

11. Harley P.C., Thomas R.B., Reynolds J.F., Strain B.R. Modelling photosynthesis of cotton grown in elevated CO₂ // *Plant Cell and Environment*. – 1992. – 15. – P. 271–282.
12. Von Caemmerer S., Farquhar G.D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange rates of leaves // *Planta*. – 1981. – 153. – P. 376–387.
13. Stemler A.B.L., Harlan J.R., J. M. J. de Wet. The Sorghums of Ethiopia // *Economic Botany*. – 1977. – 31. – P. 446–460.
14. Badger M.R., Price G.D. The Role of Carbonic Anhydrase in Photosynthesis // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1994. – 45. – P. 369–392.
15. Meyer M., Griffiths H. Origins and diversity of eukaryotic CO₂-concentrating mechanisms: lessons for the future // *J. Exp. Bot.* – 2013. – 64, N 3. – P. 769–786.

KOSOBRYUKHOV A.A., KRESLAVSKI V.D., SHIRSHIKOVA G.N.

Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,

Russia, 142290, Pushchino, Moscow region, Institutskaya str., 2, e-mail kosobr@rambler.ru

ROLE OF PHYTOCHROM B IN REGULATION OF METABOLIC REACTION OF WILD TYPE AND MUTANT *hy2* ARABIDOPSIS PHOTOSYNTHETIC APPARATUS

Aims. To improve understanding of the roles of phytochrom B in the regulation of metabolic reactions of photosynthetic apparatus of *Arabidopsis thaliana* wild type and mutant *hy2* upon treatment of UV-B radiation. **Methods.** The activity of photosynthesis apparatus was measured by LCPro+ Portable Photosynthetic System. The rate of different stages carboxylation reaction were estimated according Farquhar model. **Results.** *Arabidopsis thaliana* wild type showed higher resistance to UV-A radiation compared with *hy2* mutant. **Conclusions.** The formation of mechanisms of higher resistance to UV-A is due to active participation of PhyB form.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, UV-A tolerance, net photosynthetic rate, carboxylation rate, maximum electron transport rate, TPU utilization.

УДК 57.085.23

ЛЁШИНА Л.Г.¹, БУЛКО О.В.¹, РОГАЛЬСКИЙ С.П.¹, ТАРАСЮК О.П.¹, ЕГОРОВ О.А.²

¹ *Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины,*

Украина, 02160, г. Киев, Харьковское ш., 50, e-mail: llioshina@ukr.net

² *Химическая компания «СПОЛУКА»,*

Украина, 02660, г. Киев, ул. Мурманская, 5, e-mail: oleg.iegorov@gmail.com

ВЛИЯНИЕ КЛАТРАТНЫХ КОМПЛЕКСОВ β-ЦИКЛОДЕКСТРИНА С РЕГУЛЯТОРАМИ РОСТА НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ БАРВИНКА МАЛОГО *VINCA MINOR L.*

Циклодекстрины (ЦД) – это циклические олигосахариды, внутренняя гидрофобная полость которых способна образовывать комплексы включения (клатраты) с другими молекулами органической и неорганической природы, изменяя свойства последних. Так, нерастворимые в воде вещества приобретают большую растворимость, становятся стабильными в процессах окисления и гидролиза, меняют вкус, цвет и запах, уменьшают токсичность, приобретают свойство пролонгированного выделения в среду [1].

Также опубликовано ряд работ по влиянию клатратных комплексов циклодекстринов с регуляторами роста (РР) на рост и развитие растений и культур клеток.

Соединение α-циклодекстрина с производными циклопропена (ингибитора дозревания и старения плодов) показало снижение уровня этилена в плодах яблони и повышение ее урожайности [2]. Создание комплекса β-циклодекстрина с 6-бензиламинопурином (БАП) позволило в 4 раза повысить растворимость РР [3]. Добавление в среду α и β-циклодекстринов с 3 мг/л нафтилукусной кислоты в три раза ускорило укоренение и в два раза увеличивало количество дифференцированных корней у артишока [4]. Совместное использование ЦД и метилжасмоната, при коротком воздействии УФ, повлияло на внеклеточное накопление аймалицина в суспензионной культуре барвинка розового *C. roseus*. Установлено, что ЦД не

только индуцировал биосинтез аймалицина, но и способствовал формированию аддукта, что удаляет аймалицин из среды, уменьшает ретроингибирование и деградацию аймалицина и позволяет накапливать его в культуральной среде [5]. Добавление химически модифицированных гептакис(2,6-ди-О-метил)- β -циклодекстрина и 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина в культуральную среду супензионной культуры *Artemisia annua* в 300 раз увеличило выход артемизина [6]. Создан водорастворимый комплекс 24-эпибрассинолида с циклодекстрином, что позволяет повысить его биодоступность при создании пестицидных препаратов [7].

Целью нашей работы было исследование влияния комплексов циклодекстринов с традиционными регуляторами роста на морфофизиологические и биохимические характеристики барвинка малого в культуре *in vitro*.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили полученные нами ранее *in vitro* растения и каллусная культура барвинка малого [8]. Для получения комплексов включения регуляторов роста с β -циклодекстрином их эквимольные смеси перемешивали в 50 %-м водном этаноле в течение 12 часов, после чего растворитель упаривали, а сухой остаток сушили при 130°C в течение 24 часов. Растения и каллус культивировали на среде МС [9] с добавлением комплексов ЦД с бензиламинопурином (6-БАП); 2,4-дихлорфеноксисукусной кислотой (2,4-Д); гиббереллиновой кислотой (ГК₃) в концентрации 1 мг/л. Для сравнения использовали растения, выращенные на средах с добавлением регуляторов роста (без циклодекстрина) в такой же концентрации и растения, полученные на безгормональной среде. Условия инкубации для растений *in vitro*: световой блок, температура 24 ± 2 °С, 16-часовой фотопериод, интенсивность освещения 1600-2000 люкс; для каллуса – темное термостатирование при температуре 26 ± 1 °С.

Вторичные метаболиты определяли в кислотных экстрактах методом ВЭЖХ на хроматографе фирмы «Agilent» (США) с последующей компьютерной обработкой результатов исследования. Разделяющая колонка Rapid Resolution HT Cartige 4.6x30mm, 1.8-Micron, Zorbx SB-C18, подвижная фаза - ацетонитрил: метанол: вода (4:4:5), скорость движения – 3 мл/мин. Детектирование проводилось при длине волны 215 нм.

Хроматограмму оценивали по времени удержания и площади пика в автоматическом режиме. В качестве эталона использовали фармацевтический винкамин.

Результаты обработаны статистически по Лакину [10], компьютерная обработка данных проведена с помощью программы Excel, стандартного пакета программ Microsoft Office XP (Microsoft, США). В таблицах и на рисунках представлены среднеарифметические значения показателей и их стандартные ошибки.

Результаты и обсуждения

Для изучения действия комплексов мы испытывали их в концентрации, рекомендованной для изучения фитогормональной активности (1мг/л). Для сравнения использовали растения *in vitro* барвинка малого и его культуру клеток, выращенные на средах, содержащих гормоны в такой же концентрации.

Выращивание растений на средах МС и на МС + ЦД показало различие их морфологических показателей. Длина корней под влиянием ЦД несколько увеличивалась, тогда как их количество становилось меньше. При этом длина стебля была больше, чем в контроле. Для опыта были выбраны варианты сред, содержащих следующие комплексы: ЦД + 2,4-Д (1 мг/л); ЦД + БАП (1 мг/л); ЦД + ГК₃ (1 мг/л). В качестве контроля использованы среды с теми же гормонами, но без ЦД. Через 3 месяца были получены следующие результаты (табл.):

– у растений на среде, содержащей комплекс ЦД + 2,4-Д (1 мг/л), в отличие от растений, выращенных на среде с 2,4-Д (1мг/л), наблюдалось появление воздушных корней, средняя длина основных корней была 1,1 см. Причем на гормоне корни оставались в зачаточном состоянии.

– растения, полученные на комплексе ЦД + БАП (1 мг/л), показали усиленное ветвление (1:4) и образование утолщенного корня (средняя длина – 2,3 см). В контроле один побег делился на два, либо оставался один.

– в опыте с третьим комплексом ЦД + ГК₃ (1 мг/л) растения вытягивались за счет растяжения междоузлий (2,5 см в отличие от контрольных 2,1 см). Высота и длина корней опытного растения была в два раза больше контрольного и количество корней превышало все остальные варианты.

Влияние чистого ЦД на растение невелико и противоречиво.

Таблица. Морфологические показатели растений *V. minor*, выращенных на средах с регуляторами роста и их комплексами с циклодекстрином

Рост-регулятор / <i>V. minor</i>	Сухая масса, мг	Корень		Стебель		
		длина, см	количество, ед.	длина, см	ветвление, ед.	междоузлия, см
К	5,6±1,0	1,5±0,3	2,7±0,5	5,6±0,2	0,2±0,01	2,0±0,1
ЦД+К	7,0±0,8	1,8±0,6	2,0±0,1	4,6±0,1	-	1,8±0,1
2,4-Д	10,5±0,9	0,3±0,1	2,7±0,2	9,7±0,3	-	2,0±0,3
ЦД+2,4-Д	9,4±0,5	1,1±0,3	2,2±0,3	7,3±0,4	0,6±0,09	2,0±0,2
БАП	12,6±0,7	0,8±0,1	1,3±0,2	4,0±0,4	2,3±0,05	1,7±0,3
ЦД+БАП	19,6±1,0	2,3±0,5	0,7±0,1	5,6±0,5	3,4±0,02	2,0±0,4
ГК ₃	10,8±0,8	1,4±0,2	4,0±0,3	5,0±0,4	1,0±0,01	2,1±0,1
ЦД+ГК ₃	20,1±0,6	2,8±0,1	3,5±0,2	11,0±0,3	-	2,5±0,2

Наблюдается небольшое увеличение массы и увеличение длины корня, но длина стебля уменьшается по сравнению с контролем. Количество корней уменьшается и укорачивается междоузлие. Практически такая же картина в случае добавления 2,4-Д. В чистом виде этот гормон укорачивает корень и удлиняет стебель, но не влияет на количество образовавшихся корней (2,7 см, как у контроля) и ингибирует их рост в длину. Масса растений, выращенных на среде с комплексом ЦД-2,4Д практически равна массе растения на 2,4 Д, наблюдается удлинение корня (1,1 см по сравнению с 0,3) и стебля, который больше, чем у растений на безгормональной среде. БАП вызывает укорочение корней (0,8 см в сравнении с К), ЦД-БАП стимулирует удлинение корней. БАП в чистом виде вызывает усиленное ветвление. Комплекс ЦД-БАП еще больше увеличивают этот показатель (3,4 см по сравнению с 2,3). ГК₃ в чистом виде умножает корни. Соединение же этого гормона с ЦД стимулирует удлинение корней и увеличение стебля в длину. Наибольшая масса у растений на среде с добавлением комплекса ЦД-ГК₃.

Комплексы гормонов, добавленные в среду для культивирования каллуса, не оказали заметного влияния на культуру *V. minor*. Однако в следующем пассаже, при переносе клеточных линий на среду для субкультивирования без добавления комплексов, наблюдалось увеличение массы каллусных клеток барвинка в 1,64 раза.

Показательно то, что во всех случаях введение в циклодекстрины регуляторов роста изменило свойства последних, усилив их действие на морфологические показатели растений. Нагляднее всего это проявилось при соединении ЦД с ГК₃.

Далее нами был проведен ВЭЖХ-анализ растений на содержание в них основного

алкалоида барвинка – винкамина. Результаты показали, что добавление в среду культивирования исследуемых гормонов в концентрации 1 мг/мл уменьшает биосинтез вторичных метаболитов в растениях по сравнению с контролем (растениями, выращенными на среде без гормонов) (рис.).

Содержание в среде свободного циклодекстрина привело к снижению синтезируемого вещества на 7%. Вопреки ожиданиям, добавление в среду комплексов РРР с ЦД показало результаты, обратные морфологическим показателям. Так, если в случае комплекса ЦД с 2,4-Д масса растений, выращенных на комплексах, была несколько ниже полученных на чистом 2,4 Д, то количество винкамина в этих растениях было наибольшим – на 47% выше, чем у растений на 2,4-Д. Комплекс ЦД с БАП увеличил содержание винкамина на 29% по отношению к чистому БАП. В растениях, выращенных на среде с добавлением комплекса ЦД-ГК₃, показавших самые результативные морфологические изменения, вопреки ожиданиям, количество винкамина практически не изменилось.

Выводы

Полученные результаты свидетельствуют о том, что циклодекстрины существенно изменяют свойства соединенных с ними гормонов, вызывая и морфологические, и биохимические изменения у растений в результате введения в гидрофобную полость циклодекстрина регулятора роста, при этом уменьшается токсичность последнего, а выход неизменного активного вещества в среду происходит по мере использования его растением, что пролонгирует рострегулирующее действие гормона и улучшает рост и развитие растительного организма.

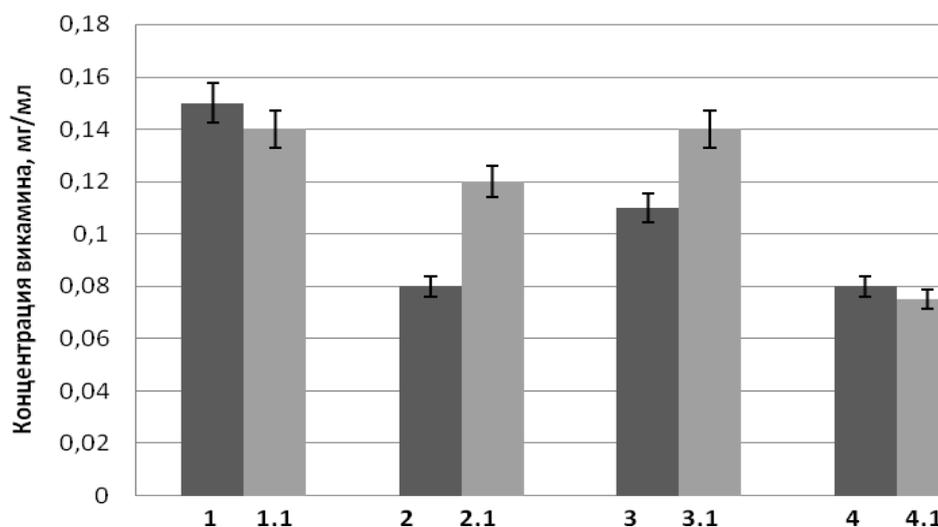


Рис. Концентрация винкамина в растениях *V. minor* L., культивированных на средах: 1 – МС; 1.1 – МС+ЦД; 2 – МС+2,4-Д; 2.1 – МС+2,4-Д+ЦД; 3 – МС+БАП; 3.1 – МС+БАП+ ЦД; 4 – МС+ГК₃; 4.1 – МС+ ГК₃+ЦД

Литература

- Davis M.E., Brewster M.E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future // Nat. Rev. Drug. Discov. – 2004. – 3, N 12. – P. 1023–1035.
- Голубев А.В. Регулятор роста растений и плодов. Патент РФ № 2491815 от 10.09.2013. Бюл. № 25.
- Xia Ge, Jiang He, Ying Yang, Fengming Qi, Zheng Huang, Ruihua Lu, Lizhen Huang, Xiaojun Yao Study on inclusion complexation between plant growth regulator 6-benzylaminopurine and β -cyclodextrin: Preparation, characterization and molecular modeling // Journal of Molecular Structure. – 2011. – 994, N 1–3. – P. 163–169.
- Brutti C., Apystolo N.M., Ferrarotti S.A., Llorente B.E., Krymkiewicz N. Micropropagation of *Cynara scolymus* L. employing cyclodextrins to promote rhizogenesis // Scientia Horticulturae. – 2000. – 83, N1. – P. 1–10.
- Almagro L., Lopez Perez A.J., Pedreno M.A. New method to enhance ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell cultures based on the use of cyclodextrins // Biotechnology Letters. – 2010. – 33, N 2. – P. 381–385.
- Durante M., Caretto S., Quarta A., De Paolis A., Nisi R., Mita G. β -Cyclodextrins enhance artemisinin production in *Artemisia annua* suspension cell cultures // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2011. – 90, N 6. – P. 1905–1913.
- Рукач Н.Н., Киселев П.А., Жабинский В.Н., Хрипач В.А. Получение и характеристика комплексов включения 24-эпибрассинолида (стимулятора роста растений) с циклодекстринами // Сборник материалов VII Международной конференции Radostim 2011 «Фитогормоны, гуминовые вещества и другие биорациональные пестициды в сельском хозяйстве», 2–4 ноября 2011 г. – Минск: [б. и.], 2011. – С. 148–149.
- Льошина Л.Г., Булко О.В., Галкин А.П. Отримання і характеристика калушої і суспензійної культури барвінка малого *Vinca minor* L. // Збірник наукових праць «Фактори експериментальної еволюції організмів». – К.: Логос, 2009. – 7. – С. 161–166.
- Murashige I., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plantarum. – 1962. – 15, N 3. – P. 473–497.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.

LIOSHINA L.G.¹, BULKO O.V.¹, ROGALSKYY S.P.¹, TARASYUK O.P.¹, IEGOROV O.A.²

¹*Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry NAS of Ukraine, Ukraine, 02160, Kyiv, Kharkivske hwy, 50, e-mail: llioshina@mail.ru*

²*Chemical company “Spoluka”,*

Ukraine, Kiev, Murmanskaja str., 5, e-mail: oleg.iegorov@gmail.com

THE INFLUENCE OF CLATHRATE COMPLEX OF β -CYCLODEXTRIN WITH ROWTH REGULATORS ON MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF PERIWINKLE *VINCA MINOR* L.

Aims. Study of the influence of clathrate complex of β -cyclodextrin with traditional growth regulators on morphological and biochemical parameters of periwinkle in the culture *in vitro* **Methods.** Insertion of growth

regulators into β -cyclodextrin. *In vitro* cultivation. HPLC-analysis of secondary metabolites. **Results.** Periwinkle was cultivated in MC medium with addition of the complexes of plant growth regulators (2.4-D; BA; GA) with β -cyclodextrin. For comparison the plants were grown in the medium without β -cyclodextrin. It has been established that the insertion of β -cyclodextrin complexes with growth regulators stimulated plant growth by increasing the mass, lengthening of the stem and roots, increase of branching and rooting, as well as caused intensification of the biosynthesis of vincamine indole alkaloid. Moreover, the obtained complexes showed prolonged action on the culture of periwinkle callus cells. **Conclusions.** The complexes of growth regulators with β -cyclodextrin considerably change the properties of hormones, causing both morphological and biochemical changes of plants.

Key words: *Vinca minor* L., cyclodextrin complexes, plant growth regulator.

УДК 577.1+576.5:591. 111.1

ЛИХАЧЕВА Л.И., ШПИЛЕВАЯ С.П., РУБАН Т.А., ГУЛЬКО Т.П., КОРДИУМ В.А.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,

Украина, 03143, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: kordium@imbg.org.ua

КЛЕТочНАЯ ЭКСТРУЗИЯ ДНК ЛЕЙКОЦИТАМИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Представления о наследственном материале клетки – ДНК непрерывно меняются. Вначале считалось, что геном почти полностью стабильный материал, который менять могут только мутации, и в норме его пребывание только внутриядерное. Позже, на основании многочисленных данных сформировалось представление о горизонтальном переносе генетической информации и была выдвинута концепция «нестабильности генома» [1]. Сегодня геном рассматривают уже как особую структуру, которой свойственна одновременно высочайшая консервативность, обеспечивающая наследственность, и столь же высокая подвижность. В литературе описаны различные варианты перемещения ядерного материала как внутри клетки, так и его за ее пределы. К наиболее часто наблюдаемым относится, например, формирование микроядер – одного или многих – что может происходить как в результате отщепления их ядром, так и вследствие нарушения митотического деления, когда вокруг не включенных во вновь сформированные ядра отдельных хромосом обособляется цитоплазма и формируется оболочка. Микроядра клеток при этом могут либо оставаться внутри клетки, либо покидать ее пределы. Все эти варианты поведения ядер наблюдались нами в культуре *in vitro* [2]. Проводимые нами в настоящее время исследования, связанные с использованием клеток белой крови в качестве одного из компонентов взаимодействующей системы для изучения переноса генетической информации, позволили наблюдать новые картины поведения

хроматина, характерные для их ядер.

В 2004 году было обнаружено, что нейтрофилы (гранулярные лейкоциты) могут формировать особые внеклеточные тяжи, состоящие из ДНК и белков, так называемые NETs (Neutrophil Extracellular Traps), с помощью которых эти гранулоциты захватывают и поражают различные бактерии [3]. Основными структурными компонентами NETs являются ДНК, гистоны (H1, H2A, H2B, H3 и H4) и гранулярные белки. Дальнейшие исследования показали, что такой способностью к катапультированию ДНК обладают также эозинофилы [4]. За годы, прошедшие с момента открытия феномена NETs, появилось много работ, подтверждающих и дополняющих первые результаты. Оказалось, что способностью к выбросу ДНК за пределы клетки обладают лейкоциты разных организмов [5, 6], а также, что не только бактерии, но и многие другие патогенные организмы стимулируют образование таких ДНК-овых ловушек и погибают от их действия [7]. Другие исследования показали, что гранулярные лейкоциты, в ответ на инфекцию, могут выбрасывать как ядерную, так и митохондриальную ДНК [8]. При этом выброс ядерной ДНК приводит к гибели клетки, в то время как при катапультировании митохондриальной ДНК клетки остаются живыми. Кроме того, образование NETs может быть спонтанным, без стимуляции, и происходить при стрессах, аутоиммунных и других патологиях [9–12].

Все это указывает на общебиологическое