

of a considerable quantity of unproductive shoots. Influence of diphenylurea resulted to quantity increase only productive shoots on area unit, leads to substantial growth of weight grains and factor of economic efficiency of plants. Thus, inclusion of derivatives of urea, especially phenylurea and diphenylurea, in protective structures for seeds coating is represented perspective reception of increase of spring barley productivity.

*Поступила в редакцию 17.07.08*

УДК 535.31.045:577.15:635.21

О.А.КОВАЛЁВА, Т.Г.ЯНЧЕВСКАЯ, А.Н.ГРИЦ

**ЗАВИСИМОСТЬ ПРОЦЕССОВ РИЗОГЕНЕЗА ОТ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ И ЭНДОГЕННОГО УРОВНЯ АУКСИНА В МЕРИСТЕМНЫХ РЕГЕНЕРАНТАХ КАРТОФЕЛЯ (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) ПРИ УФ ОБЛУЧЕНИИ**

*Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича*

**Введение.** Наблюдения последних лет свидетельствуют, что, несмотря на предпринимаемые усилия по защите озонового слоя, концентрация его неуклонно уменьшается со скоростью  $0,36 \pm 0,04$  % в год в северном полушарии и  $0,40 \pm 0,05$  % – в южном. Это приводит к снижению его защитного эффекта от жесткого спектра ультрафиолетового (УФ) излучения ( $\lambda=100-280$  nm) Солнца всех форм жизни на Земле. Зарегистрировано устойчивое уменьшение содержания озона над Россией и странами СНГ [7]. Антропогенное загрязнение атмосферы вызывает как глобальное истощение озонового слоя и увеличение уровня УФ радиации (УФР), проникающей на Землю, так и способствует потеплению климата, одним из проявлений которого является увеличение частоты возникновения и продолжительности засух.

УФР диапазона а и b ( $\lambda=280-400$  nm), постоянно присутствующая в потоке солнечного света, относится к абиотическому (климатическому) фактору среды. Это стрессовый фактор, играющий важную фотобиологическую роль, и значимость

которого увеличивается в условиях глобального изменения климата.

Одним из критериев стресса на физиологическом уровне в последнее время в научной литературе стали считать изменение активности и появление новых изоформ пероксидазы – фермента, широко распространенного в живых организмах. Будучи по своей природе полифункциональной, пероксидаза участвует во многих процессах жизнедеятельности растений и обладает повышенной чувствительностью к внешним воздействиям [10].

Биохимия пероксидазы подробно изучена, поэтому изменение ее активности может быть обсуждено с позиций биохимических механизмов изменения метаболизма объектов, вызванных различными эффекторами. Пероксидазы относятся к группе гемсодержащих ферментов. Их биосинтез осуществляется в несколько этапов: сначала в митохондриях образуется гем, а затем – на гранулярной эндоплазматической сети – апопротеиновая часть молекулы, после чего в аппарате Гольджи к молекуле фермента присоединяется протетическая группа, выполняющая гликозидазную роль. Область молекулы пероксидазы между 34-м и 58-м аминокислотными остатками является консервативной и осуществляет такие функции, как присоединение гема, каталитическое взаимодействие с  $H_2O_2$  и, вероятно, участие в пептид-пептидных контактах. Поскольку после своего образования изоферменты пероксидазы перемещаются из цитоплазмы в межцитоплазматические пространства, считается, что пероксидазы являются секретируемыми ферментами [8]. Как известно, пероксидазы, проявляющие активность на стресс-факторы, существуют в растениях в двух формах: цитоплазматической и мембраносвязанной.

С другой стороны, установление как ингибирующего действия УФР суммарного диапазона а и b (большие дозы), так и активирующего действия (микро дозы) на различные физиологические процессы в растительной клетке, вызывает необходимость использования комплексных подходов в изучении этого феномена. В последние годы интенсивно исследуется возможность использования пероксидаз в качестве биоиндикаторов устойчивости растений к абиотическим и антропогенным факторам среды [8]. Поскольку состояние пероксидазного комплекса служит универсальным показателем стрессового состояния растений как

биотической, так и абиотической природы [10], пероксидазы могут быть задействованы в процессах ризогенеза через воздействие на ауксиновый, лигниновый и антоциановый метаболизм [4; 5; 6].

Цель данной работы – изучить взаимозависимость облучения УФР меристемных регенерантов картофеля, активности пероксидазы и содержание эндогенной ИУК на скорость ризогенеза апикальных регенерантов картофеля.

**Материалы и методы исследования.** Исследования выполнены на меристемных регенерантах картофеля сортов Скарб и Одиссей, которые выращивали под источниками света ДНАЗ-400 ( $\lambda_{\text{max}}=610$  нм), фотопериод 16/8 часов, в пластиковых контейнерах на синтетическом ионообменном субстрате Триона при температуре  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Источник УФР – лампа ДРТ – 1000 ( $\lambda=240-320$  нм). Облучение удлинённых черенков, включающих апикальную и базальную части стебля, проводили сразу же после срезки. Для контроля величины дозы облучения растений использовали УФР – дозиметр ДАУ – 8. Однократная доза облучения УФР меристемных регенерантов картофеля была  $120 \text{ Дж/м}^2$  или  $E_1=1,2 \cdot 10^7 \text{ эрг/м}^2$ . Контролем служили идентичные растения, не подвергавшиеся воздействию УФР.

Пероксидазную активность анализировали в контрольных (без УФР облучения) и опытных черенковых регенерантах одного возраста. Для экстракции цитоплазматических (растворимых) пероксидаз навеску 0,5 г листовой ткани гомогенизировали в 2 мл буфера следующего состава: 50 мМ ТРИС-НСl, pH=6.8; 0,3 М сахароза; 0,02 % аскорбат натрия; 5 мМ меркаптоэтанол; 2 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; 1 мМ PMSF. Гомогенат фильтровали через нейлоновый фильтр и центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант замораживали при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  и использовали в дальнейшем для анализа активности растворимых пероксидаз. Осадок мембран суспендировали в том же буфере с 2 % Тритоном X-100 и также центрифугировали для получения суммарного экстракта мембранных белков. Активность пероксидазы определяли микрометодом [11]. В лунки плоскодонных планшет для иммуноферментного анализа (Медполимер, Россия или «Linbro» Великобритания) заливали 100 мкл предварительно разбавленного  $\text{H}_2\text{O}$  в 20 раз (1:20) по объёму ферментного препарата, отцентрифугированного из листьев супернатанта и 0,03 мл раствора ортофенилендиамина с концентрацией 0,5 мг/мл.

Реакцию начинали добавлением 0,03 мл 0,02% перекиси водорода. Развитие окраски останавливали через равные промежутки времени добавлением 0,05 мл 4N раствора  $H_2SO_4$ . Планшеты сканировали на приборе для иммуноферментного анализа АИФ-М/340 (Витязь, Беларусь) при 492 нм.

Экстракцию эндогенной ИУК из растительного материала, предварительно зафиксированного жидким азотом, проводили комплексным методом [3]. Содержание фитогормона определяли методом иммуноферментного анализа [12] с использованием реактивов фирмы «Виконт» (Уфа) на микрофотометре АИФ-М/340 (Витязь, Беларусь) при 492 нм.

Полученные экспериментальные данные обработаны методом дисперсионного анализа с использованием критериев Фишера и Стьюдента для оценки степени различий по вариантам опыта.

**Результаты и обсуждение.** В ходе проведенных экспериментов установлено, что облученные растения характеризовались ускоренным образованием и развитием первичных корней. Отсчет времени анализа эффектов, проявляющихся на действие УФР, был определен 6-7-ью сутками. Это вызвано тем обстоятельством, что у регенерантов без каких-либо обработок первичные корни начинают появляться именно к этому периоду времени.

Так, у с.Одиссей при облучении дозой  $120 \text{ Дж/м}^2$  средняя длина корней (мм) на 96% была выше контроля, а при облучении дозами  $240 \text{ Дж/м}^2$  и  $360 \text{ Дж/м}^2$  – на 148 % и 190 % соответственно (табл.1). Похожая динамика наблюдается и у сорта Скарб. Кроме этого, в ходе эксперимента отмечено, что укоренение контрольных регенерантов в среднем происходит на седьмые сутки после черенкования, а регенеранты, облученные УФР, укореняются на третьи – четвертые сутки.

На рис. 1 представлены 7-ми суточные растения при различных дозах облучения и без УФР. На рисунках можно проследить прямо пропорциональную зависимость количества первичных корешков от дозы облучения регенерантов.

Таблица 1. Влияние различных доз УФР на процессы ризогенеза меристемных регенерантов картофеля сортов Скарб, Одиссей (на 7-е сутки)

Сорт	Вариант	Количество укоренившихся регенерантов (%)	Средняя длина корней варианта (мм)
Одиссей	Контроль	10±1,1	1,1±0,1
	+УФР 120 Дж/м <sup>2</sup>	15±1,5	2,16±0,1
	+УФР 240 Дж/м <sup>2</sup>	20±2	2,73±0,2
	+УФР 360 Дж/м <sup>2</sup>	30±1,8	3,2±0,2
Скарб	Контроль	0	Зачатки
	+УФР 120 Дж/м <sup>2</sup>	10±0,8	0,93±0,06
	+УФР 240 Дж/м <sup>2</sup>	20±1,3	1,5±0,1
	+УФР 360 Дж/м <sup>2</sup>	35±2,1	2,3±0,1

При анализе активности пероксидазы было установлено, что облучение УФР дозами 120 Дж/м<sup>2</sup>, 240 Дж/м<sup>2</sup> и 360 Дж/м<sup>2</sup> способствует резкому увеличению активности пероксидазы в период 1-3 сутки после облучения, но начиная с 4-5 суток после облучения активность пероксидазы у опытных образцов начинает уменьшаться по сравнению с контрольными, сохраняя этот диапазон различий в последующем (табл. 2).

Из экспериментов, представленных в табл. 1, 2 и рис. 1 следует, что наибольшая скорость ризогенеза меристемных регенерантов наблюдалась на фоне повышенной концентрации пероксидазы в листьях картофеля.

Известно, что инициация придаточных корней на регенерантах растений тесно связана с эндогенным уровнем ауксинов в зоне ризогенеза [4]. В литературе широко обсуждается вопрос о связи процесса ризогенеза, индуцированного природными или синтетическими ауксинами, с активацией ряда ферментных систем. Утверждается, что повышение активности пероксидазы в растительных тканях – типичная ответная реакция на возрастание в них эндогенного уровня ауксинов [5].

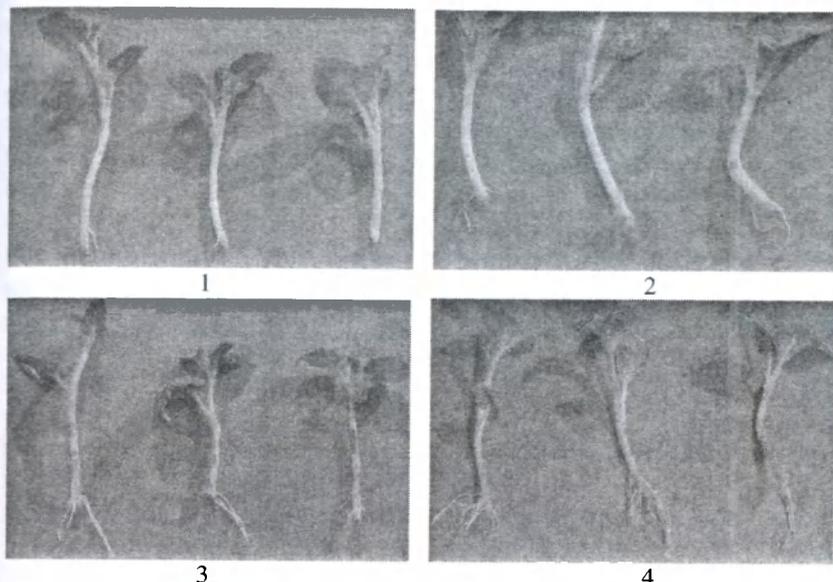


Рис.1. Влияние УФ облучения на ризогенез меристемных регенерантов картофеля сорта Одиссей: 1 – контроль; 2 – облучение УФС дозой 120 Дж/м<sup>2</sup>; 3 - облучение УФС дозой 240 Дж/м<sup>2</sup>; 4 - облучение УФС дозой 360 Дж/м<sup>2</sup> (возраст рассады 7 суток).

Таблица 2. Влияние УФ облучения суммарного диапазона на активность пероксидазы листьев меристемных регенерантов картофеля сортов Скарб и Одиссей (на 1-3-е и 5-7-е сутки после облучения)

Сорт	Вариант	Активность пероксидазы (усл.ед/ мг белка)	
		1-3-ьи сутки	5-7-е сутки
Скарб	Контроль	1,069±0,01	1,077±0,04
	+УФС 120Дж/м <sup>2</sup>	1,080±0,02	0,884±0,04
	+УФС 240Дж/м <sup>2</sup>	1,096±0,04	0,747±0,02
	+УФС 360 Дж/м <sup>2</sup>	1,103±0,02	0,728±0,04
Одиссей	Контроль	0,800±0,02	0,811±0,04
	+УФС 120Дж/м <sup>2</sup>	0,920±0,04	0,785±0,02
	+УФС 240Дж/м <sup>2</sup>	0,990±0,02	0,762±0,02
	+УФС 360 Дж/м <sup>2</sup>	1,020±0,04	0,724±0,04

Для выяснения зависимости скорости ризогенеза облученных УФР апикальных регенерантов от изменения эндогенного уровня ИУК, нами проведены эксперименты на 3-х и 7-ми суточных регенерантах картофеля двух сортов (табл.3).

Как видно из данных, представленных в табл. 3, содержание свободной ИУК в опытных (облученных УФ) меристемных регенерантах картофеля намного (в десятки раз) превышает концентрацию фитогормона у контрольных регенерантов картофеля, причем не выявлено достоверно значимых сортовых особенностей.

Таблица 3. Содержание свободной ИУК в листьях меристемных регенерантов картофеля (нг/г сырой массы)

Сорт	Вариант	Содержание свободной ИУК, нг/г	
		3-ьи сутки	7-ые сутки
Скарб	Контроль	12±2	352±22
	+ УФР 120 Дж/м <sup>2</sup>	362±21	1800±45
	+ УФР 240 Дж/м <sup>2</sup>	370±14	2130±320
	+ УФР 360 Дж/м <sup>2</sup>	440±35	3050±268
Одиссей	Контроль	15±4	298±15
	+ УФР 120 Дж/м <sup>2</sup>	388±25	1950±34
	+ УФР 240 Дж/м <sup>2</sup>	445±37	2180±210
	+ УФР 360 Дж/м <sup>2</sup>	560±42	3330±253

Полученные экспериментальные данные однозначно свидетельствуют в пользу того, что УФР облучение вызывает активацию биосинтеза фитогормонов, в частности, ИУК, увеличивает активность пероксидазы, что, по-видимому, и стимулирует процесс ризогенеза. Такая опосредованность может быть связана с особенностями строения и биосинтеза пероксидазы, на который может воздействовать УФР облучение. В связи с тем, что высокий полиморфизм пероксидаз обусловлен с одной стороны, кодированием большим количеством локусов и аллелей [8], а с другой – посттранскрипционными модификациями, связанными с работой специфических протеиназ и гликозированием отдельных изоферментов, в процесс ризогенеза могут быть вовлечены множество координационных физиологических механизмов. В частности, установлено, что кроме выполнения основной каталитической функции в окислении электронно-донорных молекул H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> пероксидазы участвуют в

процессах лигнификации, гидроксирования флавоноидов и регуляции ростовых процессов [10], что указывает на функциональную ключевую роль пероксидаз в процессах жизнедеятельности растений. Это отчетливо проявляется в трансформации пероксидазного комплекса при действии стрессовых факторов среды. С другой стороны, к настоящему времени известно, что коротковолновый свет влияет на протекание множества биологических процессов, происходящих в высших растениях. УФР вызывает изменения биохимических параметров растительных организмов [11]. Все эти изменения могут носить характер разнонаправленного действия УФР на синтетические процессы в высших растениях. Наши экспериментальные результаты показывают, что микродозы УФР способны увеличивать ферментативную активность ИУК, что хорошо согласуется с литературными данными о стимуляции внутриклеточных процессов под действием УФР облучения [1, 2].

**Заключение.** Резюмируя экспериментальные и обсуждаемые литературные данные можно заключить, что полученные нами результаты позволили установить стимулирующий характер действия микродоз УФ облучения меристемных регенерантов картофеля на скорость ризогенеза, опосредованный увеличением эндогенного уровня ИУК и активности пероксидазы.

#### Литература

1. Caldwell, C.R. // *Plant Physiol.* 1994. - V. 104. - P.395-399.
2. Karez W., Stolarek J. // *Physiol. Plant.* 1988, V.74, №4. - P. 770-774.
3. Комплексный метод определения природных регуляторов роста. Первичный анализ незрелых семян кукурузы на активность свободных ауксинов, гиббереллинов и цитокининов с помощью биотестов / Власов П.В. [и др.] // *Физиология растений.* - 1979. - Т.26, вып.3. - С. 648-655.
4. Гуськов А.В. // *Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений.* 1991, т.8, с. 151.
5. Гуськов А.В., Земская В.А. и др. // *Физиология растений.* 1985, т.32, вып. 6, с. 1137 – 1144.
6. Юсупова З.Р., Хайруллин Р.М., Максимов И.В. // *Физиология растений.* 2006. Т. 53. № 6. С. 910-917.
7. Канаш, Е.В. Эколого-физиологические основы действия УФ-В радиации и диагностика устойчивости растений. / Е.В. Канаш Автореферат канд...диссертации. - СПб, 2001.- 47 с.
8. Карташова Е.Р., Руденская Г.Н., Юрина Е.В. // *Сельскохозяйственная биология.* 2000, № 5, с. 63-70.

9. Кудоярова, Г.Р., Веселов С.Ю., Еркеев М.И. и др. // Физиология растений. - 1986. - Т.33, вып.6. - С. 1221-1227.

10. Александрова Е.Ю., Орлова М.А., Нейман П.Л. // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. 2006. Т.47. № 5. С. 350-352.

11. Генотипические особенности реакции растений на средневолновую ультрафиолетовую радиацию / П.Д. Усманов [и др.] // Физиология растений. -1987. Т. 34, вып. 4. - С. 720 – 729.

12. Хайрулин, Р.М., Юсупова, З.Р., Трошина, Н.Б. // Физиология растений. - 2000. - Т. 47, № 1. С. 114-119.

**O.A.KOVALYOVA, T.G.YANCHEVSKAYA, A.N.GRIC  
DEPENDENCE OF PROCESSES RHIZOGENESIS ON  
ACTIVITY PEROXIDASE AND ENDOGENOUS LEVEL AUXIN  
IN MERISTEMATIC REGENERANTS OF THE POTATO  
(SOLANUM TUBEROSUM) UNDER THE ULTRA-VIOLET  
IRRADIATION**

**Summary**

Revealed interdependence of rhizogenesis velocity irradiated by ultra-violet radiation of apical regenerants the meristematic plants of potatoes from the activity of peroxidases and maintenance endogenous indole-acetic acid. Tinned experimental data to install stimulate nature of action ultra-violet irradiating of meristematic regenerants of potatoes on the rhizogenesis velocity, mediated by increase endogenous a level of an indole-acetic acid and activity peroxidases have allowed.

*Поступила в редакцию 22.09.08*

УДК 581.132:576.342:577.352.468

**Н. А. КОПЫЛОВА**

**РОЛЬ АКВАПОРИНОВ В ПЕРЕНОСЕ CO<sub>2</sub> ЧЕРЕЗ  
КЛЕТОЧНУЮ МЕМБРАНУ И РЕГУЛЯЦИИ  
ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АССИМИЛЯЦИИ**

*Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф.Купревича*

**Введение.** Способность контролировать транспорт воды и растворенных в ней веществ через мембрану имеет для клетки первостепенное значение. Однако молекулярные механизмы трансмембранного транспорта изучены недостаточно. Долгое время