

Күнбағыс дәнінің белок қоры - гелиантиннің электрофоретикалық спектрлерінің талдауы жекелеген полипептидтер мен спектрлердің тұтасымен алғанда сорттық деңгейде өзіндік ерекшелігін көрсетті. Спектрлер арасындағы айырмашылық сілтілі ортада А және В аймақтарында байқалды.

Сілтілі ортада фракцияланған гелиантин кұрамының талдауы бойынша ЖШС «ШҚ АШҒЗИ» күнбағыс селекциясының Жайна, Гулбағыс, Белоснежный, Заря және Скороспелый 40 сорттарының барлығы да (2-4 биотиптен тұратын) гетерогенділік көрсетті. Скороспелый 40 сорты 3 биотиптен тұрады (65:20:15). Жайна сорты да пайыздық қатынасы 47,7; 24,4 және 25,9 % 3 биотиптен тұрады. Гулбағыс сортыда полиморфты болып табылды, оның пайыздық қатынасы 48,2; 31,0 және 20,8 %, Заря сорты 4 биотиптен тұрады (45,8;25; 20,8; 8,3%), Белоснежный сорты 2 биотиптен тұрады (51,0; 49,0%).

Биохимиялық зерттеулердің нәтижесінде мақсары, рапс және күнбағыс дақылдарының жекелеген дәндерінің белок қоры электрофорезі әдісі арқылы экстракциялау және фракциялау жағдайлары іріктелді.

Дәндегі белок қорының спектрлері бойынша мақсарының, рапстың және күнбағыстың сорттарына біртектілеу жүргізілді. Глобулиннің электрофоретикалық спектрлері бойынша ұқсас сортшілік топтары анықталды.

#### Әдебиеттер

- 1 Малько А.М. Анализ состояния качества семян подсолнечника в России и оптимизация процесса сертификации для его повышения // Науч.-техн. биол. ВНИИ масл. культур . - 2004. - №2. - С.47-95.
- 2 Конарев.В.Г. Белки растений как генетические маркеры. – М.: Колос, 1983. - 148 с.
- 3 Gardiner S.F., Forde M.B., Slack C.R. Grass cultivar identification by sodium dodecylsulphate polyacrilamide gel electroforesis // New Zealand J.Agricult. Res. – 1986. - Vol.29, №2. - P.193-206.
- 4 Pugno N.E., Borghi B., Mellini F. e.a. Electroforesis of gliadins for estimating the genetic purity in hybrid wheat seed production. Genetica agrarian. – 1986. - №40. - P.205-212.
- 5 Булатова К.М. Разнообразие генетических ресурсов ячменя НПЦЗиР по составу гордеинов //Вестник КазНУ. 2007. №5(35), серия биол. С.36-40.
- 6 Булатова К.М., Дидоренко С.В. Запасные белки сои в идентификации сортов и селекционных линий //Вестник с.-х. науки Казахстана.-200.-№ 4.-с.9-11.
- 7 Анисимова И.Н., Гаврилова В., Лоскутов А.В. Рожкова В.Т., Толмачев В.В. Полиморфизм и наследование запасного белка семян у подсолнечника // Генетика. - 2004. - Т. 27, № 9. - С.1215-1223.
- 8 Danno G. Extraction of unreduced glutenin from wheat flour with sodium dodecyl sulfate.//Cer.Chem. - 1981, 58. № 4. -P.311-313
- 9 Laemml U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage // Nature. - 1970. - Vol.277, № 4. - P.178-189
- 10 Булатова К.М. Изучение компонентного состава глютеина пшеницы // Вестник с.-х. науки Казахстана. - 1985. - № 4. - С.37-39.

#### Резюме

В статье приведены результаты идентификации сортов масличных культур (сафлора, рапса и подсолнечника) по спектрам запасных белков. Установлены информативные зоны компонентов для каждой культуры, определена степень полиморфности сортов, определено внутрисортное соотношение биотипов.

#### Summary

The results of oilseed crops (safflower, canola and sunflower) varieties identification on the spectra of storage proteins are given. Informative zones of components for each culture were determined, the degree of intra varieties polymorphism and ratio of biotypes were established.

УДК 581.192

Джокебаева С.А., Алашбаева Л.Ж., Оразова С.Б., Ерназарова Г.И.

### АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ЗАЩИТЫ КЛЕТОК МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В МОНО- И ДИКУЛЬТУРЕ

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

Установлено снижение активности ферментов антиоксидантной системы защиты клеток микроводорослей *Chlorella sp.* (штамм E24) и *Anabaenopsis sp.* (Маркб) в дикультуре, характеризующейся мутуалистическим типом взаимодействия. Предполагается возможность использования этого показателя для оценки типов биотических взаимоотношений в дикультуре.

Микроводоросли и цианобактерии, являясь фототрофными организмами, способны к неограниченному росту и продуцированию широкого спектра биологически активных соединений [1]. При использовании данных организмов в биотехнологическом производстве необходимо создание оптимальных условий для их интенсивного роста с целью наращивания максимально возможной биомассы [2]. В ряде случаев возможен подбор видов, способных к такой интенсификации ростовых и синтетических процессов в ди- и

поликультурах, которую трудно получить при выращивании монокультур. При этом создаются ассоциации мутуалистического типа, в которых виды способны к совместному росту и взаимной стимуляции жизненных процессов. Более того, в таких ассоциативных системах могут продуцироваться биологически активные соединения, к синтезу которых не способны монокультуры видов микроводорослей [3-5]. Однако для обнаружения видов, вступающих в мутуалистические взаимоотношения друг с другом, необходим длительный скрининг самых различных двухвидовых сочетаний с определением коэффициентов размножения и проведением специфических биотестов, что требует довольно значительного времени и усилий. Наличие какого-либо маркера, способного дать быструю оценку типа биотических взаимоотношений, возникающего в выращиваемой дикультуре, существенно ускорило бы поиск видов, способных к мутуалистическим взаимоотношениям в ассоциативных системах.

Известно, что под влиянием патогенов (бактерий, грибов, микроорганизмов) резко усиливается генерация активных форм кислорода (АФК) и активизируются ферменты антиоксидантной системы защиты клеток [6,7]. В водорослевых дикультурах присутствие вида, способного тормозить ростовые процессы вида-партнера, можно сравнить с действием фитопатогена, извлекающего одностороннюю пользу из совместного произрастания с помощью продукции экзометаболитов. Исходя из этого, можно предположить, что при благоприятных для роста условиях, в частности, при отсутствии антагонистических видов активность ферментов антиоксидантной системы защиты может быть существенно ниже, чем в их присутствии. В связи с этим целью данной работы явилось определение активности ферментов антиоксидантной защиты клеток (глутатион-редуктазы, супероксиддисмутазы, каталазы и аскорбат-пероксидазы) в моно- и дикультурах микроводорослей, характеризующихся мутуалистическими взаимоотношениями видов.

#### Материалы и методы

Объектами исследования служили одноклеточная зеленая микроводоросль *Chlorella sp.* (штамм E24) и нитчатая цианобактерия (синезеленая водоросль) *Anabaenopsis sp.* (Марк6), выращиваемые в виде одновидовых и двухвидовых культур (дикультур). При постановке опытов с дикультурами соотношение биомасс цианобактерий по сырой массе соответствовало соотношению 0,5N:0,5N от нормы (N) инокулята в монокультурах. Колбы с культурами, высеянными в жидкую питательную среду Фитцджеральда [7], выдерживали при температуре 26-28°C в люминистате, освещаемом люминесцентными лампами в течение 16 часов в сутки. Продолжительность культивирования 15 суток, что соответствует концу экспоненциальной фазы.

Для определения активности супероксиддисмутазы (СОД) водоросли отделяли от среды центрифугированием. Полученную биомассу разрушали замораживанием в жидком азоте с экстракцией ферментов 60 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,8). Экстракт отделяли от остатков клеток центрифугированием при 5000 g в течение 15 минут. Экстракцию повторяли несколько раз. Активность СОД определяли фотометрически. Реакционная смесь состояла из 25 мкг белка, 0,1 мл нитротетразолия синего, 0,1 мл мМ рибофлавина, 2,7 мл фосфатного буфера (рН=7,0), содержащего 1 мМ ЭДТА, 13 мМ метионина. После 15 минут инкубирования на свету поглощение смеси измеряли при 560 нм.

Для определения активности каталазы (САТ) извлечение проводили фосфатным буфером (рН 7,0). Реакционная смесь состояла из 2 мл 0,1 М фосфатного буфера, 10-100 мкл водорослевого экстракта и 100 мкл перекиси водорода (конечная концентрация 16 мМ. После перемешивания смеси определяли оптическую плотность при 240 нм через каждые 20 сек. в течение 1 минуты.

Для определения активности глутатион-редуктазы (GR) использовали тот же экстракт (50-200 мкг белка). К нему добавляли 1 мл фосфатного буфера, содержащего 0,5 мМ глутатиона и 0,15 мМ NADPH. Измеряли активность фермента в течение 1 минуты при 340 нм.

Активность аскорбат-пероксидазы (АРОХ) определяли по уменьшению поглощения при 290 нм в течение 1 минуты. Реакционная смесь состояла из 2 мл фосфатного буфера (рН 7,0), 0,4 мМ аскорбиновой кислоты, 2,5-25 мкг водорослевого экстракта и 16 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [8].

#### Результаты и их обсуждение

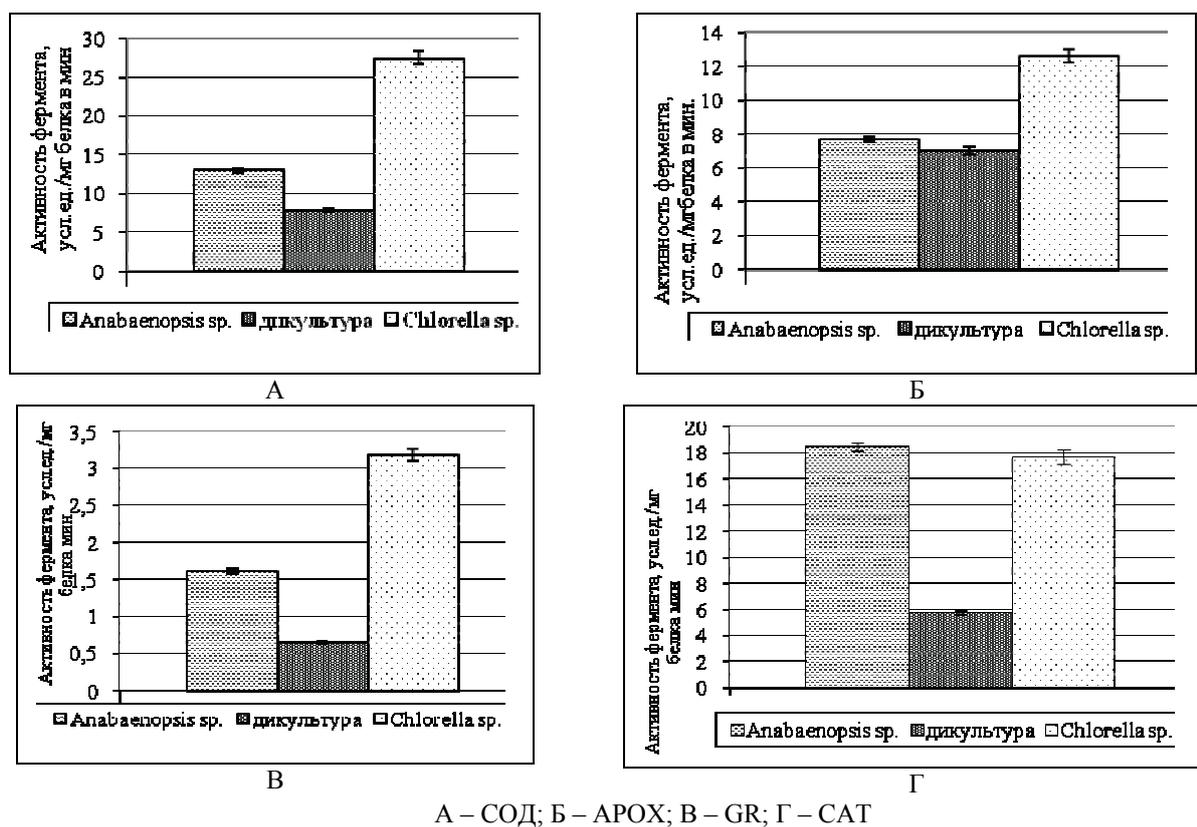
При определении активности СОД в монокультурах *Anabaenopsis sp.* и *Chlorella sp.*, а также в их дикультуре установлено, что мутуалистические взаимоотношения между указанными видами способствуют снижению активности фермента при их совместном культивировании (рисунок 1А).

Так, если в монокультуре *Anabaenopsis sp.* активность СОД составляет 13,0, а в монокультуре *Chlorella sp.* – 27,4, то в дикультуре – только 7,8. Соответственно, снижение активности при совместном культивировании указанных видов составляет 1,7 – 3,5 раза по сравнению с их монокультурами.

Активность аскорбатпероксидазы в монокультуре *Chlorella sp.* значительно выше, чем у *Anabaenopsis sp.*, что составляет соответственно 12,6 и 7,7 (рисунок 1Б). В дикультуре наблюдается незначительное снижение активности АРОХ по сравнению с монокультурами.

Активность глутатион-редуктазы при выращивании изучаемых видов в двухвидовой культуре резко снижается по сравнению с монокультурами (рис. 1В). Так, в дикультуре активность GR в 3,2 раза ниже по сравнению с *Anabaenopsis sp.*, а по сравнению с *Chlorella sp.* – в 4,9 раза.

Такое же резкое снижение активности в дикультуре наблюдается и у каталазы: в монокультуре *Anabaenopsis sp.* – 18,5, монокультуре *Chlorella sp.* – 17,7, в дикультуре – 5,7.



А – СОД; Б – АРОХ; В – GR; Г – САТ

**Рисунок 1** - Активность ферментов в монокультурах *Anabaenopsis sp.* и *Chlorella sp.* и их дикультуре

Основной функцией изучаемых ферментов является защита клетки от избыточного количества АФК, генерируемой в ответ на стрессовое воздействие. Учитывая снижение активности ферментов-антиоксидантов в дикультуре, можно предположить, что при совместном произрастании данных видов микроводорослей негативное воздействие АФК не проявляется. Возможно, это является результатом возникновения в дикультуре благоприятных условий для роста обоих видов микроводорослей.

Таким образом, определение активности ферментов антиоксидантной системы может способствовать разработке экспресс-метода оценки типа биотических взаимоотношений в смешанных культурах микроводоросли. Снижение активности ферментов в мутуалистических дикультурах является важной характеристикой мутуалистического типа взаимовлияния видов.

#### Литература

- 1 Минюк Г.С., Дробецкая И.В., Чубчикова И.Н., Терентьева Н.В. Одноклеточные водоросли как возобновляемый ресурс: обзор//МЭЖ.-2008.-Т.7, №2.-С.5-23.
- 2 Урмыч Е.М., Бердыкулов Х.А., Эшпулатова М.Б. Продуктивность микроводорослей в интенсивных условиях культивирования// Альгология. 2008. Т. 18. № 3.-с.347-352.
- 3 Bolsunovsky A.Y. Intensive cultivation of microalgae communities-Proc.4<sup>th</sup> Eur.Congr.Biotechnol., Amsterdam, June 14-19,1987.Vol.1.-Amsterdam etc.-1987.-с.349.
- 4 Джокебаева С.А. Определение типов биотических взаимоотношений в дикультурах микроводорослей// Вестник КазНУ, сер. Экол., № 1 (27), 2010. С.12-16.
- 5 Джокебаева С.А., Колумбаева С.Ж., Оразова С.Б. Биологическая активность вторичных метаболитов смешанной культуры цианобактерий // Вестник КазНУ, серия биологическая, №3 (38) 2008. - С. 45-50.
- 6 Колупаев Ю.Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции//Вестник Харьковского нац.университета, Сер.биол. 2007, вып.3(12). С.6-26.
- 7 Гарифзянов А.Р., Жуков Н.Н., Иванищев В.В. Образование и физиологические реакции активных форм кислорода в клетках растений// Соврем.проблемы науки и образования, 2011, №2. Электронный научный журнал /http://www.science-education.ru/96-4600.
- 8 Ratkevicius N., Correa J. A., Moenne A. Copper accumulation, synthesis of ascorbate and activation of ascorbate peroxidase in *Enteromorpha compressa* (L.) Grev. (Chlorophyta) from heavy metal-enriched environments in northern Chile // Plant, Cell and Environment, 2003, 26, 1599–1608.

### Тұжырым

*Chlorella sp.* (штамм E24) и *Anabaenopsis sp.* (Марк6) мутуалистік ара-қатынастарымен сипатталатын микробалдырлардың қос дақылында клеткалардың антиоксиданттық қорғаныш жүйесі ферменттерінің активтілігі төмендегені анықталды. Қос дақылдардағы биотикалық ара-қатынастардың түрін бағалау үшін бұл көрсеткішті пайдалану үшін мүмкіндік туындау мүмкін.

### Summary

Decrease in activity of enzymes antioxidant protection of cells of microalgae *Chlorella sp.* (strain E24) and *Anabaenopsis sp.* (Марк6), in biculture, characterized by mutualistic interference type is established. Possibility of use of this indicator for an estimation of types of biotic mutual relations in biculture is supposed.

УДК 57.082

Джокебаева С.А., Калбаева А.М., Оразова С.Б.

## ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ КРИОКОНСЕРВАЦИИ НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НЕКОТОРЫХ КУЛЬТУР МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

*Подобраны щадящие режимы криоконсервации микроводорослей Chlorella sp.(штамм MB-1) и Anabaenopsis sp. (штамм Марк 6) методом витрификации, обеспечивающие сохранность физиолого-биохимических свойств на уровне, близком к контролю.*

Микроводоросли, будучи универсальным сырьем для многих биотехнологических производств, требуют особого внимания к сохранению их генетической и физиолого-биохимической стабильности. Поскольку для непрерывного производственного процесса нужен гарантированный источник сырья, необходима разработка методов длительного сохранения физиологически активных культур клеток [1,2].

Криоконсервация культур при температуре жидкого азота является наиболее отвечающим требованиям методом. Один из способов криоконсервации, витрификация, относительно легко выполнима даже в неоснащенных специальным оборудованием лабораториях [3].

В ранее проведенных исследованиях мы убедились, что метод витрификации может быть применен для криосохранения коллекционных штаммов микроводорослей. Подобраны протоколы криозамораживания для отдельных видов, обеспечивающие высокую жизнеспособность культур [4,5]. Однако остается невыясненной сохранность физиолого-биохимических свойств после криозамораживания и оттаивания культур.

Очень широкий спектр видового разнообразия микроводорослей не позволяет использовать один общий метод криозамораживания, который подошел бы для всех видов. Поэтому стоит вопрос о поиске индивидуальных протоколов, оптимальных для отдельно взятых или желательных для близкородственных микроводорослей.

В связи с этим, целью данной работы являлся подбор режимов криоконсервации, при которых физиолого-биохимические характеристики культур микроводорослей (рост, жизнеспособность, содержание пигментов, активность нитратредуктазы) были бы максимально приближены к характеристикам не подвергавшихся криозамораживанию микроводорослей.

### Материалы и методы

В качестве объекта для экспериментов взяты два штамма микроводорослей, отличающиеся по морфологическим признакам: 1) – одноклеточная, зеленая водоросль *Chlorella sp.*, выделенная из воды Каспийского моря (штамм MB-1). 2) – нитчатая сине-зеленая микроводоросль *Anabaenopsis sp.*, полученная из образцов, отобранных из озера Маркаколь (штамм Марк 6). Колбы с суспензионными культурами микроводорослей выставляли в люминистат с фотопериодом 16 ч.-свет/8 ч.-темнота, при освещенности 4000 лк.

Для приготовления инокулятов из жидких суспензий зеленых одноклеточных водорослей проводили центрифугирование культур при 6000 об/мин в течение 15 минут. Процедуру повторяли, пока в осадке не набиралось приблизительно 0,5-1,0 г биомассы. Далее отобранную биомассу суспендировали в свежей питательной среде и рассевали в колбы на 100 мл для выращивания в течение 5-6 дней, что соответствует log фазе ростового цикла культур. После чего процедуру центрифугирования для отделения биомассы от культуральной жидкости повторяли. В случае нитчатой синезеленой водоросли для отделения биомассы от культуральной жидкости достаточно было профильтровать культуру через капрон.

При криозамораживании культур микроводорослей использовали протокол, составленный для высших растений. Этот протокол был адаптирован нами для микроводорослей. В экспериментах по криозамораживанию культур микроводорослей использованы следующие сочетания криопротекторов и осмотиков: 1) ДМСО (диметилсульфоксид) 5% (Д5), 2) ДМСО 8% (Д8), 3) Глицерин 5% (Г5), 4) Глицерин 15% (Г15) и 5) Глицерин 30% в сочетании 0,4 М сахарозой (Г30), и соответственно контрольный вариант (К), который ничем не обрабатывался. В первых четырех вариантах роль и осмотика, и криопротектора