

концентрациях 0,01; 0,1; 1, 2, 5 и 10 % она была ниже или равнялась контролю. Обработка семян ПВС оказывало положительное

влияние на рост побегов, за исключением варианта с 0,01 % содержанием ПВС. Длина корней проростков была неодинаковой и зависела от концентрации ПВС в капсулирующей смеси. Наиболее оптимальным для роста корней проростков было внесение ПВС в концентрации 1 %, при которой длина корней на 2,7 см была выше относительно контроля.

Полученные данные свидетельствуют о положительном влиянии предпосевной обработки семян ПВС в концентрации 5 % на энергию прорастания, всхожесть семян и длину стебля.

Таким образом, проведенные исследования показали, что обработка семян риса пленкообразующими веществами КМЦ в концентрации 2 % и ПВС в концентрации 5 % оказывают положительное влияние на энергию прорастания и всхожесть семян, рост и развитие вегетативных частей проростков.

Настоящая публикация сделана в рамках подпроекта, финансируемого в рамках СКГ, поддерживаемого Всемирным банком и Правительством Республики Казахстан. Заявления авторов могут не отражать официальной позиции Всемирного Банка и Правительства Республики Казахстан.

1. Таранов О.Н. Реакция риса (*Oriza sativa* L., subsp.sino-japonica) на низкие положительные температуры и трансдукция стрессорного сигнала в онтогенезе растений // Мат. Всероссийского симпозиума растения и стресс. – 2010. – С. 351-352.

2. Анализ растениеводства РК, 2010. Материал сайта <http://www.rfcaratings.kz>

3. Утеулин К.Р., Отаров А., Мухамбетжанов С.К. Рекомендации по обработке семян риса физиологически активными пленкообразующими составами. – Алматы, ИП «Волкова Е.В.», 2011. – 30 с.

4. ГОСТ 12038-84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. – М.: Изд-во госстандартов, 2001. – 60 с.

Пленка қалыптастырушы 2% - пайыз КМЦ және 5%- пайыз ПВЦ затымен күріш дәнін өңдегенде дәнің өнуі, биіктігі және өсу кезеңі кезінде жақсы дамыуы мен өсу энергиясы жағынан жақсы әсері болғанын көрсетті.

It was demonstrated that treatment of rice seeds film-forming substance of CMC at a concentration of 2% and PVA at a concentration of 5% have a positive effect on germination energy and germination, growth and development of vegetative parts of seedlings.

УДК 577.158:633.11

Т.Л. Тажобаева

ДЕЙСТВИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА НА ИЗОПЕРОКСИДАЗЫ ПШЕНИЦЫ, РАЗЛИЧАЮЩИЕСЯ ПО ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИМ ТОЧКАМ
(Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

При воздействии низких температур на проростки пшеницы установлена изменчивость активности изоферментов пероксидаз, различающихся по изоэлектрическим точкам. С помощью кластерного анализа оценена мера сходства и различия между генотипами пшеницы по общей, относительной и удельной активности множественных форм пероксидазы, разделенных изоэлектрофокусированием.

Низкотемпературные модификации активности и изоферментного состава пероксидаз растений установлены различными исследователями [1-4]. Подобные изменения отражают метаболические перестройки, связанные с антиоксидантной защитой растительных клеток, и, по всей видимости, имеют адаптационное значение в стрессовых условиях выращивания [5-7]. В экстремальных температурных условиях обнаружено появление в электрофоретических спектрах новых изоформ пероксидазы у проростков пшеницы и кукурузы, определено их относительное содержание и аминокислотный состав [3]. С помощью количественных методов выявлены закономерности в увеличении активности одних изоферментов и уменьшении других у сортов и гибридов пшеницы и кукурузы, различающихся по холодо- и морозоустойчивости [4].

Вышеперечисленные изменения связаны с работой транскрипционно-трансляционного клеточного аппарата и, возможно, генетически предопределены [7,8]. Однако остается открытым вопрос, сопряжены ли они с активизацией, обусловленной изменением конформации отдельных изоферментов, или связаны лишь с количественным накоплением тех или иных изоферментов. Одним из решений поставленной задачи является измерение относительной и удельной активности фермента при его изоэлектрофокусировании (ИЭФ). Чрезвычайно важно для этой цели проводить эксперименты на контрастных по морозоустойчивости сортах.

Материалы и методы

Объектом исследования служили листья 20-дневных проростков озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), различающихся по морозоустойчивости сортов: Альбидум 114, Опаке 1, Богарная 56. Низкотемпературный стресс создавали в морозильных камерах с искусственным освещением в разработанном нами режиме ступенчатого охлаждения проростков, позволяющем выявить наибольшие различия по пероксидазной активности между устойчивыми и неустойчивыми генотипами пшеницы [4].

Для получения препаратов пероксидаз (КФ 1.11.1.7 - H_2O_2 - оксидоредуктаза) в опытах до и после охлаждения листья проростков срезали и после гомогенизации в холодном трис (5мМ) - глициновом (38мМ) буфере рН 8,3, содержащем 30% сахарозы, центрифугировали с последующим диализом против дистиллированной воды. Белки из диализата осаждали 4 объемами холодного ацетона. Осадки растворяли в 30%-ном растворе сахарозы и использовали для ИЭФ.

ИЭФ проводили в 5%-ном ПААГ, содержащем 2% Амфролинов с интервалом рН 3.5—9.5 («ЛКВ», Швеция) в пластинах размером 110 x 110x1 мм в системе Multiphor («ЛКВ», Швеция). Режим ИЭФ: 10 мин-200 В, 20 мин-400 В, 30 мин - 1200 В. Для установления изоэлектрических точек (ИЭТ) изопероксидаз на одну из дорожек наносили стандартную смесь белков-маркеров с известными ИЭТ: амилоглюкозидазу – 3.5; ферритин – 4.4; бычий сывороточный альбумин – 4.7; β -лактоглобулин – 5.34; кональбумин – 5.9; миоглобин лошади – 6.9 и 7.3; миоглобин кита – 7.7 и 8.3; рибонуклеазу – 9.45; цитохром с – 10.65 («Serva», Германия).

ИЭФ проводили одновременно на двух пластинках, содержащих одинаковое количество анализируемого материала. После завершения ИЭФ одну из них обрабатывали для выявления ферментативной активности растворами бензидина и перекиси водорода. Другую пластину после фиксации белков в 12.5%-ном растворе ТХУ, содержащем 3.3% сульфосалициловой кислоты, окрашивали серебряным реагентом [9]. Затем оба геля сканировали с помощью лазерного денситометра. Относительную активность при ИЭФ пероксидаз определяли согласно [10]. Для обнаружения удельной активности отдельных изоформ ферментов, как правило, используется их препаративное выделение, которое представляет собой трудоемкий и многоэтапный процесс, связанный зачастую с потерями минорных изоформ. В данных исследованиях удельную активность изопероксидаз непосредственно после разделения их суммарного препарата в полиакриламидном геле определяли разработанным нами методом [11]. Все измерения проводили в 2-3-кратной аналитической и двух биологических повторностях. Математическую обработку результатов проводили методом кластерного анализа по минимуму произведений $D(1-r)$, где D – Евклидово расстояние, r – коэффициент корреляции [4].

Результаты и их обсуждение

Спектр изопероксидаз после ИЭФ условно разделили на три зоны: «кислые» с ИЭТ в диапазоне 3.40 -5.40; «нейтральные» с ИЭТ 5.95 -8.05; «щелочные» с ИЭТ 8.20 – 11.20. Области «кислых» и «нейтральных» пероксидаз пшеницы насчитывают по 7 изоферментов, а зона с ИЭТ – от 8.20 до 11.20 состоит из 8 пероксидаз.

По отношению активностей изопероксидаз в группах с различными ИЭТ (рис.1) обнаружена сортовая специфичность как до (контроль), так и после низкотемпературного воздействия (опыт).

Активность, %

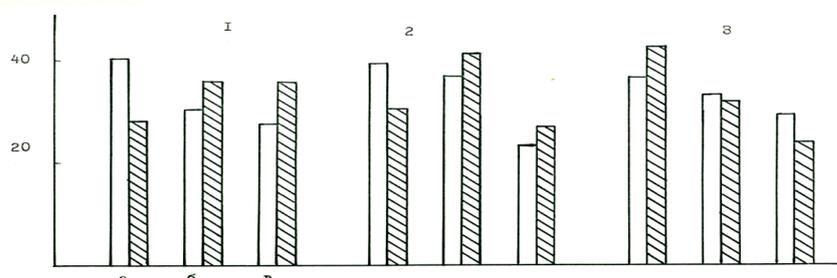


Рисунок 1 - Изменчивость в соотношении активности групп изопероксидаз листьев проростков пшеницы, различающихся по ИЭТ: 1 – Альбидум 114; 2 – Опаке-1; 3 – Богарная 56. Незаштрихованные столбики – до охлаждения, заштрихованные – после охлаждения проростков. Группы изопероксидаз: а – «кислые», б – «нейтральные», в – «щелочные». Суммарная активность изопероксидаз принята за 100%.

Ступенчатое охлаждение проростков вызвало повышение относительной активности «нейтральных» и «щелочных» пероксидаз в листьях более морозоустойчивых генотипов Альбидум 114 и Опакс-1, но снижение таковой у слабоморозостойкой Богарной 56. Противоположная тенденция наблюдалась для пероксидаз, ИЭТ которых расположены в «кислой» области спектра. В целом, ИЭТ пероксидаз изучаемых образцов были практически идентичны, но различались количественно, по активности индивидуальных форм.

Таблица

Влияние низкотемпературного стресса на изменчивость удельной активности изоферментов листьев проростков пшеницы, (пкат x мкг⁻¹ белка)

Генотип пшеницы	ИЭТ изоферментов													
	3.40	3.50	3.90	4.10	4.30	4.70	5.40	5.95	6.05	6.70	7.10	7.20	7.70	8.05
Альбидум 114	23.0	40.4	26.4	27.0	49.3	44.8	69.3	111.5	109.4	103.0	32.6	56.1	17.4	47.4
	24.0	48.7	60.7	40.7	38.0	33.9	53.3	46.5	57.2	134.0	57.9	163.9	19.1	112.2
Опакс-1	33.9	29.8	29.6	19.8	38.9	21.4	68.3	46.7	80.0	105.8	77.4	64.1	130.1	225.9
	38.2	30.6	40.8	48.5	96.7	43.3	20.5	34.0	53.7	149.5	36.6	171.5	36.3	149.7
Богарная 56	15.9	27.3	35.2	33.2	72.5	147.3	164.1	следы	354.9	71.9	110.7	129.5	48.9	310.7
	5.5	20.7	69.0	83.6	164.4	98.1	179.0	96.7	275.4	122.8	97.9	176.2	140.8	155.6

Примечание: Числитель – данные до охлаждения; знаменатель – данные после ступенчатого охлаждения проростков. Ошибка опыта не превышает 5%.

Данные по удельной активности отдельных изоферментов пероксидаз в норме и после низкотемпературного стресса представлены в таблице. Факт возрастания удельной активности после охлаждения, связанный со значительным ростом активности и белкового содержания у определенных изоферментов, можно объяснить усилением синтеза этих ферментов в условиях низкотемпературного стресса, т.е. количественными изменениями экспрессии существующих в норме белков [2,5,7]. Это, видимо, касается изоформ с ИЭТ 3.50 - Альбидум 114, с ИЭТ 3.90; 4.10; 5.95 - Богарной 56.

Качественная трансформация молекулы фермента на уровне изменений активного центра и его конформации, по всей вероятности, обуславливает увеличение удельной активности изоферментов в основном за счет возрастания ферментативной активности. В таком случае содержание белка практически не меняется, либо несколько увеличивается. К числу этих пероксидаз принадлежат изоферменты с ИЭТ 3.90; 7.20; 8.05 из листьев морозостойкого сорта Альбидум 114; с ИЭТ 3.90; 4.10; 4.70 среднеморозостойкого Опакс-I и с ИЭТ 4.30; 7.70 слабоморозостойкого сорта Богарная 56.

Рост содержания белка на фоне незначительных изменений активности отдельных изоферментов, возможно, определен синтезом энзимов с новым качеством, обладающих повышенной чувствительностью к низким температурам. Ингибирование пероксидазной активности низкими температурами в результате значительного снижения двух ее составляющих - активности и содержания белка, отмечен для изоферментов с ИЭТ 5.95 и 7.70 у Альбидум 114; с ИЭТ 5.95; 7.10; 7.70 у Опакс-I и с ИЭТ 3.40 и 7.10 у Богарной 56. Обнаружена также сортовая специфичность изоферментов по величинам удельной активности.

Результаты кластеризации представлены на рисунке 2. Дендрограммы «родства» пшениц по величинам общей и относительной активности изоферментов показали различия генотипов по морозоустойчивости. Первый кластер состоял из растений Альбидум 114 до и после действия стресса и опытного образца среднеморозостойкого Опакс-I (рис.2А). Кластеризация на основе относительной активности изоферментов выявила, что контрольные и опытные растения Альбидум 114 и Опакс-I образовали один кластер (рис.2Б). Данные кластеризации по белковому содержанию полос с пероксидазной активностью объединены на рисунке 2В. Один из кластеров включил генотипы пшеницы после охлаждения, которые обнаружили отличия по внутрикластерному расстоянию в порядке уменьшения морозостойкости: Альбидум 114, Опакс-I, Богарная 56. Кластеризация изоферментов по их удельной активности показала наиболее четкую дифференциацию между

устойчивыми и слабоморозостойкими сортами (рис.2Г). Первый кластер состоял из 2 субкластеров, группирующих попарно сначала опытные, а затем контрольные образцы Альбидум 114 и Опакс-1. Богарная 56 была наиболее удалена от них. Кластеризация исследованных генотипов пшеницы в зависимости от параметров анализа осуществлялась по-разному, причем имело место вычленение, в той или иной мере, образцов с повышенной или пониженной устойчивостью. Для наиболее полной оценки сходства-различия между генотипами в условиях низкотемпературного стресса, наряду с известными способами количественного анализа пероксидазного состава, целесообразно использовать методические подходы, позволяющие оценивать удельную активность каждой изоформы. Вышеприведенные данные могут быть свидетельством того, что количественные изменения, происходящие с изоформами пероксидазы при воздействии низких температур, связаны как с изменением скорости биосинтеза отдельных белков, так и с конформационными перестройками молекул фермента [3-6]. Обнаруженная при ИЭФ разнокачественность изоформ пероксидазы указывает на их возможную связь с адаптационными свойствами пшеницы и послужит основой для разработки методов физиолого-биохимической оценки селекционных образцов на морозоустойчивость.

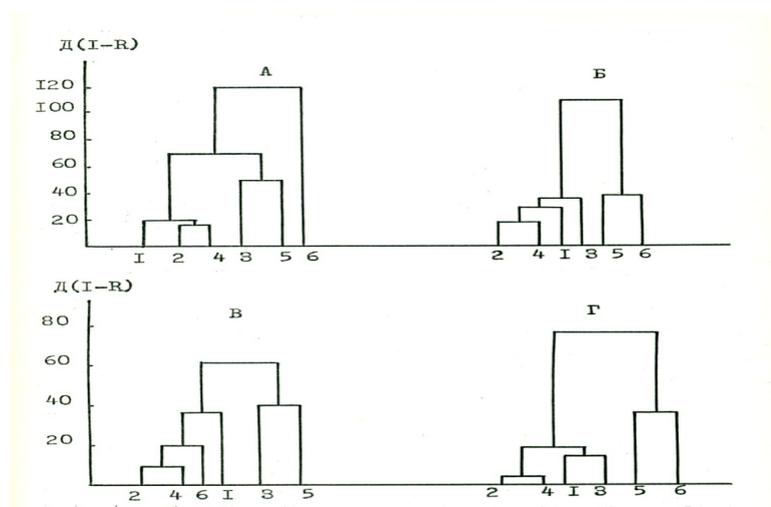


Рисунок 2 - Дендрогаммы «родства» генотипов пшеницы, построенные по ИЭТ пероксидаз листьев проростков:

1, 2 – Альбидум 114; 3-4 – Опакс-1; 5-6 – Богарная 56. Нечетные цифры – до охлаждения, четные – после охлаждения проростков. А – кластеризация по ферментативной активности, пкат; Б – кластеризация по активности изоформ пероксидазы, % от суммарной; В – кластеризация по белковому содержанию изоформ пероксидазы, мкг; Г – кластеризация по удельной активности, пкат \times мкг⁻¹, белка.

1. Cansev A., Gulen H., Eris A. The activities of catalase and peroxidase in olive (*Olea europaea* L.cv.Gemlik) under low temperature stress // *Horticulture, Environment and Biotechnology*, 2011.-V.52.-N2.-P.113-120.
2. Алексеев В.Г., Кершенгольц Б.М., Попов А.А. О характере изменений свойств пероксидазы при адаптации растений к экстремальным условиям Севера // *Физиология растений*, 1983. –Т.30.-Вып.6. –С.1094-1101.
3. Перуанский Ю.В., Савич И.М., Тажибаева Т.Л. Относительное содержание и аминокислотный состав изоформ пероксидазы листьев проростков пшеницы и кукурузы как критерий устойчивости к низкотемпературному стрессу // *Сельскохозяйственная биология*, 1991. –№1. – С.139-146.
4. Савич И.М., Тажибаева Т.Л., Перуанский Ю.В. Удельная активность изоформ пероксидазы проростков кукурузы и пшеницы в условиях температурного стресса// *Физиология и биохимия культурных растений*, 1988.-Т.20.-№2.-С.128-133.
5. Varga B., Janda T., Laszlo E., Veisz O. Influence of abiotic stresses on the antioxidant enzyme activity of cereals // *Acta Physiologiae Plantarum*, 2007.- V.29.-Sup.1.-P.105-129.
6. Lutz C. Cell physiology of plants growing in cold environments// *Protoplasma*, 2010.-V.244.-N 1-4.-P.53-73.
7. Курбидова А.С., Новокрещенова М.Г. Генетический контроль устойчивости растений к холоду // *Генетика*, 2011.-Т.47.-№6. – С.646-661.
8. Bosch A., Figueiras A.M., Gonzalez-Jaen M.T. e.a. Leaf peroxidases – a biochemical marker for the group 2 chromosomes in the *Triticinae* L.// *Genet. Res.*, 1986.-V.47.-#2.-P.103-107.
9. Merrill C.R., Goldman D., Sedman S.A., Ebert M.N. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins // *Science*.- 1981.-V.211.-N 4489.- P.1437-1438.
10. Liu E.H. A simple method for determining the relative activities of individual peroxidase isozymes in a tissue extracts// *Analytical Biochemistry*, 1973.-V.56.-N1.-P.149-154.
11. Перуанский Ю.В., Савич И.М., Тажибаева Т.Л. Способ определения активности изоформ пероксидазы/ Патент Республики Казахстан № 23496, 1999.

Төменгі температуралар әсері барысында бидайларды өсіруде изоэлектрикалық нүктелер бойынша ажырататын изопероксидаз активтілігінің өзгермелігі орнатылды. Жалпы, қатынасты және пероксидаздардың көптеген молекулярлы формаларының бөліну активтілігі, изоэлектрофокустан бөлінгендер бойынша бидайлар генотиптерінің арасындағы ұқсастық пен өзгешелік шаралары кластерлі сараптама көмегімен бағаланды

Wheat seedlings responded to low temperatures with specific activity changes in peroxidase isoenzymes differing in isoelectric points. With the use of cluster analysis, similarities and differences between the wheat genotypes were evaluated by total, relative and specific activity in multiple peroxidase forms separated by isoelectric focusing.

О.М. Цивилева¹, И.М. Учаева², А.Н. Панкратов³, Ю.Д. Маркович⁴, В.Е. Никитина¹
АКРИДОН-N-УКСУСНАЯ КИСЛОТА В ИСКУССТВЕННОЙ КУЛЬТУРЕ БАЗИДИОМИЦЕТА:
ПЕРВОНАЧАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НА ПРИМЕРЕ *Lentinula edodes*

(Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия¹,
Саратовский государственный технический университет им. Ю.А. Гагарина, Саратов, Россия²,
Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия³,
Юго-Западный государственный университет, Курск, Россия⁴)

Никаких сведений о влиянии соединений ряда акридона на какой-либо аспект жизнедеятельности высших грибов класса Basidiomycetes в литературе нами не обнаружено. Между тем исследование характера воздействия соединений названного ряда на разнообразные живые системы необходимо для выявления возможных неблагоприятных последствий их биологического проявления и определения экологической безопасности.

В последние годы XX века опубликован целый ряд инновационных исследований, результаты которых защищены патентами Российской Федерации, по выявлению высокой биологической активности соединений акридонового ряда [1-5]. Акридоны (или акридин-9(10H)-оны) - карбонилсодержащие гетероциклические соединения, молекулы которых обладают трициклической структурой, атомом азота в позиции 10, СО-группой у 9-го атома углерода. На основе этих веществ синтезированы эффективные противовирусные, антибактериальные, антигрибковые, иммуномодулирующие препараты [6, 7].

В пределах обширного класса природных алкалоидов с доказанной противоопухолевой активностью [8] достаточно разнообразна группа соединений ряда акридона, включающая и несколько соединений грибного происхождения (из низших грибов) [9]. Успешны попытки получения синтетических аналогов акридоновых алкалоидов, их химического синтеза [10].

Доступности природных источников сырья для получения вышеуказанных препаратов способствует широкая распространенность акридоновых алкалоидов в природе, в основном в составе растений - представителей ряда родов семейства Rutaceae [11]. Примерами соединений с высокой биологической активностью, выявленной относительно недавно, служат арборинин (1-гидрокси-2,3-диметокси-N-метилакридон), нормеликопицин (1-гидрокси-2,3,4-триметокси-N-метилакридон) [12]. Оба соединения проявляют *in vitro* антиплазмодальную активность против двух штаммов *Plasmodium falciparum* (IC₅₀ 4-15 мкм), а нормеликопицин также подавляет в значительной степени *in vivo* развитие *Plasmodium berghei* [12]. У арборинина, а также у растительного алкалоида с более простой структурой молекулы, 1-гидрокси-N-метилакридона, обнаружена достаточно высокая цитотоксичность по отношению к клеточной линии KB (раковая опухоль ротовой полости человека) [13]. Другие природные соединения, также являющиеся производными 1-гидроксиакридона, 1,8-дигидрокси-3-метоксиакридон и 1,7-дигидроксиакридон, выделенные из растений рода *Boronia*, проявляют умеренную ингибирующую активность в отношении роста патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* и *Salmonella typhi* [14].

Выявляются все новые представители группы природных соединений - акридоновых алкалоидов, биологическую активность которых еще только предстоит внедрить в практику. Так, В.В. Tsassi с коллегами в 2011 г. представил работу [15] по исследованию (масс-спектрометрия высокого разрешения, ИК, УФ, ЯМР) и характеристике структуры молекулы нового акридонового алкалоида цитропридона. 3,8-Дигидрокси-1-метокси-10-метилакридин-9(10H)-он получил название цитропридон по латинскому названию растения-производителя *Citropsis gabunensis*, из которого этот вторичный метаболит был выделен.

Оценку опасности ксенобиотиков для экосистем обычно проводят с помощью стандартного набора биологических тест-объектов. Метод биотестирования стандартизирован далеко не для всех