003. Vol. 32. P. 393–405.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Хижкин Евгений Александрович

младший научный сотрудник Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,

Россия, 185910 эл. почта: hizhkin84@mail.ru

Илюха Виктор Александрович

зав. лаб. экологической физиологии животных, д. б. н. Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: ilyukha@bio.krc.karelia.ru

тел.: (8142) 573107

тел.: (8142) 573107

Комов Виктор Трофимович

зам. директора, д. б. н. ИБВВ им. И. Д. Папанина Ярославская обл., Некоузский р-н, п. Борок, Россия, 152742 эл. почта: vkomov@ibiw.yaroslavl.ru

Паркалов Иван Владимирович

председатель совета директоров ООО «Северная пушнина» ул. Финляндская, 19, г. Санкт-Петербург, Колпино, Россия эл. почта: parkalov@nordfurs.ru

Ильина Татьяна Николаевна

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

эл. почта: ilyina@ bio.krc.karelia.ru

тел.: (8142) 573107

Haley B. E. Mercury toxicity: Genetic susceptibility and synergistic effects // Medical Veritas. 2005. Vol. 2. P. 535–542.

James S. J., Cutler P., Melnyk S. et al. Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism // Am. J. Clin. Nutr. 2004. Vol. 80. P. 1611–1617.

Lund B. O., Miller D. M. Studies in Hg-induced ${\rm H_2O_2}$ production and lipid peroxidation in vitro in rat kidney mitochondria // Biochem. Pharmacol. 1993. Vol. 45. P. 2017–2024.

Misra H. H., Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase // J. Biol. Chem. 1972. Vol. 247. P. 3170–3175.

Mozaffarian D., Rimm E. B. Fish intake, contaminants, and human health evaluating the risks and the benefits // JAMA. 2006. Vol. 296, N 15. P. 1885–1899.

Scheuhammer A., Meyer M., Sandheinrich M., Murray M. Effects of environmental methylmercury on the health of wild birds, mammals, and fish // Ambio. 2007. Vol. 36, N 1. P.12–18.

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.

Khizhkin, Evgeniy

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences 11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia e-mail: hizhkin84@mail.ru tel.: (8142) 573107

Ilyukha, Viktor

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

Komov, Victor

Institute of Inland Waters Biology, Russian Academy of Sciences 152742 Borok, Nekouzskiy District, Jaroslavl Region, Russia e-mail: vkomov@ibiw.yaroslavl.ru

Parkalov, Ivan

LLC «North furs»

19 Finlyandskaya St., Kolpino, St. Petersburg, Russia e-mail: parkalov@nordfurs.ru

Ilyina, Tatyana

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

Баишникова Ирина Валерьевна

ведущий биолог

Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: iravbai@mail.ru тел.: (8142) 573107

Сергина Светлана Николаевна

научный сотрудник

Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: cvetnick@yandex.ru

тел.: (8142) 573107

Гремячих Вера Алексеевна

старший научный сотрудник ИБВВ им. И. Д. Папанина Ярославская обл., Некоузский р-н, п. Борок, Россия, 152742 эл. почта: grva@ibiw.yaroslavl.ru

Камшилова Татьяна Борисовна младший научный сотрудник ИБВВ им. И. Д. Папанина Ярославская обл., Некоузский р-н, п. Борок, Россия, 152742

эл. почта: ktb@ibiw.yaroslavl.ru

Степина Елена Сергеевна

аспирант ИБВВ им. И. Д. Папанина Ярославская обл., Некоузский р-н, п. Борок, Россия, 152742

Baishnikova, Irina

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

Sergina Svetlana

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

Gremyachikh, Vera

Institute of Inland Waters Biology, Russian Academy of Sciences 152742 Borok, Nekouzskiy District, Jaroslavl Region, Russia

e-mail: grva@ibiw.yaroslavl.ru

Kamshilova, Tatyana

Institute of Inland Waters Biology, Russian Academy of Sciences 152742 Borok, Nekouzskiy District, Jaroslavl Region, Russia e-mail: ktb@ibiw.yaroslavl.ru

Stepina, Elena

Institute of Inland Waters Biology, Russian Academy of Sciences 152742 Borok, Nekouzskiy District, Jaroslavl Region, Russia

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.322: [546.26: 553.9]: 543.424.2

СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ БИОКОНЪЮГАТОВ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА И ШУНГИТОВОГО НАНОУГЛЕРОДА

А. С. Горюнов¹, А. Г. Борисова¹, В. А. Колодей², С. П. Рожков¹

Получен спектр комбинационного рассеяния биоконъюгата белка – сывороточного альбумина быка с шунгитовым наноуглеродом в водной нанодисперсии. Сравнение спектра со спектрами компонентов биоконъюгата свидетельствует об изменениях во вторичной структуре белка, связанных с ослаблением образуемых аминокислотными остатками тирозина водородных связей.

Ключевые слова: бычий сывороточный альбумин, шунгитовый наноуглерод, спектроскопия комбинационного рассеяния, биоконъюгат, наночастица.

A. S. Goryunov, A. G. Borisova, V. A. Kolodey, S. P. Rozhkov. RAMAN SPECTROSCOPY OF BIOCONJUGATES OF BOVINE SERUM ALBUMIN AND SHUNGITE NANOCARBON

The Raman spectrum of the bioconjugate of protein – bovine serum albumin with shungite nanocarbon in aqueous nanodispersion has been obtained. Comparison of the spectrum with the spectra of the bioconjugate components indicates that the protein secondary structure is altered due to the weakening of hydrogen bonds formed by tyrosine amino acid residues.

Key words: bovine serum albumin, shungite nanocarbon, Raman spectroscopy, bioconjugate, nanoparticle.

Введение

Формирование комплексов белковых молекул с наночастицами открывает возможности для создания гибридных систем, функции которых смогут иметь разнообразные биотехно-

логические, химикотехнологические и медицинские приложения. Получение комплексов такого рода сопряжено с необходимостью контролировать и поддерживать компоненты в функционально активном структурном состоянии. Поэтому изучение взаимодействий между

¹ Институт биологии Карельского научного центра РАН

² Институт геологии Карельского научного центра РАН

наночастицей и белковой молекулой при их контакте в составе комплекса (биоконъюгата) представляет собой весьма важную задачу. Такая конъюгация часто приводит к модификации как структуры, так и функции белка, а иногда и свойств наночастицы [Aubin-Tam, Hamad-Shifferli, 2008]. Цель настоящей работы – установить наличие и характер изменений структуры молекул белка – сывороточного альбумина при образовании конъюгата с шунгитовым наноуглеродом путем анализа спектров комбинационного рассеяния биоконъюгата и его компонентов. В качестве метода, способного обнаружить изменения в структуре комплекса, использована спектроскопия комбинационного рассеяния (рамановская спектроскопия), которая известна как эффективный неповреждающий подход, дающий детальную информацию на молекулярном уровне, в частности, на уровне вторичной структуры белка.

Материал и методы

Сывороточный альбумин – основной белок плазмы крови. Молекула сывороточного альбумина быка (САБ) представляет собой единую полипептидную цепь из 585 аминокислотных остатков, сложенную в виде ряда петель, организованных в три гибко связанных домена, каждый из которых состоит из трех субдоменов; молекулярный вес около 66,5 кДа. Размеры белковой глобулы 14×4×4 нм. В цепи много заряженных и ароматических остатков (30 фенилаланинов и 21 тирозин), 5 метионинов и 35 полуцистеинов, которые образуют 17 дисульфидных мостиков. Эти дисульфидные связи определяют вторичную структуру молекулы альбумина, которую на 50-68 % составляют α-спирали и на 16-18 % - β-складки [Petitpas et al., 2001].

Шунгитовый наноуглерод в водной дисперсии представлен наночастицами (90–100 нм), сформированными из многослойных наноглобул <10 нм, которые в свою очередь образованы базовыми структурными элементами – непланарными графеновыми фрагментами размером <1 нм. Фрагменты являются стабилизаторами наноглобул в водной среде [Рожкова, 2011]. Водные нанодисперсии шунгитового углерода были получены по методике, описанной ранее в работах [Рожков и др., 2007; Rozhkova et al., 2007; Рожкова, 2011].

Сывороточный альбумин быка (САБ, V фракция, ПанЭко), растворенный в воде, использовали в эксперименте без дальнейшей очистки. Для получения биоконъюгатов белка с наноча-

стицами шунгитового углерода в нанодисперсию углерода вводили белковый раствор высокой начальной концентрации. В результате дисперсия содержала белок и наноуглерод в концентрациях 20 и 0,05 мг/мл, соответственно. Образование биоконъюгатов контролировалось с помощью спектроскопии динамического светорассеяния на анализаторе размеров наночастиц Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). При указанном соотношении концентраций компонентов некоторая часть белка находилась в свободном состоянии в растворе. Полученное распределение биоконъюгатов по размерам имело максимум при 200 нм и ширину 300 нм.

Регистрация спектров комбинационного рассеяния света (КРС) производилась на рамановском дисперсионном спектрометре Nicolet Almega XR (Thermo Scientific). При этом использовался ИК-лазер с длиной волны излучения 785 нм; спектральное разрешение прибора 1 см⁻¹, мощность возбуждающего лазера 300 мВт. Спектры регистрировались с 15-минутным накоплением. Растворы помещались в кварцевую кювету, которую устанавливали в отделении для макрообразцов перпендикулярно оси лазерного пучка.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведен спектр КРС водной нанодисперсии шунгитового углерода в интервале волновых чисел 700-1800 см⁻¹. Известно, что в спектрах КР аморфного углерода наблюдаются, как правило, две полосы - G(graphite)полоса с волновым числом (частотой) около 1560 см⁻¹ и D(diamond)-полоса с частотой око-1350 см⁻¹, обусловленные sp^2 -связями [Ferrari, Robertson, 2000]. G-полоса обусловлена растяжением пар sp^2 -связей в углеродных кольцах и цепях, а D-полоса - «дышащими» модами в углеродных цепях. Интенсивность полосы D является в известной степени мерой беспорядка структуры (вернее, структурной неупорядоченности углерода) [Сморгонская, Иванов-Омский, 2005; Ременюк и др., 2009]. Для порошка шунгита эти полосы наблюдаются на 1590 cm⁻¹ и 1345 cm⁻¹, соответственно, т. е. имеет место так называемый «синий сдвиг» для G-полосы и «красный» сдвиг для D-полосы. На спектре водной нанодисперсии шунгитового углерода наиболее интенсивными также являются G- и D-полосы, характерные для углеродных структур, но еще более сдвинутые друг от друга, 1605 см⁻¹ и 1318 см⁻¹, соответственно, причем как интенсивность, так и ширина полосы D несколько больше, чем G-полосы. Полуширина ($\Delta v_{1/2}$) полосы D составляет 104 см⁻¹, а полосы G – 70 см⁻¹. Кроме того, наблюдается небольшой пик около 1460 см⁻¹, который проявляется в спектрах KP нанокристалличе-

ских алмазов; его принято соотносить с сильно разупорядоченными кластерами sp^3 -связанного углерода [Ferrari, Robertson, 2001].

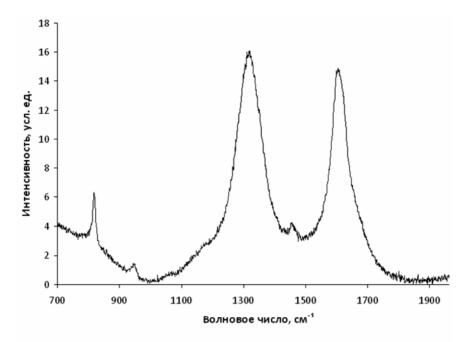


Рис. 1. Спектр комбинационного рассеяния нанодисперсии шунгитового углерода; концентрация углерода 0,1 мг/мл

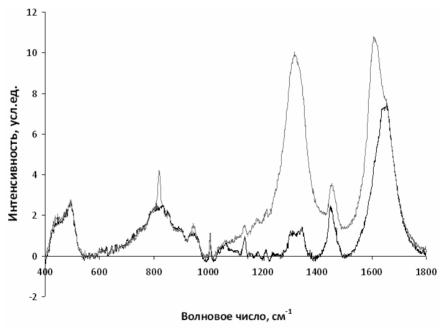


Рис. 2. Спектры комбинационного рассеяния водного раствора сывороточного альбумина быка, концентрация 20 мг/мл (черная линия); водной нанодисперсии биоконъюгата сывороточный альбумин быка – шунгитовый наноуглерод, концентрация по белку 20 мг/мл, по углероду – 0,05 мг/мл (серая линия)

Спектр нативного сывороточного альбумина быка в диапазоне 400–1800 см⁻¹ представлен на рис. 2. В спектре наблюдается ряд пиков различной ширины и интенсивности. Колеба-

ния в области 1400–1800 см⁻¹ обусловлены, в основном, двумя разновидностями связей: колебания пептидных связей -CO-NH-, формирующих белковую основу, и колебания, связан-

ные с боковыми цепочками аминокислот. В спектрах КР белковых молекул наблюдаются следующие полосы: амид I (1655–1675 см⁻¹), который представляет собой, главным образом, валентное колебание C=O; амид II (1560 см⁻¹, деформационное колебание N-H, валентное C-N); амид III (1240–1260 см⁻¹, валентное C-N, деформационное N-H) [Peticolas, 1995]. Пик 1450 см⁻¹ соответствует деформационному крутильному колебанию CH₂. В спектрах амида I и амида III, используемых для анализа вторичной структуры белка, проявляются колебания основной полипептидной цепи. При этом выделяются следующие характеристические частоты:

– амид I 1645-1655 см $^{-1}$ (α -спираль), 1670-1680 см $^{-1}$ (β -структура) и 1660-1670 см $^{-1}$ (хаотический клубок, валентные колебания C=O связи):

– амид III 1270–1280 см $^{-1}$ (α -спираль), 1230–1240 см $^{-1}$ (β -структура) и 1240–1260 см $^{-1}$ (хаотический клубок, C-N растяжение, NH поворот) [Peticolas, 1995].

Для раствора САБ в воде наблюдаются полосы амида I: $1638-1654 \, \text{cm}^{-1}$, $1450 \, \text{cm}^{-1}$, $1290-1350 \, \text{cm}^{-1}$ (широкая полоса), острый пик при $1006 \, \text{cm}^{-1}$ (дыхательная мода бензольного кольца фенилаланина) и ряд полос в области $700-900 \, \text{cm}^{-1}$.

При сравнении спектров (рис. 2) обнаруживается, что интенсивность рассеяния шунгитового наноуглерода в водной дисперсии гораздо выше, чем у белка в растворе при используемых в эксперименте концентрациях. Кроме того, в области 1100–1800 см⁻¹ рассеяние шунгитовой дисперсии полностью перекрывает рассеяние белка, что способно существенно усложнить анализ спектров.

На рис. 2 представлен также спектр биоконъюгата САБ с шунгитовым углеродом в водной нанодисперсии. Самыми интенсивными в этом спектре по-прежнему являются полосы шунгитового углерода – полосы G и D (1606 и 1318 см $^{-1}$, соответственно). Положение пиков при этом не изменилось, однако возросли их интенсивности за счет вклада белка, кроме того, пик G стал шире $\Delta v_{1/2} = 95$ см $^{-1}$, а пик D, наоборот, сузился $\Delta v_{1/2} = 94$ см $^{-1}$. Вклад белка особенно заметен в области полосы амид I, которая на спектре проявляется как плечо на частоте 1654 см $^{-1}$. Аналогичные спектры были сняты для конъюгатов с различной концентрацией шунгитового углерода (от 0,01 до 0,05 мг/мл).

Отсутствие зависимости положения максимумов полос D и G от содержания сывороточного альбумина в растворе свидетельствует о том, что белок в составе конъюгата не оказы-

вает заметного воздействия на химические связи в углеродной матрице и структуру шунгитового углерода в нанодисперсии.

Для качественной оценки конформационных изменений молекулы белка, в частности, при его частичной или полной денатурации используется полоса амид I, которая, как известно, является индикатором воздействий на вторичную структуру молекул белков и полипептидов. В конъюгатах шунгитового углерода с САБ положение полосы амид I (плечо 1654 см⁻¹) остается неизменным, что отражает тот факт, что преобладающей вторичной структурой во всех образцах по-прежнему является α-спираль.

Для спектра биоконъюгата характерны белковые пики в области 500-1100 см⁻¹, а также малоинтенсивные пики шунгитового наноуглерода при 820 и 943 см⁻¹. Перекрывание этих пиков, хотя и частичное, вызывает определенные трудности при анализе спектров. Полосы при 1343 и 890 см⁻¹ соответствуют колебаниям ароматических аминокислот САБ, содержащего 3 остатка триптофана, а пики 830 и 850 см-1 соотносят с остатками тирозина [Peticolas, 1995]. Этот тирозиновый дублет вызван резонансом между основными модами кольца и обертонами. Соотношение интенсивностей полос при 850 и 830 см является конформационно-чувствительным и отражает состояние триптофана. Колебание кольца фенилаланина (дыхательная мода) проявляется достаточно интенсивной полосой при 1006 см⁻¹, поскольку в молекуле белка 30 остатков этой аминокислоты.

При сравнении спектров нативного белка и биоконъюгата видно, что полоса 1343 см⁻¹ полностью перекрывается полосой D шунгитового наноуглерода. Изменение пика при 890 см⁻¹ состоит лишь в некотором снижении его интенсивности, а полоса 1006 см⁻¹ остается неизменной, из чего можно сделать вывод, что состояние остатков триптофана и фенилаланина в биоконъюгате сохраняется. Пик при 1315 см⁻¹, отражающий изменения в колебаниях С-Н-связей боковых аминокислотных цепей и хорошо заметный в спектре нативного белка, также полностью перекрыт полосой D наноуглерода.

Характерный для шунгитового наноуглерода слабый пик при 950 см⁻¹ совпадает с широким пиком белка 920–960 см⁻¹, поэтому на спектре биоконъюгата наблюдается усиление интенсивности полосы в этой области спектра.

Изменения положения пиков тирозинового дублета в конъюгате также не обнаруживается; однако значения отношения интенсивностей линий тирозинового дублета при 850 и 830 см⁻¹ для нативного и конъюгированного белка различаются. Они составили 0,89 и 0,81 соответ-

ственно. Уменьшение этого соотношения может отражать ослабление водородных связей, образуемых остатками тирозина с окружающими атомными группами. Вероятно, это происходит за счет взаимодействия с наноуглеродом и, в частности, с его базовыми структурными элементами – непланарными графеновыми фрагментами, поскольку эти структуры имеют дипольный момент, который в разбавленных растворах составляет величину $\mu \cong 6,5 \ Д$.

Таким образом, сравнение спектра биоконъюгата шунгитового наноуглерода с сывороточным альбумином быка в водной нанодисперсии со спектрами компонентов биоконъюгата свидетельствует о том, что структура и свойства белка в присутствии шунгитового наноуглерода претерпевают лишь незначительные изменения. Они относятся ко вторичной структуре белка и связаны с ослаблением образуемых аминокислотными остатками тирозина водородных связей.

Выражаем признательность Н. Н. Рожковой за предоставленные нанодисперсии шунгитового углерода.

Литература

Ременюк А. Д., Звонарева Т. К., Захарова И. Б. и др. Исследование оптических свойств аморфного углерода, модифицированного платиной // Физика

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Горюнов Андрей Сергеевич

ведущий научный сотрудник, к. ф.-м. н. Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: goryunov@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 769810

Борисова Александра Григорьевна

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

эл. почта: borisova@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 769810

Колодей Владимир Александрович

физик

Институт геологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: geology@krc.karelia.ru

Рожков Сергей Павлович

ведущий научный сотрудник, д. б. н. Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: rozhkov@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 769810

и техника полупроводников. 2009. Т. 43, № 7. C. 947-952.

Рожков С. П., Ковалевский В. В., Рожкова Н. Н. Фуллереносодержащие фазы, получаемые из водных дисперсий наночастиц углерода // Журн. физ. химии. 2007. Т. 81, № 6. С. 952–958.

Рожкова Н. Н. Наноуглерод шунгитов. Петрозаводск: Карельский НЦ РАН, 2011. 100 с.

Сморгонская Э. А., Иванов-Омский В. И. Исследование углеродной структуры композитных пленок α -C:H<Cu> и α -C:H<Co> методом рамановской спектроскопии // Физика и техника полупроводников. 2005. Т. 39, № 8. С. 970–975.

Aubin-Tam M. E., Hamad-Schifferli K. Structure and function of nanoparticle-protein conjugates // Biomed Mater. 2008. Vol. 3, N 3. P. 034001.

Ferrari A. C., Robertson J. Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon // Physical Review. B. 2000.Vol. 61, N 20. P. 14095.

Ferrari A. C., Robertson J. Resonant Raman spectroscopy of disordered, amorphous and diamond like carbon // Physical Review. B. 2001. Vol. 64, N 7. P. 075414.

Peticolas W. L. Raman Spectroscopy of DNA and Proteins // Methods Enzymol. 1995. Vol. 246. P. 389–416.

Petitpas I., Grune T., Bhattacharya A. A., Curry S. J. Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids // Mol. Biol. 2001. Vol. 314, N 5. P. 955–960.

Rozhkova N. N., Gribanov A. V., Khodorkovskii M. A. Water mediated modification of structure and physical chemical properties of nanocarbons // Diamond and Related Materials. 2007. Vol. 16. P. 2104–2108.

Goryunov, Andrey

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

Borisova, Alexandra

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

Kolodey, Vladimir

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

Rozhkov, Sergey

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences 11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia e-mail: rozhkov@krc.karelia.ru tel.: (8142) 769810 УДК 581.1

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССОВ ФОТОСИНТЕЗА РАСТЕНИЙ ОГУРЦА ПРИ КРАТКОВРЕМЕННОМ И ДЛИТЕЛЬНОМ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

М. И. Сысоева, Е. Н. Икконен

Институт биологии Карельского научного центра РАН

На основе анализа модельных данных выявлены существенные различия по интенсивности фотосинтеза и областям оптимума у растений огурца (*Cucumus sativus* L., гибрид Зозуля), подвергнутых на ранних этапах онтогенеза постоянному и кратковременному действию низких закаливающих температур. Постоянное действие низкой температуры значительно ингибировало фотосинтетические процессы и привело к сужению области оптимума и ее сдвигу в сторону низких значений температуры и освещенности, а нестабильность суточного температурного режима, напротив, способствовала усилению адаптационной способности растений огурца, значительно расширив область оптимума фотосинтеза.

Ключевые слова: *Cucumus sativus* L., температура, освещенность, фотосинтез, адаптационная способность.

M. I. Sysoeva, E. N. Ikkonen. OPTIMIZATION OF PHOTOSYNTHESIS PROCESSES IN CUCUMBER PLANTS IN SHORT-TERM AND LONG-TERM LOW TEMPERATURE TREATMENTS

We have analysed model data and revealed significant distinctions in the rate of photosynthesis and optimum condition ranges between cucumber (*Cucumus sativus* L., Zozulya ev.) plants exposed early in the ontogeny to long-term and to short-term low hardening temperatures. Continuous exposure to low temperature significantly inhibited photosynthesis, narrowed the optimum range and shifted it towards lower temperature and light values, whereas variations in daily temperature, on the contrary, enhanced the adaptation capacity of cucumber plants through notable expansion of the range optimal for photosynthesis.

Key words: Cucumus sativus L., temperature, light intensity, photosynthesis, adaptation capacity.

Введение

Влияние постоянных низких температур на фотосинтез растений достаточно хорошо изучено. В частности, показано, что фотосинтез огурца – типичного представителя тепло-

любивых растений – существенно подавляется при выращивании в низкотемпературных условиях в течение нескольких дней [Zhou et al., 2006; Borowski, 2009]. Значительно меньше внимание уделено исследованию краткосрочных низкотемпературных воздействий

[Курец, Попов, 1991]. Однако с учетом широкой распространенности в природе флуктуирующих температур, особенно в утренние и ночные часы ранневесеннего и осеннего периодов, а также использования переменных суточных температурных режимов в современных технологиях растениеводства защищенного грунта [Мое, Heins, 2000], исследование адаптационной способности фотосинтетического аппарата растений к действию кратковременных снижений суточных температур представляет большую актуальность и является одной из целей настоящего исследования.

Материал и методы

Растения огурца (Cucumus sativus L., гибрид Зозуля) выращивали в течение двух недель в камере искусственного климата методом песчаной проливной культуры при поливе модифицированным раствором Кнопа (рН 6,2-6,4), температуре 23 °C, фотопериоде 12 ч, фотосинтетически активной радиации (ФАР) 120 мкмоль/ M^2 -с, влажности воздуха 60-70 %. По достижении растениями фазы развернутого первого настоящего листа часть из них оставляли в этих условиях (вариант контроль), а остальные в течение 6 сут либо экспонировали при постоянной низкой температуре 12 °C (вариант ПНТ), либо ежедневно на 2 ч помещали в условия низкой температуры в конце ночного периода (вариант ДРОП). Интенсивность нетто-фотосинтеза измеряли с помощью портативной системы для исследования СО₂-газообмена растений (Walz, Германия) с использованием листовой камеры с контролируемыми условиями освещенности, температуры и влажности воздуха. Измерения скорости фотосинтеза проводили на первом настоящем листе в вегетационных камерах при температуре воздуха от 8 до 33 °C и освещенности от 20 до 1800 мкмоль/м²·с ФАР. Перед началом измерений растение адаптировали к температуре в течение 1 ч.

По экспериментальным данным методом множественного регрессионного анализа получены математические модели взаимосвязи нетто-фотосинтеза растений огурца с температурой и освещенностью:

 $\Phi = a_0 + a_1 \cdot T + a_2 \cdot E + a_3 \cdot E \cdot T + a_4 \cdot T^2 + a_5 \cdot E^2$, где Φ – интенсивность нетто-фотосинтеза (мкмоль/м²·с); E – освещенность (мкмоль/м²·с); T – температура (C); $a_0 - a_5$ – коэффициенты модели. Коэффициенты модели представлены в таблице.

Коэффициенты модели взаимосвязи неттофотосинтеза растений огурца с температурой и освещенностью

Вари-		Коэффициент					
ант	2	a,	2	a,	a,	9	R^2
опыта	$\mathbf{a}_{\scriptscriptstyle 0}$	α ₁	a_2	a_3	a_4	$a_{_5}$	- ' '
Конт-							
роль						-0,000009	
ДРОП	-3,037	0,380	0,016	0,0001	-0,0069	-0,000008	0,74
ПНТ	-6,847	0,566	0,011	0,0005	-0,0154	-0,000019	0,85

Примечание. R^2 – коэффициент множественной детерминации.

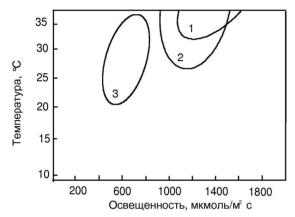
Результаты и обсуждение

Анализ моделей численными методами показал, что потенциальный максимум фотосинтеза растений огурца, подвергнутых постоянному действию низкой закаливающей температуры, значительно ниже (4,3 мкмоль/ $\rm M^2\cdot c$), чем у контрольных растений (15,4 мкмоль/ $\rm M^2\cdot c$). В то же время потенциальный максимум фотосинтеза растений, подвергнутых ДРОП-обработкам (13,9 мкмоль/ $\rm M^2\cdot c$), достоверно не отличался от контроля.

Анализ расположения 90%-ных областей оптимума фотосинтеза растений огурца в плоскости светового и температурного факторов показал, что максимум фотосинтеза контрольных растений достигался при высокой освещенности (1100–1500 мкмоль/ M^2 ·с) и температуре выше 31 °C (рис., область 1). Длительное низкотемпературное воздействие вызвало сдвиг области оптимума в сторону более низких температур (20-35 °C) и освещенности (400-800 мкмоль/ M^2 -с) (рис., область 3), в то время как при кратковременных снижениях температуры такого эффекта не наблюдалось. При этом ДРОП-обработки по сравнению с контролем привели к расширению области оптимума как по температуре (>26 °C), так и по освещенности $(900-1400 \text{ мкмоль/м}^2 \cdot \text{с}) (\text{рис., область 2}).$

Несмотря на то что теплолюбивые растения, к которым относится огурец, обладают слабой способностью адаптации к низким температурам [Allen, Ort, 2001; Yamori et al., 2010], данное исследование показало, что растения огурца, подвергшиеся кратковременному периодическому воздействию низких температур, приобрели способность поддерживать высокий уровень фотосинтеза при более низких по сравнению с контролем температурах. Расширение зоны оптимума фотосинтеза как по температуре, так и по освещенности у растений, испытавших кратковременные воздействия низких температур, может быть рассмотрено как повышение адаптационной способности фотосинтеза, обеспечивающей высокую устойчивость и про-

дуктивность растений в условиях нестабильного климата. Результаты данной работы согласуются с предположением Е. Ф. Марковской с соавт. [2008] о том, что стратегия развития растения при периодических кратковременных снижениях температуры заключается в повышении устойчивости, стимуляции метаболических процессов и настройке на активный метаболизм. Также ранее нами было установлено, что ответной реакцией растений на ежесуточное кратковременное воздействие низкой температурой является увеличение устьичной проводимости при низких и высоких температурах [Икконен и др., 2012], что может обусловить выявленное в данной работе расширение температурной области оптимума фотосинтеза.



90%-е области оптимума нетто-фотосинтеза растений огурца в зависимости от освещенности и температуры при кратковременном (ДРОП) и длительном (ПНТ) низкотемпературных воздействиях:

1 – контроль; 2 – ДРОП; 3 – ПНТ

Таким образом, выявлены существенные различия как по интенсивности фотосинтеза растений огурца, так и по областям оптимума при постоянном и кратковременном низкотемпературном воздействиях. Если постоянное действие низкой температуры значительно ингибирует фотосинтетические процессы и при-

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Сысоева Марина Ивановна

главный научный сотрудник, д. б. н. Институт биологии Карельского научного центра РАН ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: sysoeva@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 762706

Икконен Елена Николаевна

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

эл. почта: ikkonen@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 762706

водит к сужению области оптимума и ее сдвигу в сторону низких значений температуры и освещенности, то нестабильность суточного температурного режима, напротив, значительно расширяет оптимальную область фотосинтеза, способствуя усилению адаптационной способности растений огурца.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 10-04-00097_а).

Литература

Икконен Е. Н., Шибаева Т. Г., Сысоева М. И., Шерудило Е. Г. Устьичная проводимость Cucumis sativus L. при длительном и кратковременном действии низких температур // Физиология растений. 2012. № 5 (в печати).

Курец В. К., Попов Э. Г. Статистическое моделирование системы связей растение – среда. Л.: Нау-ка, 1991. 152 с.

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.

Allen D. J., Ort D. R. Impact of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants // Trends in Plant Science. 2001. N 6. P. 36–42.

Borowski E. Response to chilling in cucumber (*Cucumus sativus* L.) plants treated with triancontanol and Asahi SL // Acta Agrobotanica. 2009. N 62 (2). P. 165–172.

Moe R., Heins R. D. Thermo- and photomorphogenesis in plants // Advances in Floriculture Research. Agric. Univ. of Norway. Report N 6. 2000. P. 52–64.

Yamori W., Noguchi K., Hikosaka K., Terashima I. Phenotypic plasticity in photosynthetic temperature acclimation among crop species with different cold tolerances // Plant Physiology. 2010. Vol. 152. P. 388–399.

Zhou Y. N., Mao W. H., Zhang Y. Y. et al. Role of thermal dissipation in the photoprotection in cucumber plants after exposure to a chill stress // Photosynthetica. 2006. N 44 (2). P. 262–267.

Sysoeva, Marina

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

tel.: (8142) 762706

Ikkonen, Elena

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

tel.: (8142) 762706

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ КРУГЛОСУТОЧНОГО ОСВЕЩЕНИЯ НА СОСТОЯНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА И РОСТ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА *CUCUMIS SATIVUS* L. НА РАННИХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА

Т. Г. Шибаева¹, Е. Ф. Марковская²

В первые две недели выращивания у растений огурца в условиях фотопериода 24/0 ч относительная скорость роста, накопление биомассы, доля корней в общей биомассе растений были выше по сравнению с растениями в условиях других фотопериодов при разных уровнях освещенности. На третьей неделе выращивания в условиях круглосуточного освещения у растений развивались признаки обратимого фотоповреждения активно растущих листьев (хлороз) и фотоингибирование ФС II, а также происходило снижение относительной скорости роста и продуктивности. Выявлена возможность использования фотопериода 24/0 ч при относительно низкой освещенности для выращивания рассады огурца в условиях закрытых систем и защищенного грунта, что обеспечивает повышение продуктивности и снижение начальных и энергетических затрат.

Ключевые слова: *Cucumis sativus* L., круглосуточное освещение, фото-ингибирование. хлороз.

T. G. Shibaeva, E. F. Markovskaya. GROWTH AND THE STATE OF THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF YOUNG CUCUMBER PLANTS (CUCUMIS SATIVUS L.) UNDER CONTINUOUS LIGHT

Continuous light enhanced the growth rate and biomass accumulation and increased the root weight ratio compared to other photoperiods in the first two weeks of cucumber seedling growth irrespective of light intensity. Extension of day length to 24 h at later stages gave no further increases in growth rate or dry matter increment. Moreover, plants under continuous light developed the light injury symptoms (reversible chlorosis) and their photosystem II suffered from photoinhibition. It is suggested that a 24-h photoperiod with relatively low photosynthetic photon flow can be used for cucumber transplant production in closed systems and greenhouses in order to reduce initial and operational costs.

 \mbox{Key} words: $\mbox{\it Cucumis sativus}$ L., photoperiod, continuous light, photoinhibition, foliar chlorosis.

¹ Институт биологии Карельского научного центра РАН

² Петрозаводский государственный университет

Введение

Свет функционально необходим для фотосинтезирующих организмов, трансформирующих и запасающих энергию солнечной радиации в химических связях органического вещества. Вместе с тем свет является агрессивным фактором, способным при определенном сочетании других факторов среды вызывать фотоингибирование, фотодинамическое разрушение фотосинтезирующего аппарата и даже гибель клеток [Demmig-Adams, Adams, 1992; Long et al., 1994; Рубин, 1995]. Эта проблема актуальна при выращивании растений в условиях закрытых систем и защищенного грунта, где круглосуточное освещение является одним из путей повышения продуктивности растений [Sysoeva et al., 2010; Velez-Ramirez et al., 2011], особенно в зимнее время, так как зимняя продукция тепличных культур полностью зависит дополнительного освещения Gosselin, 2002]. Чтобы минимизировать затраты на обогрев в ночной период, а также потери энергии и СО₂, необходимый интеграл света от искусственных источников должен быть распределен в течение как можно более длительного времени в сутках. Выращивание растений огурца в условиях круглосуточного освещения приводит с развитию хлороза листьев и снижению урожая плодов [Wolff, Langerud, 2006], в связи с чем рекомендуемый фотопериод для коммерческого выращивания огурцов составляет 18-20 ч [Dorais, 2003]. Однако эти данные получены для растений, подвергшихся действию круглосуточного освещения в послерассадный период, после 4 недель выращивания в условиях фотопериода 18/6 ч. Влияние же круглосуточного освещения на рост и развитие растений огурца в период выращивания рассады изучено не было.

Целью настоящей работы было изучение влияния круглосуточного освещения на рост и состояние фотосинтетического аппарата растений огурца на ранних этапах онтогенеза в период выращивания коммерческой рассады огурца.

Материал и методы

Растения огурца (*Cucumis sativus* L.) гибрид Зозуля выращивали в камерах искусственного климата ВКШ-73 в сосудах с песком при температуре 23 ± 1 °C, относительной влажности воздуха 60-70 %. Растения поливали питательным раствором Кнопа с добавлением микроэлементов (pH 6,2-6,4). Растения выращивали при фотопериодах разной продолжительности

(8/16, 12/12, 16/8, 20/4 и 24/0 ч) и разных уровнях плотности потока фотонов ФАР на уровне верхнего листа – 60, 120 и 160 мкмоль/м²-с. Далее в тексте данные уровни освещения будем называть «низким», «средним» и «высоким». Источники света – лампы ДРЛ-400.

Анализ растений проводили через две и три недели от посадки. Растения, соответственно, были в фазе 2–3 и 6–8 настоящих листьев. Определяли площадь листьев, биомассу корней, стеблей и листьев растений. Относительную скорость роста растений (RGR) рассчитывали по формуле:

RGR = $(InW_2 - InW_1)/(t_2 - t_1)$, где W_1 и W_2 – сухая масса растения в периоды времени t_1 и t_2 .

Для измерений флуоресценции хлорофилла использовали анализатор фотосинтеза с импульсно-модулированным освещением (MINIPAM, Walz, Германия). Измерения проводили на активно растущих листьях (1–2-й лист и 3–5-й лист, соответственно, у двух- и трехнедельных растений). Определяли следующие параметры флуоресценции хлорофилла: потенциальный квантовый выход фотохимической активности ФС II (F_{ν}/F_{m}), относительную скорость транспорта электронов (ETR), коэффициенты фотохимического (qP) и нефотохимического (NPQ) тушения.

Содержание хлорофиллов определяли с помощью спектрофотометра СФ-2000 (Спектр, Россия) в экстракте 96%-м этиловым спиртом и рассчитывали по известным формулам [Lichtenthaler, Wellburn, 1983]. Измерения проводили в 4 биологических и 3 аналитических повторностях.

На рисунке и в таблицах представлены средние значения и их стандартные отклонения из двух независимых экспериментов. Разницу между средними значениями считали значимой при $P \le 0,05$.

Результаты и обсуждение

В первые две недели роста растений наблюдалась тенденция увеличения относительной скорости роста (RGR) (табл. 1) и накопления биомассы (рис., а) с увеличением продолжительности фотопериода до 24 ч. Анализ компонентов RGR показал, что увеличение произошло за счет более высоких значений скорости чистой ассимиляции (NAR), которые компенсировали снижение отношения листовой поверхности к общему весу растения (LAR) (табл. 1). Однако через три недели после посадки в наших экспериментах эффект стимуляции роста круглосуточным освещением

относительно других длинных фотопериодов не наблюдался. В условиях фотопериода 24/0 ч значения RGR (табл. 1) и накопления биомассы (рис., б) не отличались достоверно от таковых при фотопериоде 20/4 ч. Максимум накопления биомассы растений наблюдался при длине фотопериода 20 ч при всех уровнях освещенности (рис., б).

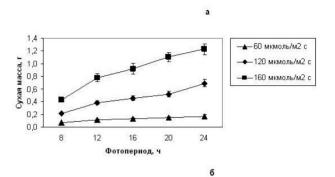
Таблица 1. Ростовые показатели растений C. sativus

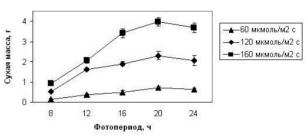
•			•	
Освещен- ность, мкмоль/ м ² ·с	Фото- пери- од, ч	RGR, r/r⋅cyт	NAR, мг/дм²⋅сут	LAR, cm²/r
	2 ⊦	едели после г	осадки	
60	16	$0,20 \pm 0,01$	14 ± 1	475 ± 19
	20	$0,21 \pm 0,01$	15 ± 1	436 ± 39
	24	$0,22 \pm 0,01$	17 ± 1	402 ± 25
120	16	$0,29 \pm 0,01$	16 ± 1	402 ± 21
	20	$0,30 \pm 0,01$	17 ± 2	377 ± 46
	24	$0,32 \pm 0,01$	23 ± 2	280 ± 22
160	16	$0,35 \pm 0,01$	23 ± 2	301 ± 20
	20	$0,36 \pm 0,01$	25 ± 2	289 ± 21
	24	$0,37 \pm 0,01$	26 ± 4	278 ± 43
	3 ⊦	едели после г	тосадки	
60	16	$0,22 \pm 0,02$	30 ± 5	412 ± 53
	20	$0,26 \pm 0,02$	35 ± 2	382 ± 17
	24	$0,22 \pm 0,02$	36 ± 2	332 ± 14
120	16	$0,24 \pm 0,01$	37 ± 3	295 ± 27
	20	$0,25 \pm 0,01$	48 ± 11	234 ± 42
	24	$0,18 \pm 0,02$	38 ± 5	252 ± 6
160	16	$0,22 \pm 0,02$	37 ± 2	285 ± 15
	20	$0,21 \pm 0,01$	50 ± 4	218 ± 10
	24	$0,18 \pm 0,01$	49 ± 3	220 ± 11

Увеличение длины дня при разных уровнях освещенности стимулировало увеличение доли корней в общей биомассе растения от 10 % при фотопериоде 8/16 ч до 20–30 % при фотопериодах 20/4 и 24/0 ч, что согласуется с данными литературы [Kläring, Kyuchukova, 2007]. Этот эффект важен для культуры огурца как растения с индетерминантным типом роста побега, реализация органогенного потенциала которого ограничивается относительно слабым развитием корневой системы [Zijlstra et al., 1994; Харькина, 1995].

Результаты настоящей работы показали, что снижение продуктивности в условиях фотопериода 24/0 ч через три недели после посадки тесно связано с состоянием фотосинтетического аппарата (ФСА) растений, показатели которого демонстрировали признаки фотоингибирования. Оно проявлялось в снижении значений показателей F_{ν}/F_{m} , ETR и qP у активно растущих листьев в условиях круглосуточного освещения относительно других длинных фотопериодов, наиболее ярко выраженное в условиях средней и высокой освещенности (табл. 2). Из литературы известно, что фотозащитная регуляция фотосинтеза по принципу

обратной связи приводит к фотоингибированию, если ночное восстановление является неполным [Franklin, Whitelam, 2004], что может иметь место при круглосуточном освещении. Считается, что при длительных воздействиях света высокой интенсивности возрастает время жизни возбужденных состояний хлорофилла и увеличивается скорость генерации активных форм кислорода (АФК). Можно предположить, что действие света умеренной интенсивности, но в течение 24 ч в сутки также может стимулировать генерацию АФК и приводить, как и свет высокой интенсивности, к угнетению процессов фотосинтеза и деструкции ФСА.





Влияние фотопериода на накопление биомассы растений *C. sativus* при разных уровнях освещения $(60, 120 \text{ и } 160 \text{ мкмоль/м}^2 \cdot \text{c})$ через 2 (а) и 3 (б) недели после посадки

Полученные результаты свидетельствовали об увеличении NPQ у двухнедельных растений в условиях фотопериода 24/0 (табл. 2), что, вероятно, предотвращало фотоинактивацию и фотоповреждение ФС II, снижая генерацию АФК [Demmig-Adams, Adams, 2002]. У трехнедельных растений величина NPQ снижалась, особенно в условиях высокой освещенности (табл. 2), указывая на неспособность к тепловому рассеиванию избытка энергии.

Функциональная инактивация ФСА у трехнедельных растений при фотопериоде 24/0 ч сопровождалась уменьшением общего содержания хлорофиллов (с проявлением признаков мезжилкового хлороза), а также увеличением содержания каротиноидов при всех уровнях освещенности (табл. 2). Круглосуточное освещение

привело к появлению признаков фотоповреждения листьев при всех уровнях освещенности, хотя более раннее появление и более сильное проявление хлороза отмечалось при более высокой интенсивности света. Признаки хлороза проявлялись у трехнедельных растений на активно растущих листьях. Со временем у заканчивающих рост листьев наблюдалось частичное устранение хлороза и восстановление зеленой окраски листьев, свидетельствующее об адаптации, в то время как новые активно растущие листья приобретали более выраженные признаки хлороза. Также в условиях фотопериода 24/0 ч при всех уровнях освещенности у растений наблюдалась эпинастия активно растущих листьев, еще даже не имеющих признаков хлороза. Снижение содержания хлорофиллов является способом сохранения ФСА за счет снижения генерации количества АФК. Этот процесс адаптации к круглосуточному освещению может приводить к модификации распределения хлорофилла между фотосистемами и изменению размеров фотосистем [Demers, Gosselin, 2002]. Наблюдаемое увеличение фракции каротиноидов в листьях огурца при круглосуточном освещении свидетельствует о возможном их участии в защите ФСА от фотоингибирования [Demers, Gosselin, 2002].

Таблица 2. Параметры флуоресценции хлорофилла и содержание пигментов у растений *C. sativus*

							14
Осве-						Хлоро-	Кароти-
щен-	Фото-					филл	ноиды,
ность,	пери-	F _v /F _m	ETR	qΡ	NPQ	a+b, мг/г	мг/г
мкмоль/	од, ч					сухой	сухой
M ² ⋅C						массы	массы
		Две н	едели	и после	е посад	ки	
60	16	0,79a	89a	0,83a	0,44a	20a	3,7a
	20	0,81b	95a	0,82a	0,44a	20a	3,4a
	24	0,81b	79b	0,67b	0,72b	19a	2,7b
120	16	0,79a	76a	1,02a	0,38a	17a	3,3a
	20	0,79a	81a	0,96a	0,30a	18a	3,6a
	24	0,79a	65b	0,62b	0,51b	16a	3,1a
160	16	0,80a	75a	0,78a	0,40a	17a	2,0a
	20	0,80a	80a	0,68a	0,46a	19a	2,0a
	24	0,79a	70a	0,56b	0,60b	15a	2,0a
		Три н	едели	1 после	посад	ки	
60	16	0,81a	47a	0,63a	0,86a	18a	2,7a
	20	0,79a	45a	0,62a	0,70b	18a	3,6b
	24	0,79a	41b	0,61a	0,58c	14b	4,1b
120	16	0,74a	54a	1,00a	0,59a	17a	1,9a
	20	0,71b	47b	1,14b	0,46b	16a	2,5b
	24	0,63c	35c	0,98a	0,35c	14b	2,8b
160	16	0,78a	68a	0,78a	0,82a	17a	2,3a
	20	0,71b	50b	0,60b	0,38b	17a	2,5a
	24	0,60c	29c	0,32c	0,27c	13b	3,0b

Примечание. Разные буквы указывают на достоверные различия (P ≤ 0,05).

Наши эксперименты показали, что в условиях круглосуточного освещения в первые две недели выращивания растений относительная скорость роста, накопление биомассы, доля

корней в общей биомассе растений были выше по сравнению с другими фотопериодами при разных уровнях освещенности. При дальнейшем выращивании в условиях фотопериода 24/0 ч у растений развивались признаки обратимого фотоповреждения активно растущих листьев и фотоингибирования ФС II, а также происходило снижение относительной скорости роста и продуктивности до уровня других длинных фотопериодов. С учетом того, что рассаду огурца выращивают в течение двух недель и использование фотопериода 24/0 ч с относительно низким фотосинтетическим фотонным потоком снижает начальные и операционные затраты на продукцию рассады [Koontz, Prince, 1986: Ohyama, Kozai, 1998; Ohyama et al., 2005], представляется целесообразным выращивание рассады огурца в условиях круглосуточного освещения. Однако требуются исследования последействия применения круглосуточного освещения в рассадный период на рост и продуктивность растений в послерассадный период, когда растения выращивают в условиях рекомендуемого для коммерческого выращивания огурцов фотопериода длительностью 18-20 ч.

Авторы выражают благодарность И. И. Слободяник за помощь в проведении экспериментов.

Литература

Рубин А. Б. Принципы организации и регуляции первичных процессов фотосинтеза // Тимирязевские чтения LV. Пущино: ОНТИ ПНЦРАН, 1995. 38 с.

Харькина Т. Г. Соотношение между надземными и подземными органами в онтогенезе *Cucumis sativus* L. // Контроль состояния и регуляция функций биосистем. Петрозаводск: Карельский НЦ РАН, 1995. C. 30–35.

Demers D. A., Gosselin A. Growing greenhouse tomato and sweet pepper under supplemental lighting: optimal photoperiod, negative effects of long photoperiod and their causes // Acta Hort. 2002. Vol. 580, P. 83–88.

Demmig-Adams B., Adams W. W. III. Photoprotection and Other Responses of Plants to High Light Stress // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1992. Vol. 43. P. 599–626.

Demmig-Adams B., Adams W. W. III. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition // Science. 2002. Vol. 298. P. 2149–2153.

Dorais M. The use of supplemental lighting for vegetable crop production: light intensity, crop response, nutrition, crop management, cultural practises // Canadian Greenhouse Conference (October 9, 2003). Toronto, 2003. P. 1–8.

Dorais M., Gosselin A. Physiological response of greenhouse vegetable crops to supplemental lighting // Acta Hort. 2002. Vol. 580. P. 59–67.

Franklin K. A., Whitelam G. C. Light signals, phytochromes and cross-talk with other environmental cues // J. Exp. Bot. 2004. Vol. 55. P. 271–276.

Kläring H.-P., Kyuchukova M.A. Shoot/root ratio of cucumber is affected by environmental conditions // Acta Hort. 2007. Vol. 731. P. 143–149.

Koontz H. V., Prince R. P. Effect of 16 and 24 hours daily radiation (light) on lettuce growth // Hort. Sci. 1986. Vol. 21. P. 123–124.

Lichtenthaler H. K. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes // Methods Enzymol. 1987. Vol. 148. P. 350–382.

Lichtenthaler H. K., Wellburn A. R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents // Biochem Soc. Trans. 1983, Vol. 603, P. 591–592.

Long S. P., Humphries S., Falkowski P. G. Photoinhibition of Photosynthesis in Nature // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1994. Vol. 45. P. 633–662.

Muraoka H., Takenaka A., Tang Y. et al. Flexible Leaf Orientations of Arisema heterophyllum Maximize Light 1306.

Velez-Ramirez A. I., van Ieperen W., Vreugdenhil D.,

Millenaar F. F. Plants under Continuous Light // Trends

in Plant Science, 2011, Vol. 16, N 6, P. 310-318,

Capture in a Forest Understory and Exess Irradiance at Defrosted Site // Ann. Bot. 1998, Vol. 82, P. 297–307.

consumption and its cost in a transplant production

factory with artificial lighting: a case study // J. Soc.

temperature regimes on physiological disorders and

floral development of tomato seedlings grown under continuous light // Hort. Sci. 2005. Vol. 40. P. 1304-

High Technol. Agr. 1998. Vol. 10. P. 96-107.

Ohyama K., Kozai T. Estimating electric energy

Ohyama K., Omura Y., Kozai T. Effects of air

Sysoeva M. I., Markovskaya E. F., Shibaeva T. G. Plants under continuous light: a review // Plant Stress. 2010. Vol. 4, N 1. P. 5–17.

Wolff S. A., Langerud A. Fruit yield, starch content and leaf chlorosis in cucumber exposed to continuous lighting // Europ. J. Hortic. Sci. 2006. Vol. 71. P. 259–261

Zijlstra S., Groot S. P. C., Jansen J. Genotypic variation of rootstocks for growth and production in cucumber; possibilities for improving the root system by plant breeding // Sci. Hort. 1994. Vol. 56. P. 185–196.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Шибаева Татьяна Геннадиевна

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

Марковская Евгения Федоровна

зав. кафедрой ботаники и физиологии растений, д. б. н., профессор Петрозаводский государственный университет пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

эл. почта: volev@sampo.ru тел.: (8142) 711019

Shibaeva, Tatyana

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

Markovskaya, Evgenia

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

tel.: (8142) 711019

ЮБИЛЕИ И ДАТЫ

ВЛАДИМИР КОНСТАНТИНОВИЧ КУРЕЦ (к 85-летию со дня рождения)



2012 год – юбилейный для доктора биологических наук, профессора, заслуженного деятеля науки РФ и Республики Карелия Владимира Константиновича Курца. Он родился 19 декабря 1927 г. в селе Мартышкино Ленинградской области. В 1948 г. окончил Псковский сельскохозяйственный техникум, а в 1953 г. - Ленинградский институт механизации и электрификации сельского хозяйства. С 1957 г. В. К. Курец - инженер по оборудованию Карельского филиала АН СССР, где начинаются его тесные контакты с биологами, совместно с которыми он разрабатывает термовегетационные домики и установки для исследования влияния низких температур почвы на минеральное питание растений и летних заморозков - на продуктивность и устойчивость растений. Это привело к оснащению научного стационара ИБ КФ АН СССР (Агробиологической станции) современными на тот период авторскими установками искусственного климата. Многоплановые технические решения биологических проблем позволили В. К. Курцу в соавторстве с А. И. Коровиным и С. Н. Дроздовым сформулировать принципы организации исследований по влиянию экстремальных факторов среды в искусственных условиях. Научный доклад с изложением основных положений этой разработки был представлен в Сибирском отделении (СО) АН СССР. В 1963 г. руководство СИФИБР СО АН СССР (г. Иркутск) пригласило Владимира Константиновича для проектирования и постройки первого в России фитотрона. В итоге - иркутский фитотрон был построен с применением только серийного отечественного оборудования. В 1971 г. В. К. Курец успешно защитил кандидатскую диссертацию на тему «Факторы внешней среды, определяющие заморозкоустойчивость растений и их экспериментальное моделирование», а в 1972 г. уже как биолог-исследователь вернулся в ИБ КФ АН СССР.

В Институте биологии КФ АН СССР под руководством В. К. Курца сформировалась новая исследовательская группа, включающая физиков, математиков и биологов, которая с 1977 г. получила статус лаборатории моделирования биологических процессов. Основными задачами вновь созданной лаборатории являлись конструирование и модернизация современного научного оборудования и разработка методологической и методической основы системного подхода для эколого-физиологических исследований.

В 1990 г. В. К. Курец успешно защитил в ТСХА (г. Москва) докторскую диссертацию на тему «Системный подход к исследованию СО₂-газообмена и терморезистентности растений», а в 1995 г. Обществом физиологов растений России за «Цикл работ по оценке экологиче-

ской характеристики и биологического разнообразия на основе параметров CO_2 -газообмена интактных растений» в области прикладной физиологии растений В. К. Курцу с соавторами была присуждена премия И. И. Гунара.

В. К. Курец активно участвовал в формировании нового для ИБ КарНЦ РАН направления, связанного с изучением вклада болотных экосистем в глобальный баланс углерода. В ходе полевых исследований, проводившихся под руководством Владимира Константиновича, было определено влияние лесохозяйственного осушения на потери углерода болотными биогеоценозами и их трансформацию из накопителей в источники атмосферного углерода, выполнена оценка вклада напочвенного покрова, в первую очередь сфагновых мхов, в потоки углерода в экосистемах. Совместно с финскими коллегами из Университета Йоенсуу были созданы математические модели, позволяющие рассчитать годовой и суточный баланс углерода различных по микрорельефу участков болота в зависимости от климатических условий. Разноплановость научных интересов В. К. Курца была предопределена его широкой эрудицией, любознательностью и активностью целеустремленного исследователя.

В. К. Курец является автором более 230 научных работ, 5 монографий и нескольких десятков авторских свидетельств на изобретения. За более чем полувековое служение науке Владимиру Константиновичу удалось не только создать новое научное направление, связанное с использованием методов системного подхода для изучения реакций растений на факторы внешней среды, но и воспитать целую плеяду учеников, достойно продолжающих его дело.

В настоящее время Владимир Константинович находится на заслуженном отдыхе. Он попрежнему имеет четкую жизненную позицию, активно трудится на дачном участке и продолжает оставаться яркой личностью.

Мы желаем юбиляру доброго здоровья, бодрости и счастья.

М. И. Сысоева, Е. Н. Икконен

СПИСОК ОСНОВНЫХ НАУЧНЫХ ТРУДОВ В. К. КУРЦА

1959. Усовершенствование метода получения различных температур почвы для опытов с растениями // Изв. Карельского и Кольского филиалов АН СССР. № 4. (Совместно с А. И. Коровиным.)

1960. Влияние заморозков на урожай и некоторые физиологические процессы у яровой

пшеницы // Докл. АН СССР. Т. 136, № 4. (Совместно с А. И. Коровиным, С. Н. Дроздовым, Ю. Е. Новицкой, А. А. Комулайнен.)

1966. Переоборудование торговой холодильной камеры HKP-1 в камеру искусственных заморозков // Агрохимия. № 5. (Совместно с А. И. Коровиным, А. Т. Петровым, Г. А. Зельбергом, И. А. Буренковым, А. Г. Немировским.)

1967. Термоплощадка для опытов с растениями // Агрохимия. № 3. (Совместно с А. И. Коровиным.)

1968. О последствии заморозков на конечную продуктивность сельскохозяйственных растений // Метеорология и гидрология. № 9. (Совместно с А. И. Коровиным, С. Р. Поповым, А. К. Винтер.)

1969. Установки искусственного климата для опытов с растениями. М.: Наука. 104 с.

1971. В Иркутске пущен фитотрон // Природа. № 1. (Совместно с Ф. Э. Реймерс.)

1974. Иркутский фитотрон. Опыт проектирования и наладки. Новосибирск: Наука. 96 с.

1977. Эколого-физиологические аспекты устойчивости растений к заморозкам. Л.: Нау-ка. 228 с. (Совместно с С. Н. Дроздовым, З. Ф. Сычевой, Н. П. Будыкиной.)

1979. Моделирование продуктивности и холодоустойчивости растений. Л.: Наука. 160 с. (Совместно с Э. Г. Поповым.)

Многофакторный метод моделирования продуктивности растений // Физиология и биохимия культ. растений. Т. 2, № 2. (Совместно с С. Н. Дроздовым, Э. Г. Поповым.)

1981. Способ выращивания овощных культур / Авторское свидетельство № 865211. (Совместно с С. Н. Дроздовым, Р. И. Волковой, Н. П. Будыкиной, И. И. Барановой, Э. Г. Поповым.)

1982. Влияние суточного термопериода на CO_2 -газообмен растений огурца // Докл. ВАСХНИЛ. № 6. (Совместно с С. Н. Дроздовым, Э. Г. Поповым, Е. Ф. Марковской.)

Способ определения низких и высоких температурных границ зон закаливания растений / Авторское свидетельство № 934999. (Совместно с Э. Г. Поповым.)

1984. Определение условий среды, обеспечивающих оптимум видимого фотосинтеза растений // Докл. ВАСХНИЛ. № 3. (Совместно с Э. Г. Поповым, С. Н. Дроздовым.)

Определение оптимального температурного режима CO_2 -газообмена растений огурца с использованием многофакторного метода // С.-х. биология. № 7. С. 47–51. (Совместно с Е. Ф. Марковской, Э. Г. Поповым, А. В. Талановым.)

Терморезистентность активно вегетирующих растений. Л.: Наука. 168 с. (Совместно с С. Н. Дроздовым, А. Ф. Титовым.)

1985. Определение условий среды, обеспечивающих оптимум суточного баланса CO_2 -газообмена у хлопчатника // Узбек. биол. журнал. № 5. С. 18–20. (Совместно с С. Н. Дроздовым, Т. В. Акимовой, Х. У. Умаровым, Э. Г. Поповым.)

Исследование гетерогенности растительного материала при помощи метода главных компонентов // С.-х. биология. № 7. (Совместно с Е. Ф. Марковской, В. Н. Хариным, М. И. Сысоевой.)

1986. Зависимость CO_2 -газообмена огурца от факторов среды на ранних этапах онтогенеза // Физиология и биохимия культ. растений. Т. 18, № 2. С. 186–192. (Совместно с Е. Ф. Марковской.)

Температурные и световые условия среды, обеспечивающие оптимум видимого фотосинтеза растений томата // Докл. ВАСХНИЛ. № 3. С. 26–27. (Совместно с Т. В. Акимовой, С. Н. Дроздовым, Э. Г. Поповым.)

1987. Состав для регулирования роста растений томата в закрытом грунте. Авторское свидетельство № 1332575. (Совместно с Р. И. Волковой, С. Н. Дроздовым, Т. С. Николаевской, Н. П. Будыкиной, Н. М. Дятловой.)

Применение комплексонатов в тепличном овощеводстве Севера // Химия в сельском хозяйстве. № 1. (Совместно с Р. И. Волковой, Н. П. Будыкиной, Н. А. Селиверстовой, Г. Я. Рудаковой.)

1988. Температурные характеристики экстенсивного и интенсивного сортов пшеницы // Докл. ВАСХНИЛ. № 6. С. 2–3. (Совместно с Э. Г. Поповым, А. В. Талановым, Т. В. Акимовой, С. Н. Дроздовым.)

Использование многофакторного моделирования для оценки экологической характеристики сорта // Селекция и семеноводство. № 3. (Совместно с Е. Ф. Марковской, Э. Г. Поповым, А. В. Талановым, В. А. Безденежных.)

1989. Влияние температуры и фотопериода на составляющие CO_2 -газообмена и накопление биомассы растением огурца // Физиология растений. Т. 36, № 1. С. 49–56. (Совместно с А. В. Талановым, Э. Г. Поповым.)

Соотношения составляющих CO_2 -газообмена и прироста биомассы растения огурца в зависимости от термо- и фотопериода // Физиология и биохимия культ. растений. Т. 21. С. 366–372. (Совместно с А. В. Талановым, Э. Г. Поповым.)

1991. Статистическое моделирование системы связей растение – среда. Л.: Наука. 152 с. (Совместно с Э. Г. Поповым.)

1993. Светотемпературные зависимости видимого фотосинтеза и темновое дыхание некоторых видов сфагновых мхов // Физиология расте-

ний. Т. 40, № 5. С. 704–708. (Совместно с А. В. Талановым, Э. Г. Поповым, С. Н. Дроздовым.)

1994. Светотемпературные характеристики CO_2 -газообмена сеянцев сосны и ели // Физиология растений. Т. 41, № 4. С. 533–538. (Совместно с Э. Г. Поповым, А. В. Талановым, С. Н. Дроздовым.)

Последействие закаливающих температур на нетто-фотосинтез интактных растений // Физиология растений. Т. 41, \mathbb{N}^2 4. С. 504–508. (Совместно с С. Н. Дроздовым, Э. Г. Поповым.)

1995. Влияние света и температуры на нетто-фотосинтез и дыхание *Betula pendula* var. pendula и *B. pendula* var. carelica (Betulaceae) // Ботан. журн. Т. 80, № 3. С. 60–64. (Совместно с С. Н. Дроздовым, Э. Г. Поповым, А. В. Талановым, Л. А. Обшатко, Л. В. Ветчинниковой.)

Эффективность обработки томатов хлорхолинхлоридом в зависимости от условий внешней среды // Агрохимия. № 10. С. 97–104. (Совместно с Н. П. Будыкиной, С. Н. Дроздовым.)

Требования к теплу и свету рассады капусты белокочанной // Докл. РАСХН. № 1. (Совместно с Л. А. Обшатко, Э. Г. Поповым, А. В. Талановым, С. Н. Дроздовым.)

1997. Действие циклического изменения температуры воздуха на CO_2 -газообмен рассады капусты белокочанной // Докл. РАСХН. № 6. С. 6–8. (Совместно с С. Н. Дроздовым, Л. А. Обшатко, А. В. Талановым.)

Светотемпературные характеристики галеги восточной (*Galega orientalis* Lam.) // Физиология и биохимия культ. растений. Т. 29, № 2. С. 115–120. (Совместно с С. Н. Дроздовым, Э. Г. Поповым, А. В. Талановым, Л. А. Обшатко, Е. С. Холопцевой.)

Комплексное использование фиторегуляторов на томате в весенне-летнем обороте // Агрохимия. № 8. С. 52–55. (Совместно с Н. П. Будыкиной, С. Н. Дроздовым, Л. Д. Прусаковой.)

1998. Влияние светотемпературного режима и уровня грунтовых вод на CO₂-газообмен открытого участка олиготрофного болота // Экология. № 1. С. 14–18. (Совместно с Е. Н. Икконен, Ю. Алм, А. В. Талановым, С. Н. Дроздовым, Е. Силвола, Э. Г. Поповым.)

Особенности реакции растений огурца на действие хлорхолинхлорида при разных световых и температурных условиях среды // Агрохимия. № 8. С. 44–48. (Совместно с Н. П. Будыкиной, С. Н. Дроздовым, Л. Д. Прусаковой, Л. В. Тимейко.)

Effect of Light and Temperature on Net Primary Productivity of Fodder Galega (*Galega orientalis* Lam.). // Acta Agric Scand. B. Soil and Plant. Sci. Vol. 48. P. 34–40. (Совместно с Т. Aniszewski,

S. Drozdov, E. Kholoptseva, L. Obshatko, E. Popov, A. Talanov.)

Оптимизация температурного режима выращивания томата на основе модели взаимосвязи нетто-фотосинтеза с условиями среды // Докл. РАСХН. № 3. С. 5–6. (Совместно с С. Н. Дроздовым, Э. Г. Поповым, А. В. Талановым.)

1999. Взаимосвязь нетто-фотосинтеза и ночного дыхания интактных растений огурца с условиями термопериода // Физиология растений. Т. 48, № 2. С. 198–202. (Совместно с С. Н. Дроздовым, Э. Г. Поповым.)

Последействие ночных температур на нетто-фотосинтез интактных растений огурца // Докл. РАН. Т. 368, N^2 3. С. 423–425. (Совместно с С. Н. Дроздовым.)

Изменение нетто-фотосинтеза интактных растений огурца под влиянием температуры почвы // Докл. РАСХН. № 5. С. 9–10. (Совместно с С. Н. Дроздовым, Э. Г. Поповым.)

Внутривидовое разнообразие реакции нетто-фотосинтеза растений огурца на повышенное содержание углекислоты в воздухе // Физиология растений. Т. 48, № 2. С. 194–197. (Совместно с С. Н. Дроздовым, Э. Г. Поповым.)

2000. Светотемпературные характеристики CO_2 -газообмена некоторых видов рода Sphagnum (Sphagnaceae, Musci) // Ботан. журн. Т. 85, № 5. С. 113–118. (Совместно с С. Н. Дроздовым, А. В. Талановым, Э. Г. Поповым.)

Сравнение реакций древесного и травянистого растений на действие суб- и супероптимальных температур // Физиология растений. Т. 47, № 4. С. 507–510. (Совместно с Э. Г. Поповым, С. Н. Дроздовым.)

2001. Интенсивность углекислотного потока в атмосферу из мезоолиготрофного болота южной Карелии // Экология. № 6. С. 416–419. (Совместно с Е. Н. Икконен, С. И. Грабовик, С. Н. Дроздовым.)

Светотемпературные характеристики СО₂-газообмена сортов клевера красного // Докл. РАСХН. № 3. С. 14–16. (Совместно с С. Н. Дроздовым, Э. Г. Поповым, Е. С. Холопцевой.)

Effects of Light and Temperature Parameters on Net Photosynthetic Carbon Dioxide Fixation by Whole Plants of Five Lupin Species // Acta Agric. Scand., Sect. B, Soil and Plant Sci. 51. P. 17–27. (Совместно с Т. Aniszewski, S. N. Drozdov, E. S. Kholoptseva, L. A. Obshatko, E. G. Popov, A. V. Talanov.)

Светотемпературные характеристики CO_2 -газообмена сортов клевера красного // Докл. РАСХН. № 3. С. 14–16. (Совместно с С. Н. Дроздовым, Э. Г. Поповым, Е. С. Холопцевой.)

2002. Температурные характеристики нетто-фотосинтеза *Oxyria digyna* (Polygonaceae)

// Ботан. журн. Т. 87, № 5. С. 110–114. (Совместно с Э. Г. Поповым, С. Н. Дроздовым, М. И. Сысоевой.)

Свето-температурная характеристика астрагала нутового // Докл. РАСХН. № 4. С. 20–22. (Совместно с С. Н. Дроздовым, Е. С. Холопцевой, Э. Г. Поповым.)

2003. Некоторые аспекты экологической физиологии растений. Петрозаводск: ПетрГУ. 170 с. (Совместно с С. Н. Дроздовым.)

Влияние температуры на суточную динамику CO_2 -газообмена интактного растения огурца // Физиология растений. Т. 50, № 6. С. 200–204. (Совместно с Э. Г. Поповым, А. В. Талановым, С. Н. Дроздовым.)

Действие и последействие температуры на дыхание интактных растений // Физиология растений. Т. 50, № 3. С. 349–353. (Совместно с С. Н. Дроздовым, Э. Г. Поповым, Е. Д. Дембо, Н. И. Хилковым, С. А. Трофимовой.)

Взаимосвязь между светотемпературным оптимумом нетто-фотосинтеза, темнового дыхания интактного растения-эдификатора и условиями среды на примере овсяницы луговой // Докл. РАСХН. № 4. С. 9–11. (Совместно с С. Н. Дроздовым, Э. Г. Поповым, А. В. Талановым, Л. А. Обшатко.)

2004. Перспективы применения системного подхода в экологических исследованиях // Физиология растений. Т. 51, № 4. С. 617–620. (Совместно с С. Н. Дроздовым.)

2005. Влияние температуры и фотопериода на эффективность преобразования ассимилированного CO_2 в биомассу *Cucumis sativus* // Физиология растений. Т. 52, N^2 2. С. 203–208. (Совместно с А. В. Талановым, Э. Г. Поповым, С. Н. Дроздовым.)

О зональном влиянии температуры на нетто-фотосинтез растений // Докл. АН. Т. 405, N° 6. С. 847–849. (Совместно с Э. Г. Поповым, С. Н. Дроздовым.)

2006. Межсортовые различия экофизиологической характеристики гороха посевного // Докл. РАСХН. № 1. С. 9–11. (Совместно с С. Н. Дроздовым, Е. С. Холопцевой, А. В. Талановым, Э. Г. Поповым, А. В. Амелиным.)

Светотемпературная характеристика неттофотосинтеза ряда сортов картофеля // С.-х. биология. № 5. С. 17–21. (Совместно с С. Н. Дроздовым, З. П. Котовой, А. В. Талановым, Э. Г. Поповым.)

2007. О влиянии лесохозяйственного осушения на выделение CO_2 торфом и сфагново-травянистым покровом мезоолиготрофного болота // Лесное хозяйство. № 4. С. 27. (Совместно с Е. Н. Икконен, А. В. Талановым.)

ВИКТОР АЛЕКСАНДРОВИЧ ИЛЮХА (к 50-летию со дня рождения)



Илюха Виктор Александрович – заведующий лабораторией экологической физиологии животных, доктор биологических наук, доцент по 03.00.13 - физиология, родился 2 января 1962 г. в с. Дмитровка Золотоношского района Черкасской области Республики Украина. В 1979 г. там же окончил с отличием среднюю школу и поступил на биологический факультет Черкасского государственного педагогического института им. 300-летия воссоединения Украины с Россией. Со второго курса Виктор Александрович начал заниматься научно-исследовательской работой - изучением влияния маммилярных тел на условнорефлекторную деятельность и функциональное состояние слуховой и моторной области коры больших полушарий у собак. На формирование будущего ученого в студенческие годы оказал влияние руководитель дипломной работы А. С. Погребной, прививший особый интерес к статистическим методам исследований. В этот период были подготовлены и первые научные публикации. В течение 4 лет обучения в институте Виктор Александрович был Ленинским стипендиатом. После окончания института с отличием в 1984 г. работал в средней школе учителем химии.

С 1985 по 1989 г. В. А. Илюха обучался в очной аспирантуре Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР. На формирование взглядов и научного стиля Виктора Александровича оказало влияние общение с учеником академика Л. А. Орбе-

ли чл.-корр. АН А. И. Карамяном. Перерыв в обучении в аспирантуре был связан со службой в рядах Советской Армии. В 1990 г. Виктор Александрович защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Особенности физиологии и патологии условнорефлекторной деятельности обезьян и роль β-эндорфина в ее регуляции» по специальности «физиология человека и животных».

Дальнейшая творческая жизнь Виктора Александровича связана с Институтом биологии Карельского научного центра РАН. С июня 1989 г. – младший научный, научный, старший научный и ведущий научный сотрудник лаборатории экологической физиологии животных, а с ноября 2008 г. - заведующий лабораторией экологической физиологии животных КарНЦ РАН. Научные интересы охватывают широкий круг проблем: изучение физиологии высшей нервной деятельности (поведения), физиологии и патологии стресса и стресслимитирующих систем, исследование физиологических и биохимических механизмов адаптаций млекопитающих, выявление роли и механизмов участия антиоксидантных ферментов в адаптивных реакциях. В 2004 г. им защищена диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук «Антиоксидантные ферменты в физиологических адаптациях млекопитающих (сравнительно-видовой, онтогенетический и прикладной аспекты)» по специальности «физиология». В. А. Илюха является соавтором 3 учебных пособий и более 200 научных работ. Он активно сотрудничает с российскими (Новосибирск, Киров, Москва) и зарубежными (Польша, Финляндия, Дания, Китай) коллегами.

Уже 10 лет Виктор Александрович, и с 2005 г. в должности профессора кафедры молекулярной биологии, биологической и органической химии ФГБОУ ВПО Петрозаводского государственного университета (ПетрГУ), активно занимается педагогической работой – руководит подготовкой курсовых и дипломных работ студентов, привлекая их к научной работе

с использованием современных методов исследования и приборной базы. В. А. Илюха осуществляет подготовку кадров высшей квалификации. Под его руководством подготовлены и защищены две кандидатские диссертации по специальности «физиология». Он член специализированного диссертационного совета ДМ 212.087.02 при Карельской государственной педагогической академии, член Ученого совета ИБ КарНЦ РАН и Совета эколого-биологического факультета ПетрГУ, член редколлегии научного журнала «Труды КарНЦ РАН» (серия «Экспериментальная биология»).

Искренне поздравляем Виктора Александровича с юбилеем и желаем здоровья, творческих достижений и удач, талантливых учеников и последователей!

О. Н. Лебедева

СПИСОК ОСНОВНЫХ НАУЧНЫХ ТРУДОВ В. А. ИЛЮХИ

1987. Особенности формирования условных оборонительных рефлексов у обезьян в приматологическом кресле // Журн. высш. нервн. деят. Т. 37, № 4. С. 681–687. (Совместно с А. И. Карамяном, Т. Н. Соллертинской.)

Невротические реакции и процессы внутреннего торможения у обезьян в условиях введения коньюгата β-эндорфина с бычьим сывороточным альбумином // Докл. АН СССР. Т. 295, № 6. С. 1505–1509. (Совместно с А. И. Карамяном, Т. Н. Соллертинской, К. В. Судаковым, И. П. Ашмариным, А. В. Котовым, Е. И. Ивановым, Ю. А. Панковым, И. Л. Кофман, М. Е. Вартаняном, Г. Ш. Бурбаевой.)

1988. Сравнительная патология высшей нервной деятельности // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. Т. 24, № 3. С. 284–293. (Совместно с А. И. Карамяном, Т. Н. Соллертинской, М. К. Рыжаковым, В. А. Сикетином.)

1993. The connection between biochemical and cytochemical mink blood indices with litter size // Scientifur. Vol. 17, N 1. P. 13–16. (Совместно с L. B. Uzenbaeva, H. I. Meldo.)

Influence of papermill line activated sludge onthe activity of blood enzymes and quality of skins of farm mink // Scientifur. Vol. 17, N 4. P. 307–311. (Совместно с L. K. Kozhevnikova, N. N. Tyutyunnik, H. I. Meldo.)

1995. Ферменты антиоксидантной системы в раннем онтогенезе у норок // Онтогенез. Т. 26, № 2. С. 115–118.

1996. The changes of some blood indices of fur animals in lactation period // Scientifur.

Vol. 20, N 3. P. 48–53. (Совместно с L. K. Kozhevnikova, N. N. Tyutyunnik, A. R. Unzhakov, L. B. Uzenbaeva.)

Устойчивость норок к алеуской болезни в зависимости от величины помета при клеточном разведении // С.-х. биология. № 4. С. 110–113. (Совместно с Л. Б. Узенбаевой, Х. И. Мелдо.)

Aleutian disease of mink the population analysis of problem // Animal Prod. Review, Applied Science Reports. Vol. 28. P. 193–197. (Совместно с L. B. Uzenbaeva.)

1997. Биохимический мониторинг состояния норок в период лактации // Ветеринария. № 2. С. 48–51. (Совместно с Н. Н. Тютюнником, Л. Б. Узенбаевой, Л. К. Кожевниковой, Х. И. Мелдо.)

Specificity of metabolic characteristics of farmbred white mink // Scientifur. Vol. 21, N 4. P. 265–269. (Совместно с L. K. Kozhevnikova, N. N. Tyutyunnik, A. R. Unzhakov, H. I. Meldo.)

Reproductive success of farmed blue foxes // J. Anim. Breed. Genet. Vol. 114, N 1. P. 465–474. (Совместно с М. Harri, T. Rekila.)

1998. Activity of antioxidant enzyme and the LDH isoenzyme spectrum in organs of mink with Aleutian disease // Scientifur. Vol. 22, N 4. P. 309–314. (Совместно с L. K. Kozhevnikova, N. N. Tyutyunnik, A. R. Unzhakov, H. I. Meldo.)

Мидийный гидролизат при алеутской болезни норок // Ветеринария. № 12. С. 21–23. (Совместно с Л. Б. Узенбаевой, Н. Н. Тютюнником, Х. И. Мелдо, Ю. А. Бойковым.)

1999. Эффект гидролизата из мидий при алеутской болезни норок // Вопросы вирусологии. № 1. С. 32–35. (Совместно с Л. Б. Узенбаевой, Н. Н. Тютюнником, Х. И. Мелдо, А. Р. Унжаковым.)

Morphobiochemical blood indices in mink with chewed fur // Scientifur. Vol. 23, N 4. P. 261–265. (Совместно с L. B. Uzenbayeva.)

2001. Морфобиохимические показатели и метаболизм лейкоцитов крови у норок-стригунов // С.-х. биология. № 4. С. 78–82. (Совместно с Л. Б. Узенбаевой.)

Супероксиддисмутаза и каталаза в органах млекопитающих различного экогенеза // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. Т. 37, N^2 3. С. 183–186.

2002. Changes in the leucocyte alkaline phosphatase during the breeding period in mink // Scientifur. Vol. 25, N 3. P. 79–82. (Совместно с L. B. Uzenbayeva.)

Янтарная кислота как стимулятор // Кролиководство и звероводство. № 4. С. 7–8. (Совместно с Н. Н. Тютюнником, Л. К. Кожевниковой, М. Н. Кондрашовой, Л. А. Бадовской,

Х. И. Мелдо, Л. Б. Узенбаевой, А. Р. Унжаковым.)

2003. Superoxide dismutase and catalase in organs of three Canidae species // Scientifur. Vol. 26, N 4. P. 101–105.

2004. Влияние голодания на активность антиоксидантных ферментов у песцов // С.-х. биология. № 4. С. 47–51. (Совместно с Л. Б. Узенбаевой, Б. М. Дамгаард.)

2005. Влияние световых режимов, гормонов эпифиза и возраста на антиоксидантную систему крыс // Медицинский академический журнал. Т. 5, № 3, прил. Т. С. 29–31. (Совместно с И. А. Виноградовой, А. С. Федоровой, А. Н. Вельб.)

Возрастные особенности лейкоцитарной формулы и морфометрических параметров лимфоцитов крови крыс при различных световых режимах // Медицинский академический журнал. Т. 5, \mathbb{N}^{2} 3, прил. 7. С. 36–38. (Совместно с Л. Б. Узенбаевой, И. А. Виноградовой, А. Г. Голубевой, С. А. Коросовым, А. В. Чуровым.)

Влияние световых режимов и гормонов эпифиза на изоферментные спектры лактатдегидрогеназы гомогенатов органов 18-месячных крыс // Медицинский академический журнал. Т. 5, № 3, прил. 7. С. 38–40. (Совместно с А. Р. Унжаковым, Е. А. Хижкиным, И. А. Виноградовой.)

2006. Биомембранология: Учебное пособие. Петрозаводск: Карельский НЦ РАН. 226 с. (Совместно с А. А. Болдыревым, Е. И. Кяйвяряйнен.)

Влияние мелатонина и эпиталона на антиоксидантную систему крыс зависит от светового режима // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. \mathbb{N}^2 2. С. 22–26. (Совместно с Т. Н. Ильиной, Л. Б. Узенбаевой, И. А. Виноградовой, А. С. Федоровой.)

Возрастные изменения лейкоцитарной формулы и морфометрических параметров больших гранулярных лимфоцитов крови крыс при различных режимах освещения // Успехи геронтологии. Вып. 19. С. 79–84. (Совместно с Л. Б. Узенбаевой, И. А. Виноградовой, А. Г. Голубевой, А. В. Чуровым.)

2007. Возрастные изменения физической работоспособности и некоторых биохимических показателей мышц крыс под влиянием световых режимов и гормонов эпифиза // Успехи геронтологии. Т. 20, № 1. С. 66–73. (Совместно с И. А. Виноградовой, В. Д. Юнаш, А. С. Федоровой, Е. А. Хижкиным, А. Р. Унжаковым.)

Специфичность изоферментных спектров ЛДГ у норок белая-хедлюнд // Информационный вестник ВОГиС. Т. 11, \mathbb{N}^2 1. С. 139–144.

(Совместно с А. Р. Унжаковым, Л. К. Кожевниковой, Х. И. Мелдо, Н. Н. Тютюнником.)

Влияние генотипа на сезонные изменения антиоксидантной системы и изоферментного спектра лактатдегидрогеназы американских норок (*Mustela vison* Schreber 1977) // Информационный вестник ВОГиС. Т. 11, № 1. С. 145–154. (Совместно с Т. Н. Ильиной, С. Н. Калининой, Н. А. Горляковой, Л. А. Беличевой.)

Особенности структуры лейкоцитов крови норок (*Mustela vison* Schreber 1977) различных генотипов // Информационный вестник ВОГиС. Т. 11, № 1. С. 155–161. (Совместно с Л. Б. Узенбаевой, А. Г. Голубевой, Н. Н. Тютюнником.)

Morphometric and cytochemical investigation of subcellular structure on sapphire mink leucocytes // Scientifur. Vol. 31, N 2. P. 49–54. (Совместно с L. B. Uzenbaeva, A. G. Golubeva, N. N. Tyutyunnik, M. G. Nyuppiyeva.)

Морфо-функциональные особенности лейкоцитов млекопитающих, разводимых в неволе в условиях Европейского Севера // Труды Карельского НЦ РАН. Вып. 11: Экология. Экспериментальная генетика и физиология. С. 109– 117. (Совместно с Л. Б. Узенбаевой, А. Г. Голубевой, Н. Н. Тютюнником, С. А. Коросовым.)

Роль изоферментов лактатдегидрогеназы в адаптациях млекопитающих Карелии // Труды Карельского НЦ РАН. Вып. 11: Экология. Экспериментальная генетика и физиология. С. 118–125. (Совместно с А. Р. Унжаковым, Н. В. Мацук, В. В. Белкиным.)

2008. Влияние мелатонина и эпиталона на состав лейкоцитарной формулы и активность щелочной фосфатазы лейкоцитов крови крыс при различных режимах освещения в онтогенезе // Успехи геронтол. Т. 21, № 3. С. 394–401. (Совместно с Л. Б. Узенбаевой, И. А. Виноградовой, А. Г. Голубевой, М. Г. Нюппиевой.)

Влияние геропротекторов на возрастные изменения антиоксидантной системы печени крыс при различных световых режимах // Успехи геронтологии. Т. 21, № 3. С. 386–393. (Совместно с Т. Н. Ильиной, И. А. Виноградовой, Е. А. Хижкиным, В. Н. Анисимовым, В. Х. Хавинсоном.)

Особенности влияния мелакрила на антиоксидантную систему норок трех окрасов // Кролиководство и звероводство. № 6. С. 11–13. (Совместно с С. Н. Калининой, М. В. Фартышевой, Л. Г. Подлепиной.)

Биомембранология: Учебное пособие. Красноярск: Изд-во СФУ. 187 с. (Совместно с А. А. Болдыревым, Е. И. Кяйвяряйнен.)

2009. Влияние мутаций генов окраски меха на цитохимические особенности лейкоцитов

крови у американской норки (*Mustela vison* Schreber 1777) // Информационный вестник ВОГиС. Т. 13, № 3. С. 571–577. (Совместно с Л. Б. Узенбаевой, А. Г. Голубевой, Н. Н. Тютюнником.)

Некоторые физиологические, биохимические и этологические особенности американской норки (*Mustela vison* Schreber 1977), сформировавшиеся в процессе ее естественной ферализации в биоценозе Карелии // Информационный вестник ВОГиС. Т. 13, № 3. С. 588–597. (Совместно с Т. Н. Ильиной, П. И. Даниловым.)

Особенности влияния селенита натрия на антиоксидантную систему хищных млекопитающих // С.-х. биология. № 6. С. 66–72. (Совместно с С. Н. Калининой, Т. Н. Ильиной, М. В. Фартышевой, Л. Г. Подлепиной.)

Effect of dietary sodium selenite on the antioxidant system in silver (*Vulpes vulpes* L.) and blue foxes (*Alopex lagopus* L.) // Scientifur. Vol. 33, N 2. P. 35–38. (Совместно с S. N. Kalinina.)

2010. Circadian disruption induced by light-at-night accelerates aging and promotes tumorogenesis in young but not in old rats // Aging. Vol. 2, N 2. P. 82–92. (Совместно с І. А. Vinogradova, V. N. Anisimov, A. V. Bukalev, E. A. Khizhkin, T. A. Lotosh, A. V. Semenchenko, M. A. Zabezhinski.)

Нейрохимия. М.: Дрофа. 398, [2] с. (Совместно с А. А. Болдыревым, Н. Д. Ещенко, Е. И. Кяйвяряйнен.)

Особенности реагирования антиоксидантных ферментов в органах крыс на нарушение циркадианных ритмов на разных этапах онтогенеза // Учен. зап. Петрозаводского гос. ун-та. № 4. С. 22–26. (Совместно с Е. А. Хижкиным, Т. А. Лотош, И. А. Виноградовой, В. Н. Анисимовым.)

Влияние постоянного освещения на антиоксидантную систему крыс зависит от возраста // Труды Карельского НЦ РАН. № 2. С. 62–67. (Совместно с Е. А. Хижкиным, Т. А. Лотош, И. А. Виноградовой, В. Н. Анисимовым.)

Мутантные норки как модель в биомедицинских исследованиях // Труды Карельского научного центра РАН. № 2. С. 52–61. (Совместно с Л. Б. Узенбаевой, А. Г. Кижиной, Н. Н. Тютюнником.)

Effect of dietary ascorbic acid supplementation on tissue vitamin A and vitamin E levels and antioxidant enzyme activity in standard and sapphire mink (*Neovison vison*) // Scientifur. Vol. 34, N 2. P. 19–23. (Совместно с Т. N. Ilyina, I. V. Baishnikova, S. N. Sergina.)

Дефект лейкоцитов у разводимых в неволе пушных зверей // Кролиководство и звероводство. № 4. С. 25–27. (Совместно с А. Г. Кижиной, Л. Б. Узенбаевой, Н. Н. Тютюнником.)

Оценка физиологического статуса млекопитающих как составляющая экологического мониторинга на Европейском Севере России // Вестник охотоведения. Т. 7, № 2. С. 354—357. (Совместно с Л. Б. Узенбаевой, Т. Н. Ильиной, С. А. Коросовым, А. Р. Унжаковым, П. И. Даниловым, В. В. Белкиным, А. Е. Якимовой.)

Изоферменты лактатдегидрогеназы в адаптациях охотничьих животных Карелии // Вестник охотоведения. Т. 7, № 2. С. 358–360. (Совместно с А. Р. Унжаковым, В. В. Белкиным, Н. В. Никитиной.)

Адаптационные изменения метаболизма у животных различного экогенеза // Проблемы биологии продуктивных животных. № 4. С. 5–22. (Совместно с Н. Н. Тютюнником, Т. Н. Ильиной, Л. Б. Узенбаевой, А. Р. Унжаковым, Н. Л. Рендаковым, И. В. Баишниковой, А. Г. Кижиной, Е. Б. Свечкиной, С. Н. Сергиной.)

2011. Влияние мутаций, затрагивающих окраску меха на структуру лейкоцитов крови у американской норки (*Mustela vison* Schreber 1777) // Генетика. Т. 47, № 1. С. 87–94. (Совместно с Л. Б. Узенбаевой, О. В. Трапезовым, А. Г. Кижиной, Л. И. Трапезовой, Н. Н. Тютюнником.)

Влияние высокой дозы аскорбиновой кислоты на антиоксидантную систему и лейкоциты крови при врожденной патологии у норок // Ветеринария. № 8. С. 53–57. (Совместно с Т. Н. Ильиной, Л. Б. Узенбаевой, И. В. Баишниковой, С. Н. Сергиной, А. Г. Кижиной.)

Влияние витамина Е на антиоксидантную систему песцов и лисиц // Труды Карельского НЦ РАН. № 3. С. 3–11. (Совместно с И. В. Баишниковой, С. Н. Сергиной, Т. Н. Ильиной, Н. Н. Тютюнником.)

Морфологические, цитохимические и генотипические аспекты дефекта лейкоцитов в доместицируемых популяциях пушных зверей // Труды Карельского НЦ РАН. № 3. С. 49–56. (Совместно с А. Г. Кижиной, Л. Б. Узенбаевой, Н. Н. Тютюнником, О. В. Трапезовым, Н. Н. Шумилиной, Е. Е. Лариной.)

Аномальные цитоплазматические гранулы в лейкоцитах крови у норок сапфирового окраса (цитологическое и цитохимическое исследование) // Морфология. 2011. Т. 140, \mathbb{N}^2 6. С. 60–64. (Совместно с Л. Б. Узенбаевой, А. Г. Кижиной, Н. Н. Тютюнником.)

РЕЦЕНЗИИ И БИБЛИОГРАФИЯ

Рецензия на книгу Э. А. Гончаровой «Изучение устойчивости и адаптации культурных растений к абиотическим стрессам на базе мировой коллекции генетических ресурсов: Научное наследие профессора Г. В. Удовенко» (СПб.: ГНУ ВИР, 2011. 336 с.)

Книга доктора биологических наук, профессора Э. А. Гончаровой (под редакцией академика А. А. Жученко) посвящена вопросам адаптации и устойчивости растений к абиотическим стрессам, отраженным в многочисленных трудах выдающегося отечественного физиолога растений доктора биологических наук, профессора, заслуженного деятеля науки Российской Федерации Г. В. Удовенко, его коллег и учеников.

Исследования, возглавляемые Г. В. Удовенко и проводимые на протяжении многих лет на базе коллекции Всероссийского института растениеводства им. Н. И. Вавилова (ВИР), развивались последовательно от решения чисто прикладной задачи поиска путей повышения продуктивности сельскохозяйственных растений в оптимизируемых и экстремальных условиях окружающей среды к формированию наиболее важных теоретических положений адаптивного растениеводства, а затем и к разработке общих принципов устойчивости и ее диагностики, а также приемам повышения устойчивости растений. Эти многоплановые исследования и их результаты внесли весомый вклад, с одной стороны, в формирование теории устойчивости культурных растений, с другой - в решение многих ресурсоведческих, селекционных и интродукционных задач, послуживших развитию отечественного растениеводства.

Необходимо отметить, что работы профессора Г. В. Удовенко по изучению генетики адаптивных возможностей растений в разных средах, по сути, стали основой создания в ВИРе нового научного направления — экологической генетики, которое развивалось (совместно с акад. В. А. Драгавцевым и проф. Э. А. Гончаровой в одноименно созданной в

1991 г. лаборатории) в рамках решения проблемы разработки и осуществления современных стратегий поиска, создания и использования ценных генотипов растений.

Автором книги проф. Э. А. Гончаровой в историческом аспекте представлены публикации Г. В. Удовенко разных лет, отражающие разработку методологии и различные подходы к диагностике и оценке устойчивости различных сельскохозяйственных культур к абиотическим стрессам, на основе которых издано около 40 «Методических указаний ВИР». Лабораторно-полевые методы диагностики базируются на основательном теоретическом фундаменте и разработаны с учетом целого комплекса параметров растений и условий (генотип – среда) проведения их оценки.

Книга состоит из пяти глав и приложения с многочисленными ценными фотографиями. В главе, посвященной роли Н. И. Вавилова в развитии теории устойчивости, автор показывает, какую важную роль сыграли идеи Н. И. Вавилова в определении общей направленности и конкретных задач, которые в разные годы решали физиологи растений ВИРа. Разработки академика Н. А. Максимова и его коллег в период с 1920-х по 1940-е гг., выполненные в развитие идей Н. И. Вавилова, создали отделу физиологии ВИРа авторитет одного из ведущих центров физиологической науки в стране и мире. В послевоенные годы, при возобновлении в ВИРе работ по физиологии устойчивости растений, в основу их опять же легли многие идеи Н. И. Вавилова и Н. А. Максимова. С 1967 по 1999 г. под руководством Г. В. Удовенко в ВИРе был получен ряд результатов как теоретической, так и практической направленности, крайне важных для селекции, интродукции и растениеводства. Полученный в ВИРе при изучении физиологии устойчивости растений к различным экстремальным факторам обширный экспериментальный материал, его обобщение и сопоставление с данными других авторов позволили Г. В. Удовенко выдвинуть общетеоретическую концепцию о сущности

устойчивости и адаптации растений. Эта концепция послужила научной базой для разработки принципов и способов диагностики устойчивости растений, для построения моделей сортов, оптимальных для разных регионов страны, для разработки различных агротехнических приемов в неблагоприятных условиях и для планирования подходов в селекции устойчивых сортов. Под руководством Г. В. Удовенко значительные результаты получены физиологами ВИРа также в области методических разработок и при оценке растительных ресурсов по признакам устойчивости к стрессам, что также стало прямым следствием идей и рекомендаций Н. И. Вавилова о связи задач физиологии растений с задачами изучения растительных ресурсов и вовлечения их в селекцию и интродукцию. К настоящему времени в ВИРе лабораторными методами оценено несколько десятков тысяч сортов разных культур. Подобных работ по выявлению источников устойчивости для селекции в таких масштабах в нашей стране нигде не проводилось.

Во второй главе, посвященной теоретическим аспектам изучения устойчивости, рассмотрены закономерности изменения разных элементов структуры урожая растений под влиянием экстремальных условий среды и физиологические механизмы адаптации растений к различным экстремальным условиям. Обобщение результатов многочисленных исследований приводит Г. В. Удовенко и его коллег к заключению о том, что адаптация растений к экстремальным условиям среды - это сложный комплекс процессов, координируемых системой саморегуляции организма. Причем чем выше уровень биологической организации, тем большее число механизмов одновременно участвует в адаптации растений к стрессам. Общий же характер процесса этой адаптации неспецифичен при различных неблагоприятных воздействиях.

Отдельный раздел во второй главе посвящен наиболее важным публикациям Г. В. Удовенко с коллегами по физиологическим аспектам солеустойчивости культурных растений. В них обсуждаются причины различий в солеустойчивости разных сортов и видов культурных растений. Изучая влияние обеспеченности растений влагой на их солеустойчивость, Г. В. Удовенко делает вывод о существенном влиянии обеспеченности растений влагой на степень их солеустойчивости. В серии работ по изучению воздействия солевого стресса на фотосинтетическую деятельность и перераспределение ассимилятов при формировании зерна показано, что урожай зерна при засоле-

нии снижается значительнее, чем продуктивность общей биомассы надземных органов растений.

В разделе главы, касающемся минерального питания, представлены работы Г. В. Удовенко с сотрудниками о влиянии температурного и водного режимов на реакцию растений на изменение уровня минерального питания. Выявленные зависимости, по мнению Г. В. Удовенко, представляют большое теоретическое и прикладное значение для повышения эффективности использования удобрений, для дальнейшего раскрытия механизмов минерального питания растений, а также для связанных с ними областей агрохимии, генетики, селекции и ресурсоведения.

В разделе «О генетике устойчивости» автор кратко обобщает вопросы, касающиеся связи селекции с физиологическими и генетическими исследованиями устойчивости растений к экстремальным условиям. В нем изложены предпосылки создания нового подхода, условназванного «селекционно-генетический HO анализ исходного материала». При рассмотрении некоторых генетико-физиологических аспектов селекции сортов, устойчивых к экстремальным условиям среды, подчеркивается полигенный характер генетической детерминации этих признаков и сложность диагностики признака «устойчивость». Г. В. Удовенко с соавторами описали разработанный ими принцип изучения наследуемости реакции растений на условия среды, что необходимо для успешного ведения селекционной работы.

В главе «Научно-практические аспекты изучения» приводятся работы, в которых автор излагает сущность основных принципов и приемов диагностики устойчивости растений к экстремальным условиям среды. Основанием этому послужил большой личный опыт Г. В. Удовенко и Э. А. Гончаровой в разработке способов диагностики устойчивости для различных сельскохозяйственных культур к основным типам стрессовых факторов и многолетнем использовании их при массовой оценке устойчивости сортов разных видов растений из общирного генофонда растительных ресурсов (как в лабораторных экспериментах, так и в полевых на опытных станциях ВИРа).

В главе «К портрету ученого» раскрыты основные этапы биографии Г. В. Удовенко (1929–1999), представлен перечень учеников, защитивших под его руководством в разные годы кандидатские и докторские диссертации, и обширная библиография его научных трудов.

Завершает книгу глава «Воспоминания современников о Г. В. Удовенко», в которой дру-

зья, коллеги и ученики делятся воспоминаниями о Г. В. Удовенко, обсуждают научную значимость результатов его деятельности, заслуги созданной им научной школы. Эти воспоминания не только удачно дополняют книгу, но и позволяют читателю полнее оценить вклад профессора Геннадия Васильевича Удовенко в

отечественную и мировую физиологию растений, а также раскрыть многие черты характера этого талантливого, многогранного человека и выдающегося ученого.

А. Ф. Титов, Т. Г. Шибаева Институт биологии Карельского научного центра РАН

Титов А. Ф., Таланова В. В. Локальное действие высоких и низких температур на растения / Отв. редактор Н. Н. Немова. Петрозаводск: Карельский НЦ РАН, 2011. 166 с. Ил. 49. Библиогр. 444 назв.

В монографии обобщены результаты многолетних исследований феноменологии и механизмов устойчивости растений к локальному действию высоких и низких температур. Представлены данные о закономерностях изменения холодо- и теплоустойчивости листьев и корней под влиянием продолжительного и краткосрочного действия низких и высоких температур на все растение, только на его надземную часть или только на корневую систему. Обсуждаются возможные механизмы повышения устойчивости органов (частей) растений, непосредственно подвергавшихся температурному воздействию, а также пространственно удаленных от места действия стрессора.

Для научных работников, преподавателей, аспирантов и студентов вузов.

А. Ф. Титов, В. В. Таланова

Локальное действие высоких и низких температур на растения

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 A4 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 к у р с и в о м на первой странице, в левом верхнем углу; заглавие статьи на русском языке заглавными буквами полужирным шрифтом; полное название организации — место работы каждого автора в именительном падеже на русском языке к у р с и в о м (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; аннотация 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* 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. С с ы л к и на л и т е р а т у р у в т е к с т е 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 физико-географических объектов и разной фактурой для воды и суши. В углу карты желательна врезка с мелкомасштабной картой, где был бы указан участок, увеличенный в крупном масштабе в виде основной карты.

ПОДПИСИ К РИСУНКАМ должны содержать достаточно полную информацию, для того чтобы приводимые данные могли быть понятны без обращения к тексту (если эта информация уже не дана в другой иллюстрации). Аббревиации расшифровываются в подрисуночных подписях.

ЛАТИНСКИЕ НАЗВАНИЯ. В расширенных латинских названиях таксонов не ставится запятая между фамилией авторов и годом, чтобы была понятна разница между полным названием таксона и ссылкой на публикацию в списке литературы. Названия таксонов рода и вида печатаются курсивом. Вписывать латинские названия в текст от руки недопустимо. Для флористических, фаунистических и таксономических работ при первом упоминании в тексте и таблицах приводится русское название вида (если такое название имеется) и полностью – латинское, с автором и, желательно, с годом, например: водяной ослик (Asellus aquaticus (L. 1758). В дальнейшем можно употреблять только русское название или сокращенное латинское без фамилии автора и года опубликования, например, для брюхоногого моллюска Margarites groenlandicus (Gmelin 1790) – M. groenlandicus или для подвида M. g. umbilicalis.

СОКРАЩЕНИЯ. Разрешаются лишь общепринятые сокращения – названия мер, физических, химических и математических величин и терминов и т. п. Все сокращения должны быть расшифрованы, за исключением небольшого числа общеупотребительных.

^{*} 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. Шерудило¹, М. И. Сысоева¹, Е. Ф. Марковская²

Аннотация на русском языке

Ключевые слова: Cucumis sativus L., кратковременное снижение температуры, устойчивость.

E. G. Sherudilo, M. I. Sysoeva, E. F. Markovskaya. EFFECTS OF DIFFERENT REGIMES OF SEED HARDENING ON COLD RESISTANCE IN CUCUMBER PLANT

Аннотация на английском языке

Key words: Cucumis sativus L., temperature drop, resistance.

ОБРАЗЕЦ ОФОРМЛЕНИЯ ТАБЛИЦЫ

Таблица 2. Частота встречаемости видов нематод в исследованных биотопах

Биотоп	Кол-во	Встречаемость видов нематод в 5 повторностях				
(площадка)	видов	100 %	80 %	60 %	40 %	20 %
1H	26	8	4	1	5	8
2H	13	2	1	1	0	9
3H	34	13	6	3	6	6
4H	28	10	5	2	2	9
5H	37	4	10	4	7	12

Примечание. Здесь и в табл. 3–4: биотоп 1H – территория, заливаемая в сильные приливы; 2H – постоянно заливаемый луг; 3H – редко заливаемый луг; 4H – незаливаемая территория; 5H – 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.

¹ Институт биологии Карельского научного центра РАН

² Петрозаводский государственный университет

Knorre D. G., Laric O. L. Theory and practice in affinity techniques / Eds. P. V. Sundaram, F. L. Eckstein. N. Y., San Francisco: Acad. Press, 1978. P. 169–188.

Ссылки на статьи

Викторов Г. А. Межвидовая конкуренция и сосуществование экологических гомологов у паразитических перепончатокрылых // Журн. общ. биол. 1970. Т. 31, № 2. С. 247–255.

Grove D. J., Loisides L., Nott J. Satiation amount, frequency of feeding and emptying rate in Salmo gairdneri // J. Fish. Biol. 1978. Vol. 12, N 4. P. 507–516.

Ссылки на материалы конференций

Марьинских Д. М. Разработка ландшафтного плана как необходимое условие устойчивого развития города (на примере Тюмени) // Экология ландшафта и планирование землепользования: тез. докл. Всерос. конф. (Иркутск, 11–12 сент. 2000 г.). Новосибирск, 2000. С. 125–128.

Ссылки на авторефераты диссертаций

Шефтель Б. И. Экологические аспекты пространственно-временных межвидовых взаимоотношений землероек Средней Сибири: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1985. 23 с.

Ссылки на диссертации

Шефтель Б. И. Экологические аспекты пространственно-временных межвидовых взаимоотношений землероек Средней Сибири: дис. ... канд. биол. наук. М., 1985. С. 21–46.

Ссылки на патенты

Патент РФ № 2000130511/28, 04.12.2000.

Еськов Д. Н., Серегин А. Г. Оптико-электронный аппарат // Патент России № 2122745. 1998. Бюл. № 33.

Ссылки на архивные материалы

Гребенщиков Я. П. К небольшому курсу по библиографии : материалы и заметки, 26 февр. – 10 марта 1924 г. // ОР РНБ. Ф. 41. Ед. хр. 45. Л. 1–10.

Ссылки на интернет-ресурсы

Паринов С. И., Ляпунов В. М., Пузырев Р. Л. Система Соционет как платформа для разработки научных информационных ресурсов и 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, 1999–2003 [Электронный ресурс]: электронная энциклопедия / Аппарат Гос. Думы Федер. Собрания Рос. Федерации. М., 2004. 1 CDROM.

TABLE OF CONTENTS

REVIEWS	3
G. A. Zhulaj, E. K. Oleinik. CD4 [†] CD25 [†] FOXP3 [†] REGULATORY T-LYMPHOCYTE. PROSPECTIVE APPLICATIONS IN IMMUNOTHERAPY	3
S. A. Murzina, Z. A. Nefyodova, N. N. Nemova. EFFECTS OF FATTY ACIDS (BIOMARKERS OF FOOD SOURCES) ON THE MECHANISMS OF FISH ADAPTATION IN HIGH LATITUDES	18
ORIGINAL PAPERS	
L. V. Anikieva, N. N. Tyutyunnik, V. S. Anikanova. EFFECT OF THE TOXASCARIS INFECTION ON THE COMMERCIAL VALUES OF CAGED POLAR FOXES (<i>ALOPEX LAGOPUS</i>)	26
Yu. V. Batova, A. F. Titov, N. M. Kaznina, G. F. Laidinen. CADMIUM ACCUMULATION AND DISTRIBUTION IN BARLEY PLANTS DEPENDING ON THEIR AGE	32
I. N. Bakhmet, N. N. Fokina, Z. A. Nefyodova, T. R. Ruokolainen, N. N. Nemova. BLUE MUSSELS <i>MYTILUS EDULIS</i> L. IN THE WHITE SEA AS BIOINDICATORS UNDER DILUTED OIL IMPACT	38
N. P. Budykina, T. G. Shibaeva, A. F. Titov. EFFECTS OF EPIN EXTRA, A SYNTHETIC ANALOGUE OF 24-EPIBRASSINOLIDE, ON STRESS RESISTANCE AND PRODUCTIVITY OF CUCUMBER PLANTS	47
L. V. Vetchinnikova, O. S. Serebryakova, M. K. Ilyinova. LIPID FATTY ACID COMPOSITION IN POLLEN OF MAIN REPRESENTATIVES OF BETULA L	56
I. L. Golovanova, A. F. Filippov. CHARACTERISTICS OF INTESTINAL GLYCOSIDASES IN BREAM FROM THE RYBINSKOYE RESERVOIR SITES DIFFERING IN ANTHROPOGENIC LOADING	63
V. K. Golovanov, A. K. Smirnov, D. S. Kapshaj. FINAL THERMOPREFERENDUM AND UPPER LETHAL TEMPERATURE IN JUVENILES OF SOME FRESHWATER FISH SPECIES	70
A. V. Elifanov, S. N. Gashev, T. I. Moiseenko. INFLUENCE OF CRUDE OIL ON THE ORGANISM OF RODENTS IN A SUBACUTE EXPERIMENT	76
A. A. Erkoeva, S. N. Drozdov, E. S. Kholoptseva. EFFECTS OF SOIL ACIDITY ON ECO-PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SCOTS PINE SEEDLINGS OF DIFFERENT PROVENANCE	84
V. V. Lavrova, M. I. Sysoeva, E. M. Matveeva. LIPID FATTY ACIDS IN POTATO LEAVES UNDER PERIODIC AND LONG-TERM HYPOTHERMIA	91
O. N. Lebedeva, A. F. Titov, T. S. Nikolaevskaya. ADAPTATION OF <i>FESTUCA PRATENSIS</i> HUDS. PLANTS WITH SUPPRESSED CHLOROPHYLL DEFICIENCY, AND STABILIZING NATURAL SELECTION	97
V. B. Pridacha, S. V. Pozdnyakova, T. A. Sazonova. EFFECT OF AMBIENT N : P : K RATIOS ON THE MINERAL NUTRIENT COMPOSITION IN <i>BETULA</i> PLANTS	104
N. S. Repkina, V. V. Talanova, L. V. Topchieva, Yu. V. Batova, A. F. Titov. EFFECT OF CADMIUM ON GENE EXPRESSION OF THE TRANSCRIPTION FACTORS CBF1 AND DREB1 IN WHEAT SEEDLING LEAVES	113
K. A. Sazanova, D. I. Bashmakov, A. S. Lukatkin. GENERATION OF SUPEROXIDE ANION IN LEAVES OF SEEDLINGS UNDER LONG-TERM EXPOSURE TO HEAVY METALS	119
A. I. Sidorova, N. M. Kalinkina, I. V. Dydik. REACTION OF THE BAIKALIAN AMPHIPOD <i>GMELINOIDES</i> FASCIATUS STEBBING TO THE IMPACT OF STORMWATER FROM THE CITY OF PETROZAVODSK	125
V. S. Skidchenko, R. U. Vysotskaya, N. N. Nemova. THE RANGE OF ACID DEOXYRIBONUCLEASE ISOFORMS IN THE TISSUES OF MYTILUS EDULIS MUSSELS IN MODEL EXPERIMENTS WITH PETROLEUM HYDROCARBON POISONING	131
O. M. Fedorenko, M. V. Gritskikh, T. S. Nikolaevskaya. POLYMORPHISM BASED ON THE ONSET OF FLOWERING IN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> (L.) HEYNH. AT THE NORTHERN LIMIT OF THE DISTRIBUTION RANGE	139
E. A. Khizhkin, V. A. Ilyukha, V. T. Komov, I. V. Parkalov, T. N. Ilyina, I. V. Baishnikova, S. N. Sergina, V. A. Gremyachikh, T. B. Kamshilova, E. S. Stepina. SPECIES-SPECIFIC FEATURES OF MERCURY CONTENT IN ORGANS OF CARNIVOROUS MAMMALS OF DIFFERENT ECOGENESIS	147
SHORT COMMUNICATIONS	
A. S. Goryunov, A. G. Borisova, V. A. Kolodey, S. P. Rozhkov. RAMAN SPECTROSCOPY OF BIOCONJUGATES OF BOVINE SERUM ALBUMIN AND SHUNGITE NANOCARBON	154

M. I. Sysoeva, E. N. Ikkonen. OPTIMIZATION OF PHOTOSYNTHESIS PROCESSES IN CUCUMBER PLANTS IN SHORT-TERM AND LONG-TERM LOW TEMPERATURE TREATMENTS	159
T. G. Shibaeva, E. F. Markovskaya. GROWTH AND THE STATE OF THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF YOUNG CUCUMBER PLANTS (<i>CUCUMIS SATIVUS</i> L.) UNDER CONTINUOUS LIGHT	162
DATES AND ANNIVERSARIES	
M. I. Sysoeva, E. N. Ikkonen. Vladimir Konstantinovich Kurets (on the 85 th anniversary)	167
O. N. Lebedeva. Victor Aleksandrovich Ilyukha (on the 50 th anniversary)	171
REVIEWS AND BIBLIOGRAPHY	175
INSTRUCTIONS FOR AUTHORS	178

Научное издание

Труды Карельского научного центра Российской академии наук

№ 2, 2012

Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

Печатается по решению Президиума Карельского научного центра РАН

Свидетельство о регистрации СМИ ПИ № ФС77-48848 от 02.03.2012 г. выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций

Редактор Л. В. Кабанова Оригинал-макет Т. Н. Люрина

Подписано в печать 29.04.2012. Формат $60x84^1/_8$. Гарнитура Pragmatica. Печать офсетная. Уч.-изд. л. 17,6. Усл. печ. л. 21,4. Тираж 500 экз. Изд. № 278. Заказ 51

Карельский научный центр РАН Редакционно-издательский отдел 185003, г. Петрозаводск, пр. А. Невского, 50