

morphogenetic abilities and in tissues of transformed plant were investigated. **Methods.** *Agrobacterium*-mediated transformation with LBA 4404 strain with pBi2E suppressor proline dehydrogenase gene was created. The sunflower transformants were regenerated. The free proline contents were estimated in different tissues of normal and transformed plants. **Results.** The levels of free proline raise in tissues with high totipotency (initial explants and regenerants at the early stages of morphogenesis). The proline contents in transformed plants exceeded those parameters of controls during whole cultivation *in vitro*.

Key words: sunflower, *Agrobacterium*-mediated transformation, morphogenesis, proline.

УДК 581.132

КОСОБРЮХОВ А.А., КРЕСЛАВСКИЙ В.Д., ШИРШИКОВА Г.Н.

Институт фундаментальных проблем биологии РАН,

Россия, 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, 2, e-mail: kosobr@rambler.ru

РОЛЬ ФИТОХРОМА В РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА АРАБИДОПСИСА ДИКОГО ТИПА И МУТАНТА *hy2*

Система регуляторных фоторецепторов, в число которых входят фитохромы, играет важную роль в процессах роста и фотоморфогенеза растений, и их роль в этих процессах во многом изучена [1, 2], в частности действие фитохрома В (ФхВ) [3, 4]. Однако о его роли как регулятора метаболизма и, в частности, о взаимосвязи активности отдельных звеньев фотосинтетического аппарата с состоянием ФхВ и его содержанием известно мало. Ранее нами показано, что существует связь между состоянием фитохромной системы и устойчивостью фотосинтеза к действию стрессоров различной природы. Повышение содержания активной формы фитохрома В путем облучения растений после темнового периода импульсом красного света $\lambda = 660$ или 625 нм приводило к увеличению стресс-устойчивости фотосистемы 2 (ФС 2) растений шпината, салата к УФ-В а также к УФ-А радиации [5, 6]. Однако механизм стресс-защитного действия активной формы фитохрома остается мало изученными и для исследований такого рода в настоящее время используют растения с недостатком или с избытком отдельных типов фитохрома, в частности, трансгенные растения арабидопсиса, огурца, картофеля [7, 8].

В задачу данной работы входило исследование роли фитохрома В в регуляции метаболических реакций фотосинтетического аппарата при облучении растений УФ-А радиацией.

Материалы и методы

Объектами служили растения арабидопсиса дикого типа (ДТ) и мутант *hy2*.

Мутант по гену *HY2* относится к группе НУ-мутантов *Arabidopsis thaliana*, имеющих удлинённый гипокотиль. Ген *HY2* кодирует фермент фитохромобилин-синтазу (ФХБ-синтазу), ферредоксин-зависимую биливердинредуктазу. В результате мутант дефицитен по ФхВ.

Для облучения растений УФ-А использовали лампу Т8 18W BLB (Selecta) с основным диапазоном излучения в области длин волн 300–400 нм и с максимумом 365 нм. Интенсивность УФ-облучения на уровне листьев была 12 Вт м^{-2} , время облучения 2 ч. Газообмен CO_2 измеряли с помощью инфракрасного газоанализатора LCP⁺ фирмы ADC BioScientific Ltd., соединенного с листовой камерой площадью $6,25 \text{ см}^2$. Для построения углекислотных кривых с помощью микропроцессора газоанализатора устанавливали концентрацию углекислоты в воздухе от 0 до $1600 \text{ мкмоль CO}_2 \text{ моль}^{-1}$. Анализ углекислотной кривой CO_2 -газообмена проводили по модели Фаркьюхара [9] в модификации [10–12].

Результаты и обсуждение

Облучение растений арабидопсиса УФ-А в течение 2 ч. приводило к снижению скорости фотосинтеза в течение нескольких часов в последствии фактора. Вместе с тем, растения дикого типа и мутант по разному реагировали на стрессовое воздействие. Снижение скорости процесса у растений дикого типа составляло около 27 % от начальных значений (табл. 1). В большей степени влияние УФ-А проявлялось на мутанте и снижение скорости фотосинтеза составляло до 67 %.

С целью выяснения активности отдельных звеньев работы фотосинтетического аппарата – реакции карбоксилирования при действии стрессового фактора на растения дикого типа и мутанта, дефицитного по фитохрому В был проведен анализ углекислотных кривых, полученных до и после облучения растений УФ-А (табл. 2).

В условиях не лимитирующих фотосинтез по CO_2 (при повышенной концентрации углекислоты) скорости газообмена у растений дикого типа и мутанта не различались до и после облучения их УФ-А. Для дикого типа наблюдаемая реакция могла быть связана с отсутствием действия стрессового фактора на активность РБФК/О, эффективность карбоксилирования, скорость электронного транспорта и утилизации триозофосфатов. У растений мутанта наблюдалось снижение эффективности карбоксилирования, скорости электронного транспорта и утилизации триозофосфатов, однако изменения скорости фотосинтеза не происходило. Отсутствие эффекта у мутанта могло быть связано с кратковременностью действия повышенной концентрации CO_2 на растения. В этом случае снижение эффективности карбоксилирования, т. е. увеличение сопротивления потоку CO_2 внутрь листа не успевает сказаться на скорости газообмена, поскольку активность фермента остается высокой. В этом случае нехватки углекислого газа на протяжении короткого периода времени, по-видимому, нет. Объяснением этому могут служить данные работы [13], в которой показано, что

тилакоидные мембраны содержат некоторое количество (до 1 мкмоль $\text{HCO}_3^-/\text{мг}$ Хл) связанного бикарбоната, который под действием карбоангидразы может высвобождать свободный CO_2 вблизи центров карбоксилирования РБФК/О. Предположение о возможной концентрирующей роли рКА, сложившееся на основании исследований ее роли у водорослей [14], высказывалось рядом исследователей и в отношении высших растений [15].

Вместе с тем у мутанта *hy2*, по видимому, наблюдаются изменения на уровне первичных процессов фотосинтеза, что сказывается на снижении скорости электронного транспорта. Отсюда снижение скорости фотосинтеза при естественной концентрации углекислоты, в последствии УФ-А облучения, вполне оправдано, поскольку уменьшение скорости переноса электронов, приводит к соответствующему изменению синтеза АТФ и НАДФН, используемых в цикле Кальвина.

Выводы

На основании полученных данных мы предполагаем, что в формировании механизмов повышенной устойчивости фотосинтетического аппарата *Arabidopsis* к УФ-А излучению участвует активная форма фитохрома. Наряду с изменениями на уровне антиоксидантной системы растений, индукции транскрипционной активности генов некоторых факторов транскрипции и антиоксидантных ферментов [7], происходят изменения ряда метаболических реакций, определяющих ответ растений на действие стрессовых факторов.

Таблица 1. Скорость фотосинтеза Арабидопсиса дикого типа и мутанта *hy2*, выращиваемых при облученности $160 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2}\text{с}^{-1}$, температуре $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Растения облучали УФ-А в течение 2 часов. Измерение скорости фотосинтеза проводили при интенсивности света $1000 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2}\text{с}^{-1}$ и естественной концентрации углекислоты

Вариант	Дикий тип, скорость фотосинтеза, $\text{мкмоль CO}_2 \text{ м}^{-2}\text{с}^{-1}$	Дикий тип, скорость фотосинтеза, % к контролю	<i>Hy 2</i> , скорость фотосинтеза $\text{мкмоль CO}_2 \text{ м}^{-2}\text{с}^{-1}$	<i>Hy 2</i> , скорость фотосинтеза, % к контролю
До облучения	$4,8 \pm 0,3$	100	$9,5 \pm 0,5$	100
Сразу после облучения	$4,0 \pm 0,2$	83,3	$7,2 \pm 0,4$	75,8
1 час после облучения	$3,8 \pm 0,1$	79,2	$4,0 \pm 0,3$	42,1
2 часа после облучения	$3,6 \pm 0,1$	75,0	$3,3 \pm 0,3$	34,7
3 часа после облучения	$3,5 \pm 0,1$	72,9	$3,1 \pm 0,2$	32,6

Таблица. 2. Параметры аппроксимации углекислотных кривых фотосинтеза листьев арабидопсиса дикого типа и мутанта *hy2*, выращиваемых при облученности 160 мкмоль фотонов м²с⁻¹, температуре 20 °С после облучения растений УФ-А в течение 2 часов, рассчитанные с помощью модели Фаркьюхара

Параметры	Вариант облучения UV- А			
	Дикий тип, скорость фотосинтеза, мкмоль СО ₂ м ⁻² с ⁻¹ (до облучения)	Дикий тип, скорость фотосинтеза, мкмоль СО ₂ м ⁻² с ⁻¹ (3 часа после облучения)	<i>Hy 2</i> , скорость фотосинтеза мкмоль СО ₂ м ⁻² с ⁻¹ (до облучения)	<i>Hy 2</i> , скорость фотосинтеза, мкмоль СО ₂ м ⁻² с ⁻¹ (3 часа после облучения)
Максимальная скорость поглощения СО ₂ , мкмоль СО ₂ м ⁻² с ⁻¹	9,8 ± 0,8	9,3 ± 1,4	20,18 ± 1,9	19,828 ± 5,9
Скорость темнового выделения СО ₂ мкмоль СО ₂ м ⁻² с ⁻¹	-0,57 ± 0,12	-0,50 ± 0,14	-1,45 ± 0,32	-1,08 ± 0,36
Максимальная скорость карбоксилирования РБФ, мкмоль м ⁻² с ⁻¹	13,08 ± 1,6	13,88 ± 0,4	19,18 ± 1,2	17,41 ± 1,6
Эффективность карбоксилирования, мкмоль СО ₂ м ⁻² с ⁻¹ Па ⁻¹	0,12 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,20 ± 0,03	0,14 ± 0,02
Скорость электронного транспорта при световом насыщении, мкмоль м ⁻² с ⁻¹	25,28 ± 3,2	21,88 ± 1,2	56,18 ± 3,4	33,38 ± 2,5
Скорость утилизации триозофосфатов, мкмоль м ⁻² с ⁻¹	3,43 ± 0,23	3,17 ± 0,17	3,99 ± 0,19	2,96 ± 0,13

Литература

1. Гродзинский Д.М. Биофизические механизмы фитохромной системы. В кн. Фоторегуляция метаболизма и морфогенеза растений. – М.: Наука, 1975. – С. 66–81.
2. Тохвер А.К. Фитохром, его основные формы и их свойства. В кн. Фоторегуляция метаболизма и морфогенеза растений. – М.: Наука, 1975. – С. 56–65.
3. Синещков А.В. Система фитохромов: фотобиофизика и фотобиохимия *in vivo* // Биологические мембраны. – 1998. – 15. – С. 549–572.
4. Синещков В.А., Синещков А.В. Флуоресценция фмирхрома в клетках этиолированных проростков гороха // Биофизика. – 1987. – 32. – С. 110–115.
5. Kreslavski V.D., Ivanov A.A., Kosobryukhov A.A. Low energy light in the 620–660 nm range reduces the UV-B-induced damage to photosystem II in spinach leaves // Biophysics. – 2004 – 49. – P. 767–771.
6. Vladimir D. Kreslavski, Valery Yu. Lyubimov, Galina N. Shirshikova, Alexander N. Shmarev, Anatoly A. Kosobryukhov, Franz-Josef Schmitt, Thomas Friedrich, Suleyman I. Allakhverdiev. Preillumination of lettuce seedlings with red light enhances the resistance of photosynthetic apparatus to UV-A. // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2013 – 122. – P. 1–6.
7. Vladimir D. Kreslavski, Galina N. Shirshikova, Valery Yu. Lyubimov, Alexander N. Shmarev, Akexander Boutanaev, Anatoly A. Kosobryukhov, Franz-Josef Schmitt, Thomas Friedrich, Suleyman I. Allakhverdiev. Effect of pre-illumination with red light on photosynthetic parameters and oxidant-/ antioxidant balance in *Arabidopsis thaliana* in response to UV-A // J. of Photochem. and Photobiol. B: Biology. – 2013 – 127. – P. 229–236.
8. Сысоева М.И., Марковская Е.Ф., Шерудило Е.Г. Роль фитохрома В в холодовом закаливании и раззакаливании растений огурца на свету и в темноте // Физиология растений. – 2013. – 60, № 3. – С. 393–398.
9. Farquhar G.D., von Caemmerer S., Berry J.A. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ plants // Planta. – 1980. – 149, N 1. – P. 78–90.
10. Harley P.C., Sharkey T.D. An improved model of C₃ photosynthesis at high CO₂: Reserved O₂ sensitivity explained by lack of glycerate re-entry into the chloroplast // Photosynthesis Research. – 1991. – 27. – P. 169–178.

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