

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Благовещенский государственный
педагогический университет»
(ФГБОУ ВО «БГПУ»)

На правах рукописи

Кузнецова Виктория Александровна

**ФОРМИРОВАНИЕ АДАПТИВНЫХ РЕАКЦИЙ ДИКОЙ И
КУЛЬТУРНОЙ СОИ К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ ПОД
ВОЗДЕЙСТВИЕМ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ФАКТОРОВ В УСЛОВИЯХ
АМУРСКОЙ ОБЛАСТИ**

Специальность 03.02.08 – экология (биологические науки)

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
член-корреспондент РАО,
профессор РАН,
доктор биологических наук
Голохваст Кирилл Сергеевич

Петропавловск-Камчатский 2020

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Глава 1. ОБЗОР СОСТОЯНИЯ ИЗУЧЕННОСТИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА	9
1.1. Окислительный стресс и его влияние на растения	9
1.2. Защитные реакции растений при стрессе. Антиоксидантная система	24
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	41
2.1. Материал исследования	41
2.2. Методы исследования	42
Глава 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕМПЕРАТУРНОГО ВЛИЯНИЯ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПЕРОКСИДАЗ КУЛЬТУРНОЙ И ДИКОЙ СОИ.....	48
3.1. Физико-химические свойства пероксидаз семян культурной и дикой сои.....	48
3.2. Характеристика устойчивости семян культурной и дикой сои к воздействию температур с участием пероксидаз	52
3.3. Оценка устойчивости проростков сои к температурному стрессу в течение 5 суток с участием пероксидаз, изофлавонов и ДГК.....	55
Глава 4. ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ СОИ К ВОЗДЕЙСТВИЮ СОЛЕЙ ТМ С УЧАСТИЕМ ПЕРОКСИДАЗ, ИЗОФЛАВОНОВ И ДГК	63
4.1. Оценка устойчивости сои к влиянию солей ТМ на разных стадиях онтогенеза с участием пероксидаз и ДГК.....	63
4.2. Влияние солей ТМ на удельную активность и множественные формы пероксидаз культурной и дикой сои на разных стадиях онтогенеза	64
4.3. Определение устойчивости семян сои к воздействию солей ТМ в течение 5 часов с участием пероксидаз и ДГК	69
4.4. Формирование устойчивости проростков сои к окислительному стрессу, вызванному воздействием солей ТМ в течение 5 суток, с участием пероксидаз, изофлавонов и ДГК.....	73
4.5. Оценка влияния ДГК, АГ и их комплексов на активность пероксидаз и содержание изофлавонов в семенах сои.....	82
ГЛАВА 5. Встречаемость и характеристика множественных форм пероксидаз сои и их роль в формировании устойчивости <i>Glycinetax</i> и <i>Glycine soja</i> к окислительному стрессу.....	90
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	101
ВЫВОДЫ	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	107
СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	133

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Соя (*Glycine max (L.) Merrill*) – ценнейшая белково-масличная культура, но получение высоких и стабильных урожаев которой ограничивается действием разных экологических факторов. Основным регионом ее возделывания в России является Амурская область, охватывающая северную часть ареала дикой сои. Результаты секвенирования ее генома (Xie et al., 2019), а также физиолого-биохимические работы свидетельствуют о ее высоком адаптивном потенциале (Ала, Тильба, 2005; Мартынов, 2016; Козак, 2018).

Резко-континентальный климат Амурской области характеризуется летними высокими и низкими положительными температурами, вызывающими тепловой и холодовой стрессы у растений. Стресс, как известно, приводит к повреждению клеточных мембран и усилению процессов перекисного окисления липидов и белков (Лукаткин, 2002; Hossain et al., 2013; Mishra et al., 2017, Лаврентьева, 2019).

В сложных погодных условиях Амурской области соя, как и другие растения, испытывает окислительный стресс, усугубляемый загрязнением почв тяжелыми металлами. Однако до сих пор устойчивость сои к окислительному стрессу остается недостаточно изученной, что затрудняет разработку рекомендаций по повышению ее продуктивности и способов повышения ее адаптивных способностей к неблагоприятным факторам среды.

Степень разработанности темы. В связи с интенсификацией сельского хозяйства и применением разных минеральных удобрений, мелиорантов и пестицидов в Амурской области наблюдается загрязнение почв тяжелыми металлами, которые вызывают у растений окислительный стресс, нарушают протекающие у них физиолого-биохимические процессы и тем самым снижают их продуктивность (Минибаева, 2003; Полесская, 2007; Бородина, 2016; Лукаткин, 2019). Адаптация растений к различным условиям окружающей среды протекает на разных уровнях их организации, в том числе на молекулярном, и во многом связана с изменением метаболических

процессов, регулируемых клеточными ферментами (Иваченко, 2011; Луцкий, 2019), в частности эндогенной антиоксидантной системой защиты от стресса. В ее состав, наряду с другими соединениями, входят антиоксидантные ферменты (Рогожина, 2010; Лаврентьева и др., 2019;) и низкомолекулярные вещества, в том числе полифенолы (Krezhova, 2011; Загоскина, 2016).

Универсальным индикатором стрессового состояния растений являются фермент пероксидаза (К.Ф. 1.11.1.7) (Сарсенбаев, 1986; Рогожин, 2004, 2010; Лисник, 2019) и полифенольные антиоксиданты изофлавоны (Krezhova, 2011; Жаврид, 2019). Их количественный и качественный состав способствуют формированию устойчивости сои к воздействию неблагоприятных факторов, а снижение активности этих соединений приводит к угнетению жизненных функций растений (Загоскина и др., 2016; Корсун, 2016). Поддержать их жизнедеятельность можно путем внесения экзогенных полифенольных антиоксидантов, предпочтительно естественного происхождения (Тюкавкина, 2003; Кравченко, 2005; Фирсова, 2019).

Цель исследования – определить роль пероксидаз и изофлавонов в формировании адаптивных реакций сои и разработать способы снижения у неё окислительного стресса, вызванного высокими перепадами температур и воздействием тяжелых металлов. Для достижения поставленной цели в работе необходимо решить следующие **задачи**:

1. Определение активности пероксидаз культурной и дикой сои в условиях разной кислотности, при добавлении разного количества белкового экстракта и пероксида водорода, а также выявление оптимума протекания ферментной реакции.

2. Оценка устойчивости семян сои к стрессовому воздействию низких и высоких положительных температур, солей тяжелых металлов на основе выявления активности пероксидаз и множественности их форм.

3. Анализ встречаемости и характеристика множественных форм пероксидаз культурной и дикой сои, выявление их роли в процессах адаптации

сои к окислительному стрессу, разработка методов оценки уровня загрязнения почв медью, цинком, свинцом и кадмием.

4. Разработка хроматографического метода определения состава изофлавонов, их содержания в разных органах растений при воздействии факторов, вызывающих окислительный стресс.

5. Выявление влияния воздействия экзогенных полифенольных антиоксидантов на повышение устойчивости растений культурной и дикой сои и их семян к окислительному стрессу.

6. Разработка и внедрение на основе природного полифенольного антиоксиданта препарата, повышающего устойчивость сои к неблагоприятным факторам среды и её урожайность в агроклиматических условиях Амурской области.

Научная новизна. Впервые выявлены множественные формы пероксидаз, участвующие в формировании устойчивости сои к окислительному стрессу, вызванному неблагоприятными условиями среды Амурской области. Установлено, что увеличение количества видоспецифичных соевых эндогенных изофлавонов способствует повышению устойчивости растений и их семян к неблагоприятному воздействию температур и солей тяжелых металлов. Исследования автора показали, что наличие или отсутствие определенных множественных форм пероксидаз является откликом растений на неблагоприятное температурное воздействие и наличие в местах произрастания сои солей тяжелых металлов. Эти данные являются новыми для науки. Они расширяют представления об адаптивных возможностях сои.

Практическое и теоретическое значение работы. Полученные данные послужили основой для разработки автором ТУ, ТИ и регистрации препарата «ЭкоЛарикс» (свидетельство о государственной регистрации 253-07-721-1 от 29.07.15 г.) в Министерстве сельского хозяйства РФ. Эффективность действия препарата подтверждена 12 актами внедрения, полученными от агропредприятий Амурской области. Результаты исследований могут являться

основой для разработки других стимуляторов роста растений, а также могут использоваться для проведения мониторинга металлического загрязнения почв в местах выращивания сои.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций.

Достоверность результатов подтверждена большим объемом полученных экспериментальных данных и использованием в исследовании современных аналитических приборов. Экспериментальные данные были статистически обработаны с помощью программного обеспечения MS Excel. Все научные положения и выводы диссертационной работы обеспечены глубокой переработкой литературного материала, согласованностью полученных теоретических и эмпирических результатов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Надежным показателем окислительного стресса сои в условиях произрастания в Амурской области является повышение количества эндогенных полифенольных антиоксидантов, в частности суммарного количества изофлавонов. Обработка растений экзогенным полифенольным антиоксидантом приводит к улучшению адаптации сои к стрессу за счет повышения ее антиоксидантного статуса.

2. Множественные формы пероксидаз могут успешно использоваться в экологической практике для специализированной оценки уровня загрязнения почв тяжелыми металлами. Показано, что наличие формы П16 свидетельствует о загрязнении почв медью и/или цинком, формы П12 – медью, формы П4 – кадмием, П5 – свинцом. Форма П14 образуется при влиянии окислительного стресса, вызванного действием тяжелых металлов.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на 20 региональных, всероссийских и международных конференциях, в том числе на: XXIII Международ. зимней молодежной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2011); V Международ. симпозиуме «Химия и химическое образование» (Владивосток, 2011); III и IV Международ. экологических конгрессах

ELPIT(Тольятти, 2011, 2013); 8-й конференции «Анапа-2014: Перспективы использования новых форм удобрений, средств защиты и регуляторов роста растений в агротехнологиях сельскохозяйственных культур» (Анапа, 2014); на координационном совещании зоны ДВ и Сибири «Итоги координации НИР по сое за 2011-2014» (Благовещенск, 2015); III Междун. научно-практической конференции «Химия и химическое образование» (Благовещенск, 2015); IX Междун. симпозиуме «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2015); Всероссийской научно-практической конференции «Экологические проблемы регионов» (Иркутск, 2017); на VI Всероссийской конференции с международным участием «ЭкоБиотех-2019» (Уфа, 2019). Автор имеет дипломы победителя международного конкурса научных работ «Рациональное природопользование» (Владивосток, ДВФУ, 2014) и I и II Амурского регионального молодежного инновационного конвента (Благовещенск, 2012, 2014).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 33 работы, в том числе 5 работ в рецензируемых научных журналах, входящих в список ВАК, 2 статьи в зарубежных журналах (идентификатор автора в Scopus: 56973672600), 22 статьи в материалах международных, всероссийских и межрегиональных конференций, и 4 тезиса докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 133 страницах, состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, списка литературы и приложения, включает 34 рисунка и 12 таблиц. Список литературы включает 240 источников, из них 116 иностранных.

Личный вклад автора. Автором самостоятельно сформулированы цель и задачи исследований, теоретически обоснованы пути их решения, подобраны наиболее оптимальные методы анализа. Результаты исследований получены автором лично, за исключением случаев, специально оговоренных в диссертации и автореферате, о чём имеются ссылки на совместные публикации. Работа написана автором лично.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность д.б.н. проф., Л.Е. Иваченко, под руководством которой были начаты исследования и получены первые результаты. Ген. директор АО «Аметис» В.С. Остронков и председатель Совета директоров АО «Аметис» С.А. Лашин многократно консультировали автора в области исследований свойств природных антиоксидантов. Особую благодарность выражаю своему научному руководителю чл.-корр. РАО, д.б.н. проф. К.С. Голохвасту за всестороннюю помощь в подготовке работы. Работа выполнялась при финансовой поддержке научной школы ФГБОУ ВО «БГПУ» по направлению «Маркирование генетических систем и оценка их полиморфизма», а также за счет средств гранта губернатора Амурской области и фонда «Согласие».

ГЛАВА 1. ОБЗОР СОСТОЯНИЯ ИЗУЧЕННОСТИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

1.1. Окислительный стресс и его влияние на растения

Основные понятия и положения учения о стрессе разработаны в 1936 г. канадцем Гансом Селье, который утверждал, что стресс - совокупность всех неспецифических изменений, возникающих в организме под влиянием любых неблагоприятных и повреждающих факторов, так называемых стрессоров. (Селье, 1979). Селье полагал, что адаптивная реакция организма на различные неблагоприятные факторы (стрессоры) развивается по единому сценарию. Комплекс ответных реакций организма на стрессоры Г.Селье назвал «генерализованным адаптационным синдромом» и выделил в нем 3 стадии (триады) (рис. 1.1): 1) тревога и торможение большинства процессов; 2) адаптация, в течение которого организм приспосабливается к стрессору; 3) истощение, если адаптивный потенциал организма недостаточен для преодоления влияния стрессора

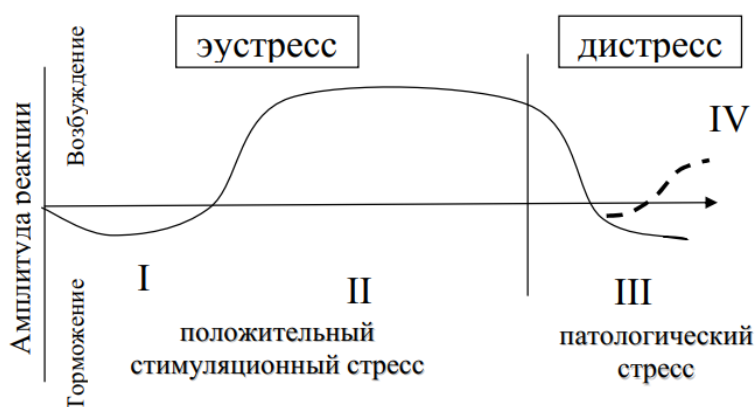


Рис. 1.1 «Триада Селье» и фаза репарации: I– фаза тревоги; II – фаза адаптации; III - фаза истощения; IV - фаза репарации (Селье, 1979).

На протяжении триады формируется неспецифическая резистентность (устойчивость), но при увеличении силы эффекта и истощении

защитных возможностей организма наступает его гибель. Г. Селье разделил стресс на положительный стимуляционный (эустресс) и патологический (дистресс). Граница между эустрессом и дистрессом расплывчата и зависит от дозы воздействия и исходной устойчивости организма. У растительных организмов первая фаза, судя по доминирующим в ней реакциям, не могла быть названа фазой тревоги. У растений она получила название первичной индуктивной стрессовой реакции.

Термин «оксидативный (окислительный) стресс» (от англ. oxidative stress) был введен Хельмутом Зисом в 1991 г. и официально вошел в словарь «Mesh PubMed» в 1995 г (Blokhina, 2003; Кабашникова, 2014). Согласно определению, данному в PubMed, оксидативный стресс – это нарушение баланса про- и антиоксидантов в пользу первых, которое может привести к повреждению (Foyer, 2005; Кабашникова, 2014). Окислительный стресс проявляется в накоплении поврежденных оснований ДНК, продуктовоокисления белков и пероксидации липидов, а также в снижении уровня антиоксидантов (Минибаева, 2003; Рогожин, 2004; Полесская, 2007; Никерова, 2018). Окислительный стресс приводит к изменениям метаболизма и регуляции, появлению морфологических симптомов. В ходе развития стресса достигается максимальная активация механизмов, включающих установление толерантности и детоксикации путем включения антиоксидантных и репарационных систем, из переокисленных липидов и аминокислот образуются альдегиды и липофусцины, которые содействуют некротизации клеток вместе с продуктами реакций с участием пероксидаз (Alonso, 2001; Zhang B., 2001; Zhu, 2002; Меньщикова, 2006). Для формирования более четкой картины стресса у растений необходимо развитие представлений о том, какие перестройки на молекулярном, мембранном и клеточном уровнях организации являются индикаторами входа растения в состояние стресса. Механизмы восприятия и передачи внешнего сигнала, равно как и природа развития ответной реакции на разных уровнях

организации организма на внешнее воздействие также требуют дальнейшего изучения и познания.

1.1.1. Образование активированных форм кислорода в растении

В настоящее время проблема стресса у растений широко изучается (Dat, 2000; Apel, 2004; Carol, 2006; Полесская, 2007; Прадедова, 2011; Shumilina, 2018). Несмотря на существование множества теорий развития стрессовой реакции у растений, общая концепция стресса, которая бы позволила описать реакцию любого растительного организма на возмущающий фактор, пока еще не разработана.

Согласно теории неспецифической реакции растений на стрессовое воздействие, любой неблагоприятный фактор может вызвать универсальную реакцию организма (Apel, 2004; Carol, 2006; Рогожин, 2004; Креславский, 2012; Shumilina, 2018). Долгое время предполагалось, что сигналом для запуска стресс-реакции может служить некое стереотипное изменение внутренней среды клетки (Макарова, 2010). Передача внешнего сигнала при стрессовом воздействии к соответствующим клеточным эффекторам может осуществляться синтез низкомолекулярных белков, смещение прооксидантно-оксидантного равновесия в направлении активации перекисного окисления липидов (ПОЛ), продукты которого могут являться как «индикаторами», так и «первичными медиаторами» стресса.

В последние годы активно развиваются представления о том, что разные стрессоры (высокие и низкие температуры, обезвоживание, засоление, тяжелые металлы, патогены и др.) могут инициировать образование активных форм кислорода (АФК), которые в небольших количествах являются сигнальными молекулами и вовлечены в стрессовые ответы растительной клетки (Dat, 2000; Apel, 2004; Carol, 2006; Полесская, 2007; Загоскина, 2012; Shumilina, 2018). Избыточное образование АФК вызывает окислительные повреждения клеток и ДНК, инактивацию ферментов, что приводит к изменению метаболизма, активирует антиоксидантные системы и системы

репарации. При длительном действии экстремального фактора эти процессы могут привести к возникновению дисбаланса между анаболическими и катаболическими процессами, метаболической дисфункции и гибели клеток (Bethke, 2001). Образование АФК на клеточной поверхности («окислительный взрыв») является одним из ранних ответов на стрессовое воздействие абиотической, биотической и антропогенной природы и представляет собой изменение баланса между образованием АФК и активностью антиоксидантной защиты в пользу первого. Структурные и функциональные нарушения, вызванные стрессовым воздействием, усиливают активацию кислорода, что, в свою очередь, вызывает каскадных нарушений, усугубляя первоначальный негативный эффект (Arel, 2004; Рогожин, 2004; Carol, 2006).

Основная защита клетки растений от АФК – высокий уровень низкомолекулярных антиоксидантов (Burkey, 2003; Колупаев, 2011; Волынец, 2014). Образовавшиеся АФК мгновенно реагирует с любой окисляемой молекулой в ближайшем окружении. Из наиболее биологически важных компонентов клетки гидроксильный радикал способен окислять углеводы, нуклеиновые кислоты, липиды и аминокислоты.

1.1.3. Влияние высоких и низких положительных температур на растения и адаптации к ним

Жизнедеятельность растений возможна лишь в узких температурных пределах (от 0 до +50°C). При этом оптимальные температурные интервалы у большинства растений лежат в диапазоне от 15 до +30°C. Температура влияет на многие процессы, происходящие у растений: фотосинтез, дыхание, испарение, рост, появление генеративных органов, созревание и прорастание семян (Алёхина, 2005).

Растения приспосабливаются к периодичности температурных условий того региона, в котором обитают. Поэтому в разные фенологические периоды растениям нужна разная температура (Афанасьева, 2011).

1.1.3.1. Холодовое повреждение растений

Изучению холодового повреждения растений и его роль в образовании окислительного стресса отводится огромная роль (Усманов, 2001; Лукаткин, 2002; Мазей, 2011; Шibaева, 2018, 2019). В работах А.С. Лукаткина (Лукаткин, 2002) отмечено, что для оценки холодоустойчивости определяют активность антиоксидантных ферментов, в том числе пероксидазы, а также измеряют интенсивность ПОЛ.

Симптомы ПОЛ при охлаждении – накопление малонового диальдегида (МДА), разрушение хлорофиллов и каротиноидов, снижение уровня полиненасыщенных кислот, накопление свободных жирных кислот, накопление пероксида водорода (Агоса, 2001; Лукаткин, 2002; Мазей, 2011). Интенсивность ПОЛ при холодом выдерживании растений зависела от длительности температуры, видовых и сортовых особенностей.

При воздействии низких температур активируется генерация АФК, которые участвуют в запуске холодового повреждения особенно у неустойчивых к холоду растений (Зыкова, 2002; Васильева, 2004; Шibaева, 2019). Наиболее ранней реакцией холодового повреждения клетки является усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ), вызываемое АФК. Одним из основных источников АФК при действии низких температур являются митохондрии. Поскольку скорости синтетических реакций в условиях холода снижены, в клетке могут снижаться потребности в АТФ (Leipner, 1999).

Устойчивость к холоду и окислительному стрессу на субклеточном уровне связана со способностью растений предотвращать образование АФК или обезвреживать и детоксифицировать их (Васильева, 2004; Полеская, 2007; Макарова, 2010). Предполагается, что биологически активные вещества, разобщающие окисление и фосфорилирование в митохондриях во время холодового стресса, снижают образование АФК и являются частью антиокислительной защиты клетки. Если антиоксидантная система перестает справляться с возрастающим уровнем АФК и возникающими на их уровне перекисями, то происходит холодовое повреждение.

Однако АФК могут участвовать в закаливании растений к низким температурам: при небольшом увеличении их уровня устойчивость растений повышается в результате активизации антиоксидантной системы (Зыкова, 2002; Gill, 2010). Поэтому активность антиоксидантных ферментов и концентрация низкомолекулярных антиоксидантов коррелируют с устойчивостью растений к низким температурам, и их увеличение относят к проявлению общей неспецифической защитной реакции клетки на действие гипотермии (Васильева, 2004; Полесская, 2007; Макарова, 2010).

Важным подходом к пониманию защитных реакций растений является идентификация источников АФК в ходе ранних стрессовых ответов растительных клеток. Вклад внутриклеточных источников образования АФК является значительным как в нормальных, так и в стрессовых условиях (Зыкова, 2002). Активированные на более поздних стадиях ответных реакций растительной клетки, они могут ограничивать распространение инфекции и индуцировать экспрессию защитных генов. Не исключается также их роль и участие в сверхчувствительной реакции клеток. (Минибаева, 2003; Макарова, 2010).

В работе Муравьева А.А. (Муравьев, 2018) показано, что в условиях лесостепи в Белгородской области низкие положительные температуры, преобладающие до периода бутонизации, оказали отрицательное влияние на продуктивность растений изучаемых сортов сои разной скороспелости (Белгородская 48, Белгородская 6, Белгородская 7, Белгородская 8 и Бара).

1.1.3.2. Влияние высоких температур на растения

В России в основном жаркое засушливое лето. Амурская область характеризуется высокими летними температурами (на юге области могут достигать +45 °С), вызывающими тепловые повреждения у растений. В связи с актуальностью изучению влияния высоких температур на растения посвящено огромное количество работ (Сарсенбаев 1986; Луцкий, 2019).

Интересным является вопрос адаптации растений к экстремально высоким температурам.

Высокотемпературное воздействие сказывается прежде всего на текучести мембран, в результате чего происходит увеличение их проницаемости и выделение из клетки водорастворимых веществ. Вследствие этого наблюдается дезорганизация многих функций клеток, в частности их деления.

Жара повреждает в клетке белки, особенно ферменты, нарушая процесс биосинтеза белков *de novo*, ингибируя активность ферментов, индуцируя деградацию существующих белков. В результате могут исчезать пулы ферментов, значимых для функционирования клеток как в период стресса, так и последующей репарации (Васса, 2004; Луцкий, 2019). Большинство ключевых ферментов растений термолабильны, включая пероксидазу, каталазу и СОД. Ингибирование пероксидазы представляет собой главную причину снижения ИФ при высокой температуре. Жара подавляет также способность превращать сахарозу в крахмал у ячменя, пшеницы и картофеля, указывая на то, что один или несколько ферментов в цепи превращения сильно ингибируются жарой. Непосредственное влияние жары на активность растворимой крахмалсинтазы в эндосперме пшеницы, как *in vitro*, так и *in vivo* вызывает подавление накопления крахмала.

Высокие температуры ингибировали активность каталазы у нескольких видов растений, в то время как активность других антиоксидантных ферментов не подавлялась. У ржи изменения активности каталазы были обратимыми и не оставляли видимых повреждений после прекращения жары, в то время как у огурца восстановление активности каталазы замедлялось (тормозилось) и сопровождалось обесцвечиванием хлорофилла, указывающим на более существенное окислительное повреждение (Zeno, 1982). В проростках кукурузы, выращиваемой при повышенных температурах (+35°C), активность СОД была ниже, чем при относительно низких температурах (+10°C) (Луцкий, 2019).

Жара нарушала целостность мембран, что приводило к повышенной их проницаемости для ионов и растворов. Одновременно нарушалась деятельность ассоциированных с мембранами ферментов фотосинтеза, дыхания и транспорта ассимилятов. В условиях сильной жары его мембраны избирательно повреждались, вызывая деградацию мРНК (3-амилазы. Одновременно индуцированная жарой утечка веществ через мембраны влияет на редокс-потенциал основных клеточных компартментов, что, в свою очередь, нарушает ход метаболических процессов вплоть до гибели клеток (Сарсенбаев, 1986; Васса, 2004).

Окислительный стресс был недавно признан одним из самых главных отрицательных факторов действия жары на растения. Жара вызывает дисбаланс между количеством поглощенной пигментами солнечной радиации и транспортом электронов через цитохромы – процесс, названный фотоингибированием. Избыточная энергия может перейти на кислород, что приводит к образованию АФК. Основными зонами окислительного повреждения в клетках являются митохондрии и хлоропласты, где происходит нарушение транспорта электронов. В хлоропластах высокотемпературный стресс вызывает фотоингибирование фотосинтеза и инактивацию каталазы, что приводит к накоплению АФК и обесцвечиванию хлорофилла (Васса, 2004).

Одним из основных элементов адаптации растительных организмов к перегреву являются белки теплового шока, которые синтезируются при повышении температуры и помогают растениям выдерживать этот тип стрессового воздействия. Впервые они были выявлены у дрозофилы, позже идентифицированы у животных (включая человека), микроорганизмов и растений.

Если клетки или проростки растений быстро нагреть до температуры +40 °С, синтез большинства белков и мРНК будет подавлен. Именно в этих условиях происходит активация синтеза около 30–50 белков, называемых белками теплового шока (БТШ). Новые транскрипты БТШ, т.е.

соответствующие мРНК, обнаруживаются уже через 3–5 мин после воздействия высоких температур. Их образование наблюдается также в естественных условиях при постепенном повышении температуры (Сарсенбаев, 1986).

Ряд БТШ обладает способностью временно связываться с некоторыми ферментами и высвобождать их только на определенной стадии развития клетки, когда необходимо проявление энзиматической активности.

1.1.4. Влияние тяжелых металлов на растения и адаптации к ним

К тяжелым металлам относят химические элементы, имеющие плотность более 5 г/см³ и атомную массу свыше 40 Да (Титов, 2007, 2014; Бородина, 2016; Лукаткин, 2019). С точки зрения значимости тяжелых металлов для растений их можно разделить на две группы: 1) необходимые в небольших концентрациях для жизнедеятельности растений (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Zn), которые становятся токсичными только при значительном повышении их содержания в почве и растениях и 2) не участвующие в метаболизме растений (Cd, Hg, Pb, V) и токсичные даже в очень низких концентрациях (Дмитриева, 2002; Verbruggen, 2009).

В работе Бородиной Н.А. показано, что в почвах Амурской области количество таких ТМ, как кадмий, свинец и цинк, превышает фоновое содержание в 2 раза (в среднем) ориентировочно допустимой концентрации металла в почве, что негативно влияет на окружающую среду, в том числе на произрастающие на такой почве растения (Wang, 2009; Бородина, 2016). Поэтому интересным является вопрос влияния данных металлов в таких дозировках на растения.

Свинец. Избыток свинца в растениях, связанный с высокой его концентрацией в почве, ингибирует дыхание и подавляет процесс фотосинтеза, может привести к увеличению содержания кадмия и снижению поступления цинка, кальция, фосфора, серы (Казнина, 2010, 2014). Вследствие этого снижается урожайность растений и резко ухудшается качество

производимой продукции. Внешние симптомы негативного действия свинца – появление темно-зеленых листьев, скручивание старых листьев, чахлая листва (Покровская, 1995; Афанасьева, 2011). Устойчивость растений к его избытку неодинаковая: менее устойчивы злаки, более устойчивы бобовые (Гуральчук, 1994). Поэтому симптомы токсичности у различных культур могут возникнуть при разном валовом содержании свинца в почве – от 100 до 500 мг/кг. Концентрация металла выше 10 мг/кг сухого вещества является токсичной для большинства культурных растений (Скугорева, 2016).

Кадмий. К числу наиболее токсичных ТМ относится кадмий, который был открыт как элемент, присутствующий в естественной природе в низких концентрациях, в 1817 г. (Perfus-Barbeoch, 2002; Shah, 2011). Повышение его количества в почвах обусловлено различными техногенными воздействиями (Robards, 1991; Krantev, 2008). К их числу относятся предприятия, производящие краски, антисептические вещества, щелочные аккумуляторы, а также осуществляющие выплавку цветных металлов, переработку медных, свинцовых и, особенно, цинковых руд, поскольку кадмий сопутствует цинку и является его антагонистом (Pan et al., 2010). Поступление металла в окружающую среду связано и с сельским хозяйством, в частности с применением фосфорных удобрений, содержащих в виде примеси кадмий (Попова, 1991). Отрицательный эффект оказывают также сточные воды, в которых содержание кадмия может достигать значительных величин (Ильин, 2012).

Высокая экотоксичность кадмия обусловлена тем, что он может сохраняться в почве в течение 1-3 лет, в прибрежных отложениях – 2 года и в воде океанов – свыше 7000 лет (Robards, Worsfold, 1991; Shah, 2011). Важно и то, что кадмий опасен для здоровья человека и животных, что обусловлено его накоплением в растениях и последующим поступлением в пищевые цепи (Ernst, 1992; Tubek, 2008). Известно, что наличие кадмия в почвенном растворе влияет на прорастание семян, хотя и в меньшей степени, чем на рост проростков (Arao, 2003; Chaffei, 2004; Мазей, 2011). Этот эффект обусловлен

низкой проницаемостью семенной кожуры для кадмия. Влияние ТМ на корневую систему выражено в большей степени по сравнению с побегами (Казнина и др., 2010; Elguera, 2013). Снижение содержания фотосинтетических пигментов при действии кадмия в большей степени проявлялось для суммарного содержания хлорофиллов, особенно хлорофилла А, по сравнению с каротиноидами (Титов и др., 2014). По фитотоксичности и способности накапливаться в растениях в ряду тяжелых металлов он занимает первое место (Cd>Cu>Zn>Pb) (Pomponi, 2006).

Цинк. Особый интерес к цинку связан с открытием его роли в нуклеиновом обмене, процессах транскрипции, стабилизации нуклеиновых кислот, белков и особенно компонентов биологических мембран, а также в обмене витамина А (Прасад, 2009; Узаков, 2018). Ему принадлежит важная роль в синтезе нуклеиновых кислот и белка. Цинк обнаружен в составе более 200 ферментов, относящихся ко всем классам. Уникальность цинка заключается в том, что ни один элемент не входит в состав такого количества ферментов и не выполняет таких разнообразных физиологических функций (Микроэлементы..., 2009). Большинство видов растений обладают высокой толерантностью к его избытку в почвах. Избыток цинка в почвах затрудняет ферментацию разложения целлюлозы, дыхание микроорганизмов, действие уреазы и т.д., вследствие чего нарушаются процессы преобразования органического вещества в почвах (Узаков, 2018).

Медь является одним из важнейших незаменимых элементов, необходимых для живых организмов. В растениях она активно участвует в процессах фотосинтеза, дыхания, восстановления и фиксации азота. Медь входит в состав целого ряда ферментов-оксидаз – цитохромоксидазы, церулоплазмина, супероксидадисмутазы, уратоксидазы и других; участвует в биохимических процессах как составная часть ферментов, осуществляющих реакции окисления субстратов молекулярным кислородом (Узаков, 2018). При недостатке и избытке меди у растений появляется заболевание «суховершинность», хлорозы. Высокие дозы металла приводят к нарушениям

пигментации растений. Также основные признаки дефицита меди для растений – замедление, а затем и прекращение формирования репродуктивных органов, появление щуплого зерна, пустозернистых колосьев, снижение устойчивости к неблагоприятным факторам внешней среды. Истинный биоэлемент, участвует в разнообразных метаболических реакциях у растений. Фитотоксичность выше, чем у Zn (Drazkiewicz, 2003), проявляется на легких почвах. Относится к подвижным мигрантам, более подвижен в кислых почвах (Микроэлементы..., 2009).

Биогенные ионы входят в состав ферментных систем, которые обеспечивают регуляцию всех процессов в клетке и организме. Поэтому их ПДК значительно выше, чем у небιοгенных. При поступлении в растения воздушным (через устьица) или капельным (роса, туман, слабые осадки) путями определенная доза биогенных ТМ включается в состав ферментных систем, что стимулирует метаболические процессы (Fang, 2000). Так, медь входит в состав ферментов, участвующих в процессах темновых реакций фотосинтеза, способствует поглощению других элементов; цинк входит в состав ферментов, расщепляющих белки, увеличивает устойчивость растений к жаре, засухе, болезням. Лишь при более высоких концентрациях они действуют как токсиканты (Прохорова, 1998; Квеститатдзе, 2005; Егорова, 2007).

Наиболее общими, малоспецифичными проявлениями токсического действия ТМ можно считать торможение роста, хлороз и нарушение водного обмена. Они наблюдались у многих растений на ранних стадиях страдания от избытка почти всех ТМ, и это позволяет предположить, что указанные патологические явления имеют вторичный характер (Большаков, 2002).

Только редкие представители ТМ биологически значимы (Cu, Zn), остальные же представляют собой вещества, токсичные практически в любых концентрациях (Лукаткин, 2019). Обладая высоким сродством к гидроксо- и сульфогруппам остатков аминокислот в белках и ненасыщенным жирным кислотам в липидах, ТМ изменяют структуру клеточных и внутриклеточных

мембран, полностью или частично, нарушая компартментацию и транспортную систему клетки, а также затрудняют образование вторичной структуры белков (особенно, α -спиралей), что приводит к их денатурации уже на стадии синтеза (Серегин, 2008).

При загрязнении почвы токсическими элементами Cd, Pb, Zn, Cu в дозе 2 ПДК подавляется рост и развитие растений, снижается урожайность и качество урожая, изменяется морфология сои, утрачиваются сортовые признаки. Zn и Cu проявляют наиболее токсическое действие в период «посев всходы», Cd и Pb – «всходы-полная спелость» (Овчаренко, 1995; Llamas, 2000; 2002; Wojcik, 2005; Соколик, 2009).

Реакция растений на повышение дозы ТМ проявляется в нарушении нормального хода биохимических процессов, синтеза и функции ферментов, витаминов (Казнина, 2010).

Ранее исследовали влияние различных металлов на активность ферментов в проростках сельскохозяйственных растений. Л.Е. Иваченко и др. изучали влияние солей ТМ на активность и множественные формы пероксидаз сои (Иваченко, 2006; Иваченко, 2011).

Загрязнения ТМ, вызванные природными процессами или антропологической деятельностью, такой как металлообрабатывающая промышленность, добыча полезных ископаемых, минеральные удобрения, пестициды и другие, в наши дни создают серьезные экологические проблемы (Степанок, 2000; Скугорева, 2016). Очевидно, что существует острая необходимость в эффективных методах восстановления, которые могут решать такие проблемы, особенно в загрязненных почвенных и водных ресурсах. Фиторемедиация является одним из таких подходов, который предлагает эффективные и доступные способы привлечения подходящих растений для очищения природы. Общей особенностью борьбы со стрессовыми факторами является синхронизированная функция антиоксидантных ферментов, которая помогает облегчить повреждение клеток путем ограничения количества АФК.

В работах Cobbett C.S. (Cobbett, 2000) изучена взаимосвязь окислительного стресса с токсичностью тяжелых металлов у разных видов растений. Показано, что воздействие ионов металлов может интенсифицировать образование активных форм кислорода (АФК), таких как: супероксидные радикалы, гидроксильные радикалы или перекись водорода. Эти виды могут реагировать с клеточными компонентами (липиды, белки, нуклеиновые кислоты) и вызывать перекисное окисление липидов, повреждение мембран и инактивацию ферментов, что влияет на многие физиологические процессы, а также на жизнеспособность клеток (Rio, 2006). Растения разработали сложный набор механизмов для поддержания низкого уровня АФК и предотвращения негативного воздействия чрезмерно высоких концентраций АФК. Эта антиоксидантная сеть включает многочисленные растворимые (аскорбат, глутатион) и мембранные (токоферол) соединения, а также ферменты, участвующие в удалении АФК (супероксиддисмутаза, каталаза, аскорбатпероксидаза) (Yoshimura, 2000, 2004; Rios-Gonzalez, 2002). АФК должна быть эффективно детоксифицирована, чтобы уменьшить вредное воздействие ТМ на клетки (Мерзляк, 1999).

В работе Fei Мао (Fei Мао, 2018) со авторами показано, что после воздействия 5 видов ТМ: кадмия, хрома, меди, свинца и ртути в гидропонной системе на растения *Glycine max* (Linn.) Merrill и *Vigna radiate* (Linn.) Wilczek, нормальные концентрации ТМ не вызывают видимых токсических симптомов, а низкий уровень ТМ даже незначительно стимулирует рост растений (Sharma, 2005). С ростом концентраций тяжелых металлов возникают реакции окислительного стресса у растений сои и бобов, характеризующиеся накоплением малонового диальдегда и чередованием активности антиоксидантных ферментов. Также рост был подавлен растений, уменьшилось содержание хлорофилла, листья показали признаки хлороза при высоких концентрациях металлов (Каюмов, 2004).

Все вышеизложенное свидетельствует о различных источниках поступления ТМ в окружающую среду, зависимости этого процесса от многих

факторов, включая условия выращивания растений. В незагрязненных почвах концентрации цинка, меди, свинца, никеля, кадмия и хрома составляют 0,00011-0,065% (Ernst et al., 1992), а при их повышении (свыше 0,1%) все почвы становятся токсичными для растений (Bothe, 2011).

Поведение металла в почве определяется ее гранулометрическим составом, реакцией почвенного раствора, физическими свойствами, влагообеспеченностью и климатическими факторами (Ильин, 2012). Растения характеризуются специфичностью в отношении поглощения ТМ и устойчивостью к их действию, что позволило разделить их на три группы (Серегин, 2008). К одной из них относятся растения-аккумуляторы, которые сформировали механизмы устойчивости к действию ТМ. Это позволяет им аккумулировать токсичные элементы в метаболически инертных органах и органеллах или включать их в хелаты, тем самым переводя в физиологически безопасные формы. Подобные виды растений начинают активно использовать для разработки технологий биологической очистки загрязненных территорий. Вторая группа – это растения-индикаторы, содержание металла в которых соответствует таковому в почве. И третья – растения-исключатели, обладающие способностью к поддержанию низкой концентрации металлов в растительных клетках, несмотря на высокую концентрацию в окружающей среде.

Видимыми симптомами, вызванными повышением содержания ТМ в растениях, являются задержка роста, повреждения корневой системы, хлороз листьев, а также красно-бурая окраска края листа (Титов и др., 2007; Курбатова и др., 2016). Наиболее общие проявления токсического действия ТМ на растения это ингибирование фотосинтеза, нарушение транспорта ассимилятов, изменение водного и гормонального статусов, а также минерального питания. В их присутствии отмечались изменения в ультраструктуре хлоропластов, биосинтезе фотосинтетических ферментов, количестве хлорофилла, пластохинона и каротиноидов, а также дефиците CO_2 , вызванного закрытием устьиц (Sharma, 2005; Титов и др., 2007). Кадмий

приводит к изменениям дыхания растений, транспирации и водного режима (Скугорева и др., 2016). Установлено снижение поглощения кислорода корнями и изолированными клетками табака в его присутствии (Серегин, Иванов, 2008; Соколик, 2009). Сообщалось также об увеличении интенсивности дыхания при действии кадмия на растения ячменя и овса, что объясняется повышением активности ряда дыхательных ферментов (Титов и др., 2014). Однако высокие его концентрации приводили к обратному эффекту (Llamas et al., 2000).

Таким образом, практически все физиологические процессы в растении подвержены негативному действию ТМ. Тем не менее, растения способны расти и на загрязненных ими территориях, используя для этого различные механизмы адаптации (Масленников, 2013; Еремченко, 2014; Бабкина, 2018).

1.2. Защитные реакции растений при стрессе. Антиоксидантная система

Растительная клетка содержит мощную и многообразную систему защиты от АФК (Колупаев, 2011; Shumilina, 2018), которая участвует в поддержании концентрации уже образовавшихся в клетке АФК на достаточно низком уровне и локализацию их действия. Состоянием антиоксидантной системы определяется устойчивость растений к стрессовым воздействиям (Singh, 2002).

Такая система включает в себя целый ряд специальных механизмов, предотвращающих образование АФК или обезвреживающих их. К механизмам, предотвращающим образование АФК, относится ингибирование ферментативных реакций, в процессе которых образуется АФК, хелатирование ионов металлов с переменной валентностью специализированными и неспециализированными белками, а также уменьшение одноэлектронного восстановления кислорода за счет снижения его образования в результате разобщения фосфорилирования и дыхания (Зенков и др., 2003).

Действие на растения стрессоров, в том числе ТМ, как правило, сопровождается повышением количества АФК, которые, являясь реакционноспособными соединениями, обладают высокой цитотоксичностью в отношении любых типов клеток и клеточных образований (Полесская, 2007). Накопление АФК вызывает развитие окислительного стресса, обусловленное дисбалансом между генерацией и удалением активных форм кислорода (Uchiyama, 1978; Колупаев и др., 2011). Это приводит к целому ряду патологических процессов и заболеваний растений, некротическим повреждениям вегетативных и генеративных органов и даже гибели растений (Gill, Tuteja, 2010). И в этом случае большое значение имеет функционирование протекторных систем организма, одной из которых является антиоксидантная система (АОС), включающая многочисленные антиоксиданты (АО), способные замедлять или предотвращать окисление органических веществ (Полесская, 2007).

АО - вещества, которые, присутствуя в более низких по сравнению с окисляемым субстратом концентрациях, существенно задерживают или ингибируют его окисление (Зенков, 2003; Pitzschke, 2006). Обычно их позиционируют как низкомолекулярные (фенольные соединения, некоторые аминокислоты, аскорбиновая кислота, глутатион, полиамины, витамины А и Е, каротины и др.) и высокомолекулярные (ферменты – каталаза, супероксиддисмутаза, различные пероксидазы и др.) АО. Предложена и другая классификация, основанная на уровне АОС в условиях окислительного стресса (Прадедова и др., 2011). Это позволило выделить три группы соединений: 1) соединения, препятствующие образованию АФК путем хелатирования металлов с переменной валентностью и способные депонировать избыточный кислород, ингибируя таким образом его активные формы; 2) соединения, нейтрализующие свободные радикалы и ингибирующие цепочечные реакции окисления, 3) соединения, инактивирующие уже образовавшийся пероксид радикал и участвующие в исправлении повреждений.

Поскольку в условиях абиотического стресса на первый план выступают АО прямого действия, то есть непосредственно обладающие АО свойствами, обусловленными наличием определенных функциональных групп, то значительный интерес при действии поллютантов на растения представляют именно низкомолекулярные антиоксиданты. Они способны «прерывать» цепные реакции окисления, выступать в роли «ловушек», а также являться хелаторами, образующими комплексы с ТМ и ингибирующими металлотависимые реакции свободнорадикального окисления (Шукурова, 2010; Колупаев, 2011). И в этом случае важная роль отводится таким низкомолекулярным АО как фенольные соединения (Меньщикова и др., 2006).

1.2.1. Низкомолекулярные антиоксиданты и их роль в защите растений от действия окислительного стресса

Значительное количество АФК в растительных клетках утилизируется с помощью низкомолекулярных антиоксидантов (Загоскина, 2010, 2016). Классическими представителями этой группы считаются водорастворимые соединения – глутатион, аскорбиновая кислота, некоторые фенольные вещества, а также группа антиоксидантов липидной фазы, в которую входят фенольные токоферолы, близкие к ним по строению убихиноны и витамин К. К липофильным соединениям также относят каротиноиды.

Каротиноиды относятся к антиоксидантам липидной фазы. Каротиноиды являются природными органическими пигментами желтого, оранжевого или красного цвета, которые синтезируются в бактериях, грибах, водорослях, высших растениях и коралловых полипах (Хуршайнен, 2019). К каротиноидам относят каротины, ксантофиллы и некоторые продукты циклизации и потери части углеродного скелета ликопина.

Каротины являются тетратерпенами – изопреноидными углеводородами общей формулы $C_{40}H_{56}$, которые образуются при изомеризации и дегидрировании ациклического полиена – *ликопина*. Наиболее важным представителем каротинов в растении является β -каротин, который

является структурным компонентом фотосинтетических мембран, участвует в защите клеток от разрушительного действия света и в переносе энергии в процессе фотосинтеза. Основная функция каротиноидов в растительной клетке состоит в защите ее структур от повреждающего действия свободных радикалов, образующихся в процессе фотосинтеза (Хуршкайнен, 2019). Антиоксидантная роль каротиноидов проявляется в основном в связывании синглетного кислорода, но они также могут обезвреживать и пероксидные радикалы. Кроме того, каротиноиды способны гасить триплетное состояние Хл, которое является одним из источников синглетного кислорода. Поскольку каротиноиды являются полиненасыщенными соединениями, то они сами могут окисляться и выступать в роли прооксидантов.

Растворимые углеводы. Антиоксидантное действие сахаров может быть прямым, связанным с перехватом свободных радикалов, что показано в модельных системах, генерирующих гидроксильный радикал (Дьякова, 2018). У растений картофеля, трансформированных геном дрожжевой инвертазы и содержащих вследствие этого большее количество сахаров в листьях, наблюдалась более высокая устойчивость к холодному и окислительному (обработка метилвиологеном) стрессам. При этом повышенная устойчивость обеспечивалась не ферментативной, а низкомолекулярной составляющей антиоксидантной защиты, в частности сахарами, содержание которых в клетках растений приблизительно на четыре порядка выше содержания аскорбата (Cronk, 2004; Larskaya, 2015). Растворимые сахара при осмотическом стрессе накапливаются в листьях многих видов растений, при этом наблюдается подавление синтеза крахмала (Дьякова, 2018). Антиоксидантное действие сахаров может быть непрямым – связанным с метаболической регуляцией компонентов антиоксидантной системы. У растений брокколи синтез аскорбата активировался сахарозой, причем глюкоза была в этом отношении неактивной.

1.2.1.1 Фенольные соединения растений и их роль в жизнедеятельности растений

Фенольные соединения представляют собой одни из наиболее распространенных в растительных клетках представителей вторичного метаболизма (Запрометов, 1993, 1996; Загоскина, 2016). Фенольные структуры чаще всего встречаются практически во всех частях растений. Содержание фенольных соединений в отдельных органах растений варьирует в очень широких пределах: от десятых-сотых долей до многих процентов. Самое высокое количество их содержится в генеративных органах, лепестках цветов и листьях растений (Волынец, 2014). Это вещества ароматической природы, имеющие в своей молекуле ароматическое (бензольное) кольцо (одно у оксибензойных и оксикоричных кислот и два – у различных флавоноидов), а также одну или несколько гидроксильных групп, связанных с атомами углерода ароматического кольца. Отличительной чертой фенольных соединений являются легкая окисляемость с образованием высокореактивных промежуточных продуктов типа семихинонных радикалов или орто-хинонов, способность взаимодействовать с белками с образованием водородных связей, а также склонность к комплексообразованию с ионами металлов (Winkel-Shirley, 2002). Они также способны инактивировать свободные радикалы, тем самым защищая клетки от действия АФК.

Следует подчеркнуть, что одними из наиболее распространенных в высших растениях представителей фенольных соединений являются флавоноиды, для которых отмечена высокая АО активность (Запрометов, 1993; Blokhina et al., 2003, Волынец, 2014). Разнообразие природных флавоноидов достигается за счет наличия ассиметрических атомов углерода в гетероцикле различной картины гидроксирования, метилирования, метоксилирования, глико-зилирования и ацилирования ароматических ядер А и В.

Для растений процесс окисления флавоноидов сопровождает нормальный рост и развитие. Так, при созревании семян он приводит к

образованию полимерных соединений на поверхности семенной оболочки, что определяет снижение ее проницаемости для воды (Lam, 2004; Pourcel et al., 2007). Превращение флавоноидов, происходящее при участии внутриклеточного кислорода и воды, предохраняет семена от прорастания и апоптоза (Egley et al., 1985). Защитные свойства этих вторичных метаболитов проявляются и в удалении избытка активных форм кислорода, образующихся в процессе фотосинтеза (Edreva, 2008). Известно также, что по механизмам окислительно-восстановительных реакций, сопутствующих окислительному стрессу, флавоноиды увеличивают стабильность таких биологически важных соединений как каротиноиды и аскорбиновая кислота.

Роль фенольных соединений в жизнедеятельности растений очень разнообразна, зависит от видового состава растения-хозяина, факторов окружающей среды. Не маловажное место в этой системе занимает и наличие стрессовых факторов, и их характер. Большая численность разновидностей фенольных соединений, отличие их по строению и свойствам со всей очевидностью свидетельствуют о том, что и функции этих соединений должны быть разнообразными.

Фотопротекторная функция. Клетки верхнего слоя растений защищают от ультрафиолетовых лучей. Доказано, что это явление наблюдается благодаря повышенному содержанию фенольных соединений в эпидермальных клетках.

Сигнальная функция. Благодаря антоцианам, флавонам, флавононам и меланинам у растений появляется привлекающая насекомых, птиц и других животных окраска цветов, плодов и семян. Применяя пищевые аттрактанты фенольной природы, например, изоквертицин, на практике привлекают опылителей цветов и переносчиков семян. Желтый цвет семян сои обусловлен содержанием каротиноидов и изовлавонов.

Фенольные соединения как регуляторы роста растений. Растительные фенолы в определенном количестве способны стимулировать либо ингибировать рост растения, так как содержат ортогидроксильную

группировку. Например, флаванол и нарингенин ингибируют образование гормонов, отвечающих за активацию роста – гибберелинов и цитокининов. Так же фенольные соединения участвуют в процессах физиологического покоя семян, предотвращают их прорастание даже в сочных плодах.

Структурная функция. Растительные фенольные соединения являются компонентами клеточных клеток. К ним относятся лигнин, суберин.

1.2.1.2. Защитная функция фенольных соединений в ответ на окислительный стресс

Вопрос становления иммунитета растений является весьма сложным и не мало изученным. Во многих исследованиях было установлено, что при поражении растений патогенами практически всегда происходит интенсивная вспышка биосинтеза фенольных соединений, которая сопровождается увеличением активности соответствующих ферментов (Зенков, 2003; Загоскина, 2010, 2016). Это еще одно свидетельство важных защитных функций фенольных соединений в растениях.

Эффективность фенольных соединений как АО зависит от количества ОН-групп в их молекулах (Меньщикова и др., 2006). Действие флавоноидов как АО обусловлено их неспецифическими окислительно-восстановительными реакциями с небольшими молекулами, радикалами, ионами (Blokina et al., 2003; Меньщикова и др., 2006). Они определяются их способностью взаимодействовать непосредственно со свободными радикалами, таким образом, удалять их из области возникновения, а также хелатированием ионов металлов, инициирующих окислительный стресс, тем самым защищая клетки от их действия (Malesev, Kuntic, 2007; Тараховский и др., 2013). Это происходит при участии превентивного и антирадикального механизмов (Winkel-Shirley, 2002; Filkowski et al., 2004; Cle et al., 2008; Lovdal et al., 2010). Реакции фенольных соединений со свободными радикалами протекают с высокими скоростями, что сопровождается трансформацией флавоноида в феноксильный радикал, являющийся промежуточным

продуктом реакции. Затем данное нестабильное соединение превращается в производные исходного флавоноида или вовлекается в новый цикл окислительно-восстановительных реакций (Michalak, 2006).

Реакционная способность феноксила, структура соединений, в которые он преобразуется, определяются природой исходного флавоноида и условиями, сопровождающими протекающие реакции. Ранее был выяснен один из механизмов реакции флавоноидов с активными формами кислорода, а именно с супероксидным анион-радикалом, который заключается в одноэлектронном восстановлении супероксида, в результате чего генерируется пероксид водорода (Mittler, 2002; Mittova, 2003). Флавоноиды способны к взаимодействию с органическими пероксильными и алкоксильными радикалами различных соединений, а также радикалами ароматических аминокислот (Fujisawa, Kadoma, 2006; Pazos et al., 2007).

Один из эффективных путей подавления окислительных процессов фенольными соединениями, в том числе флавоноидами, это хелатирование металлов, что снижает их токсическое действие на растения (Kondo, 2000; Тараховский и др., 2013). При этом реакционная способность флавоноидов по отношению к ионам металлов зависит от pH реакционной среды. Кроме того, свойства этих представителей вторичного метаболизма в составе такого комплекса отличаются от такового исходного соединения (Afanas'eva et al., 2001; Kostyuk et al., 2001). Показано, что образованные при хелатировании металлокомплексы флавоноидов и металлов обладают большей способностью связывать АФК и препятствовать окислению липидов, поскольку в этом случае флавоноиды проявляют более высокую реакционную способность по отношению к супероксидному анион-радикалу (Wang et al., 2009).

Одними из широко распространенных в растениях соединений флавоноидной природы являются антоцианы, которые сосредоточены в вакуолях клеток и представлены преимущественно их гликозидами. В присутствии ГМ количество антоцианов в высших растениях повышалось (Chalker-Scott, 2002; Полесская, 2007). И этот эффект был пропорционален

увеличению техногенных выбросов в атмосферу. Данные соединения, как и другие флавоноиды, способны обезвреживать супероксидный радикал и это позволяет им функционировать в качестве эндогенных антиоксидантов, уменьшая токсичность АФК и выступая донорами электронов для пероксидазной реакции, компенсируя таким образом недостаток эндогенных антиоксидантов (Sairam, 1998, 2002; Blokhina et al., 2003).

Антиоксидантная роль изофлавонов

Особый интерес вызывают антиоксидантные полифенольные соединения – изофлавоны. В работах Науменко В.Д. (Науменко, 2013), Барабой (Барабой, 2009) рассмотрены биологические свойства, структура и пути биосинтеза растительных изофлавонов, прежде всего изофлавонов сои (даидзеина, генистеина и глицитеина). Описана структура изофлавонов и их форм, агликонов и гликозидов, проанализированы пути биосинтеза изофлавонов. Тараховский (Тараховский, 2013) отметил, что в *Glycine max* содержится большое количество изофлавонов, где присутствуют генистеин, даидзеин и, в меньших количествах, глицитеин.

Сравнительное изучение антиоксидантного действия изофлавонов сои и феноловых кислот показало, что препарат изофлавонов сои, содержащий генистеин, генистин и дайдзеин в условиях *in vitro* в перооксидантной системе (β -каротин: линолевая кислота) оказывал выраженное антиоксидантное действие, более слабое, чем у α -токоферола, но превосходящее эффект феноловых кислот (Damasceno, 1998; Krezhova, 2011). Установлено, что изофлавоноиды как сигнальные молекулы от растений к бактериям играют важную роль в образовании азотфиксирующего симбиоза соя – *Bradyrhizobium japonicum*. Этот факт оказался важным для развития эффективных корневых клубеньков и индукции *nod*-гена у *B. Japonicum*. Азотная инокуляция повышает концентрацию даидзеина, но не влияла на генистеин. Подкормка азотом в целом снижала концентрацию изофлавоноидов в корнях сои, участвуя в регуляции клубенькообразования.

Все больше фактов показывает, что изофлавоны могут участвовать в защите от окислительного стресса, при этом могут модулировать активность стероидогенных ферментов (Gould, 2006; Fante, 2011). Эти ферменты присутствуют в надпочечниках и половых железах, но *also* во многих тканях, которые имеют возможность конвертировать циркулирующих предшественников в активные гормоны (например, мозга, печени, половых путей, жировой ткани, кожи и ткани молочной железы). Генистеин и даидзеин ингибируют активность 3 α -гидроксистероид дегидрогеназ (HSD) очищают от бычьих надпочечников микросомы (Krezhova, 2011).

Все соевые изофлавоны действуют как антиоксиданты, играют роль в очистку свободных радикалов, которые могут привести к повреждению ДНК и перекисного окисления липидов (Debroas, 1998; Orozco-Cardenas, 2001; Olmos, 2006) и активировать антиоксидантные ферменты, такие как каталаза, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидазы и глутатион-редуктазы (Ranieri, 2000). Определяющими факторами для изофлавонов деятельности антиоксидантными являются отсутствие 2, 3-двойной связи и 4-оксо-группы по изофлавонов ядра и положение гидроксильных групп, гидроксильных замещение имеет огромное значение в положении 4', умеренного значения на 5 позиции, и большого значения в положении 7. Именно поэтому G имеет более высокую антиоксидантную способность, чем даидзеин и поэтому оба имеют высокую антиоксидантную активность, чем их гликозиды. В работе T. N. Khan показано, что изофлавоны сои могут ингибировать окислительный стресс и токсичность, индуцируемую CCl₄ у животных (Khan, 2011), для растений пока антиоксидантное действие изофлавонов мало изучено.

Изофлавоны играют также важную роль как сигнальные молекулы от растений сои к бактериям в образовании азотфиксирующего симбиоза «соя – *Bradyrhizobium japonicum*», развития клубеньков и индукции nod-гена у клубеньковых бактерий, но их роль в антиоксидантной системе растений при защите от окислительного стресса остается малоизученной (Шерепитко, 2003).

Защитную функцию при действии окислительного стресса могут выполнять не только эндогенные фенольные соединения, такие как изофлавоны (Чмелева, 2018). При их недостатке или при сильнодействующем стрессе растению необходима также защита извне (Filipe, 2002). Экзогенными доступными антиоксидантными полифенолами выступают флавоноиды из лиственницы даурской, ареал которой является Амурская область. Хвоя лиственницы содержит аскорбиновую кислоту, кора и древесина – дубильные вещества, флавоноиды, антоцианы, органические кислоты. Основным продуктом переработки лиственницы является антиоксидант флавоноид – дигидрокверцетин (ДГК), выступающий экзогенным аналогом по структуре с эндогенными изофлавонами.

1.2.1.4 Высокомолекулярные антиоксиданты (ферменты) и их роль в защите растений от окислительного стресса

Обезвреживание АФК с участием ферментативных процессов возможно, если константа реакции с АФК в физиологических условиях достаточно низкая. Реакции тушения ROH , $^1\text{O}_2$, RO_2 не находятся под ферментативным контролем, поскольку их константы реакций с потенциальными реакционными партнерами в типичном окружении очень высоки (чаще $k > 10^8$) для ферментативного катализа. Биомакромолекулы повреждаются при взаимодействии с этими АФК, которые могут быть обезврежены с помощью низкомолекулярных антиоксидантов. Ферментативные системы катализируют преимущественно детоксикацию супероксидного радикала и пероксидов (Molina, 2002; Meloni, 2003; Malik, 2011; Manquian-Cerda, 2018). У высших растений, водорослей и цианобактерий эти АФК удаляются индивидуально или кооперативно такими ферментами, как супероксиддисмутаза (Kliebenstein, 1998; Alscher, 2002; Anjum, 2012), аскорбатпероксидаза, глутатионпероксидаза, неспецифические пероксидазы (пероксидазы класса III), каталаза (Кретович, 1986, 1988; Полесская, 2006, 2007; Половникова, 2018; Михайлова, 2019).

Неспецифические пероксидазы

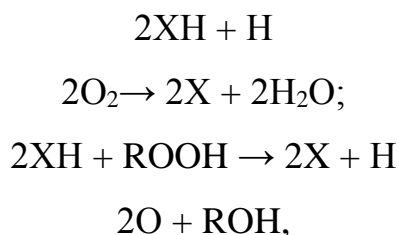
Пероксидазы класса III, или так называемые «классические»(неспецифические) пероксидазы (КФ 1.11.1.7), относятся к мультифункциональным ферментам (Андреева, 1988, Рогожин, 2004). Это глобулярный белок диаметром 50 Å, который содержит около 43% L-спиральных участков в составе белковой части молекулы. Неспецифические пероксидазы являются гемосодержащими гликопротеинами. Их простетическая группа – протогематин IX состоит из протопорфирина IX и иона Fe³⁺. Первичную структуру апофермента образуют:

- 1) одна полипептидная цепь (около 300 аминокислотных остатков, возможно образование димеров и тетрамеров);
- 2) отдельные боковые углеводные цепи – около 20 % от общей молекулярной массы, возможно отсутствие углеводов у некоторых пероксидаз); атомы кальция.

По аминокислотному составу белок пероксидазы обнаруживает некоторые особенности: в нем отсутствуют триптофан и оксипролин. Углеводы поддерживают устойчивость белка к протеолитическим ферментам, кальций участвует в сохранении структурной конформации белка, связывании пероксидазе клеточными структурами и поддержании термостабильности молекулы. Пероксидазы класса III кодируются большим количеством генов. Множественные формы пероксидаз разных растений имеют молекулярную массу от 6000 до 60 000 Да (Андреева, 1988; Плакунов, 2001; Тупик, 2008). Термостабильность молекул пероксидазы достаточно высокая. Нейтральные изоформы пероксидаз менее устойчивы и после воздействия температуры 65°C теряют 80% активности; щелочные и кислые пероксидазы более устойчивы к высокой температуре (Савич, 1989; Рогожин, 2004, 2010).

Пероксидазы – обширная группа ферментов, катализирующих реакции окисления органического и неорганического субстрата с использованием

пероксида водорода или органических пероксидов в качестве акцепторов электронов (Minkov, 2002):



где ХН – восстановленный субстрат, Х – окисленный субстрат.

Фермент широко распространен в растительной клетке, и пероксидазная активность у растений сопряжена с хромосомами, ядрышками, клеточными стенками, митохондриями и рибосомами (Алексеев, 1994). Пероксидазы могут быть классифицированы в зависимости от биологических источников их получения, либо в зависимости от природы субстратов, на которые они действуют (Dunleavy, 1982; Садвакасова, 1987; Андреева, 1989; Рогожина, 2005). К субстратам, окисляемым пероксидазами в присутствии перекиси водорода, могут быть отнесены следующие соединения: 1) практически все фенолы (пирокатехин, пирогаллол, галловая кислота, бензидин, фенилендиамин, билирубин и др.); 2) ароматические амины (аланин, диметилаланин, паратоллуидин и др.); 3) йодистый водород; 4) легкоокисляемые вещества (аскорбиновая кислота, нитриты и др.).

В зависимости от характера локализации в растительных клетках различают растворимые (вакуоли и цитоплазма), ионносвязанные (мембраны и клеточная стенка) и ковалентно связанные (в основном, клеточная стенка) формы пероксидазы, каждая из которых представлена многочисленными изоферментами (Meuchik, 2001; Liskay, 2003, Платонова, 2019). Пероксидазы являются секретлируемыми ферментами и при определенных условиях могут перемещаться из цитозоля в апопласт. Например, секреция пероксидазы в апопласт зарегистрирована как реакция клеток на патогенные элиситоры и раневой стресс (Минибаева, 2003).

Наряду с антиоксидантной функцией пероксидазная система участвует в обеспечении протекания многих других реакций, в которых пероксид

водорода используется как окислитель. Антиоксидантную защиту, связанную с восстановлением пероксида водорода, осуществляют главным образом аскорбатпероксидаза и глутатионпероксидаза. Гваяколпероксидазы катализируют окисление большого набора ароматических соединений с использованием пероксида водорода или органических пероксидов в качестве акцепторов электронов. Помимо участия гваяколпероксидаз в процессах лигнификации, распада ауксина и др., им отводят важную роль и в защите клетки от окислительного стресса (Takahama, 2000; Reyhaneh, 2005).

Поскольку образование активных форм кислорода, в том числе пероксида водорода, в настоящее время считается одним из основных механизмов системной фитоустойчивости, изменение активности растворимых пероксидаз может служить в качестве биоиндикатора развития устойчивости растения (Скрипников, 2009).

Пероксидазы при участии своих субстратов - ферментов, аминокислот и пероксида водорода могут выполнять окислительно-восстановительный процесс, в результате которого идет утилизация ненужных клетке соединений. На основании цитохимических исследований пероксидазная активность была обнаружена в цитоплазме, клеточной стенке, хромосомах и ядрышках. Пероксидазы являются индуцибельным ферментом, индукторами которого могут быть разнообразные физические, химические и биологические факторы. Доказано участие пероксидаз в дыхании растений (Андреева, 1988; Рогожин, 2004, 2010; Лапина. 2009).

Пероксидазы состоят из неокрашенного гликопротеина и соединенного с ним красно-коричневого феррипорфирина. Гем, выполняя роль активного центра, участвует в разложении или активации пероксида водорода, в результате чего возникают радикалы соответствующих субстратов. В присутствии пероксидазы регулируется созревание и строение тканей, а также синтез Минина, входящего в состав клеточных стенок. Установлено, что в составе клеточных стенок присутствуют как анодные, так и катодные формы фермента. Цитоплазма содержит, в основном, катодные пероксидазы.

Пероксидазы активируются при очень многих изменениях и нарушениях метаболизма растений, а некоторые изоэнзимы в ответ на стресс синтезируются заново. Несмотря на большой поток информации по изучаемому ферменту, физиологическая функция пероксидазы до конца не понятна, и сложность при ее изучении состоит в том, что действие фермента в нативной клетке невозможно со всей полнотой моделировать (Савич, 1989; Nazubska-Przybyl, 2013).

Длительное время считалось, что каждый фермент - это индивидуальное химическое вещество белковой природы, катализирующие определенную химическую реакцию или несколько близких реакций. Однако примерно 45 лет назад биохимик О. Варбург, изучая активность фермента альдолазы в различных условиях, наблюдал, что альдолазы выделенные из дрожжей, отличаются по ряду своих свойств от альдолаз животных тканей. Несколько позднее другие исследователи показали, что пепсин, трипсин и некоторые другие ферменты могут отличаться по ряду свойств и встречаться в различных формах (Андреева, 1988, Иваченко, 2006).

Причина таких различий между ферментами, выделенными из различных биологических объектов, была выяснена позднее, когда чистые препараты ферментов белков подвергли разделению. В результате точных экспериментов было установлено, что многие ферменты присутствуют в клетках животных, растений и микроорганизмов в виде множественных молекулярных форм (Бирюк, 2003; Минибаева, 2003; Рогожин, 2004).

Под множественными молекулярными формами ферментов (ММФФ) понимают группу ферментов, обладающих одним типом субстратной специфичности, катализирующихся по ряду физико-химических свойств (Андреева, 1988; Граскова, 2004). ММФФ встречающихся у одного и того же биологического вида, принято называть изоферментами или изоэнзимами (отличаются друг от друга по первичной структуре), как и формы, возникшие в результате эпигенетических изменений. Множественные формы (истинные) - это ферменты, синтез которых кодируется одним и тем же аллелем одного и

того же гена, у них одинаковая первичная структура и свойства, но после синтеза на рибосомах они подвергаются модификации, становятся разными, хотя и катализируют одну и ту же реакцию (Кузнецова, 2007; Платонова, 2019).

Изоферменты разные на генетическом уровне и отличаются от первичной последовательности, а истинные множественные формы становятся разными на посттрансляционном уровне (Рогожин, 2004).

Ферменты, представленные в виде одной полипептидной цепи, такие как, пероксидаза, обладают наибольшей степенью молекулярной гетерогенности (Diyendu, 2010). Их изоферментный набор состоит из кислых, щелочных и нейтральных форм. Пероксидаза выделяется не только полифункциональностью, но и полиморфностью. Количество молекулярных форм фермента в зависимости от видовых особенностей растения может колебаться от 2 до 42, активность их зависит от внешних факторов, возраста и специализации ткани, генотипических особенностей растения (Алексеев, 1994). При исследовании пероксидазы сине-зеленых и зеленых водорослей было обнаружено, что во всех водорослях содержатся множественные формы этого фермента, причем число таких форм достигает 6. Исследования показали, что количество и набор изоферментов в отдельных органах одного и того же растения заметно различается (Плешков, 1975, 1985).

Таким образом, весьма широкий спектр функций, множественность молекулярных форм, высокая чувствительность к внешним воздействиям делают пероксидазу адаптогенным ферментом с широкой экологической пластичностью. С другой стороны, существенным преимуществом использования пероксидазы в качестве модельного фермента является возможность непосредственного определения числа активных центров фермента в клетке, в то время как для подавляющего большинства ферментов эта задача неразрешима. Такая возможность позволяет разграничить количественные и качественные изменения пероксидазы, индуцированные экологическими факторами (Алексеев, 1994).

В растениях, в том числе в дикой и культурной сое, имеется сложно организованная и регулируемая система защиты (АОС) от воздействия неблагоприятных факторов внешней среды. Многие компоненты этой системы в настоящее время установлены и их роль хорошо документирована (Рогожин, 2004; Полесская, 2007; Загоскина, 2016 и др.).

Вместе с тем целый ряд вопросов, касающихся участия пероксидазы, изофлавонов, полифенола дигидрокверцетина от воздействия высоких и низких положительных температур, влияния ТМ, остается не совсем ясным. Важным также представляется изучение характера взаимодействия разных компонентов защитной системы в контроле структурной организации и функционирования АОС в условиях стресса. Особый интерес в этом плане вызывают исследования реакции компонентов АОС на молекулярном уровне, позволяющие выяснить эколого-биологические механизмы адаптации сои к стрессорам разной природы и получить новые экспериментальные данные, развивающие представления о стрессе в растениях.

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал исследования

2.1.1. В работе использовали семена культурной сои (*Glycine max (L.) Merrill*) скороспелых сортов Соната, Лидия, МК-100, среднеспелого сорта Гармония, и семена формы дикой сои (*Glycine soja Sieb. et Zucc.*) КА-1344, которые были получены из ФГБНУ ВНИИ сои (г. Благовещенск). Дигидрокверцетин и арабиногалактан марки «Лавитол» предоставлены компанией АО «Аметис» (г. Благовещенск).

2.1.2. Для анализа тканевой специфичности пероксидазы семена сои в количестве 25 штук в четырех повторностях проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге в воде в течение 1 часа, а затем с помощью препаровальной иглы отделяли семенную оболочку, семядоли и зародыши, которые использовали для приготовления белкового экстракта и определения пероксидазной активности.

2.1.3. Для исследования влияния температуры на пероксидазную активность семена сои в количестве 25 штук в 4-х повторностях проращивали в течение 5 часов при температурах +4°C, +10°C, +23°C, +37°C, +42°C и +45°C.

2.1.4. Влияние солей ТМ (PbSO_4 , CdSO_4 , ZnSO_4 , CuSO_4) на активность пероксидаз сои изучали в разные вегетационные периоды. Объект исследований – соя сорта МК-100. Сою выращивали в тепличных условиях в 2011-2013 годах в почве с внесением сульфатов биогенных (меди, цинка) и токсичных (кадмия и свинца) ТМ в концентрациях, в 2 раза превышающих ОДК и в 10 раз – содержание металла в почве (Ознобихина, 2019). Каждый опыт проводился в 20 повторностях и длился 17 дней до появления первого тройчатого листа и 41 день до периода цветения. Контрольными являлись образцы, выращенные на почве без внесения солей ТМ. На каждом этапе вегетации проводили сбор материала, который хранили при температуре –20°C.

2.1.5. Воздействие солей ZnSO_4 , CuSO_4 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, CdSO_4 различной концентрации (а – $5 \times 10^{-4}\text{M}$, б – $5 \times 10^{-5}\text{M}$, в – $5 \times 10^{-6}\text{M}$) с добавлением ДГК в

концентрации $3 \times 10^{-6} \text{M}$ изучали при проращивании семян сои количестве 25 штук в четырех повторностях в течение 5-ти часов, а также количестве 25 штук в четырех повторностях в течение 5-ти суток, где концентрация металлов была как в предыдущем опыте, а ДГК использовался в 2-х концентрациях: $3 \times 10^{-5} \text{M}$ и $3 \times 10^{-6} \text{M}$. В качестве контроля для проращивания семян использовали дистиллированную воду.

2.1.6. Для определения устойчивости проростков сои к влиянию температурного стресса с участием ДГК, изофлавонов и пероксидаз семена выдерживали в течение 5 часов в чашках Петри в количестве 25 штук в четырех повторностях при температурах $+4^\circ\text{C}$ и $+45^\circ\text{C}$, далее проростки проращивали при нормальных условиях ($+23^\circ\text{C}$) в течение 5 суток.

2.1.7. Для изучения роли пероксидаз ДГК, АГ и их комплексов в адаптации семян сои проращивали в чашках Петри в количестве 25 штук в четырех повторностях в течение 5 часов при добавлении ДГК и АГ в концентрациях $6 \cdot 10^{-5} \text{M}$ и комплексов ДГК: АГ в соотношениях (1:3), (1:5), (1:10), (1:20), (1:50), (1:100) (Остронков, 2014). Контролем являлись семена сои, пророщенные в дистиллированной воде.

2.1.8. Для изучения влияния ДГК, АГ и их комплексов на биометрические показатели, в том числе урожайность сои проводили полевой эксперимент на опытном участке АО «Аметис» (Благовещенский район). Методика проведения исследований и схема полевого опыта. Исследования проводили в 2012-2014 годах путем постановки полевых мелкоделяночных опытов по Доспехову (Доспехов, 1985). Объект исследований – соя сорта МК-100. Полевой опыт проводился в четырехкратной повторности, размещение делянок систематическое со смещением, размер делянки 20 м^2 . Подготовка почвы состояла согласно схеме опыта из следующей систем обработки почвы: вспашка культивированием стерни на 8...10 см (БДМ 3x4). Посев проводили ручным способом по 2 семени через каждые 10 см.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Получение экстрактов растворимых белков сои для анализа пероксидазной активности.

Навеску семян (0,5 г) гомогенизировали в фарфоровых ступках в течение 15 минут на льду. Растворимые белки экстрагировали 15 мл ацетатным буфером (рН=4,7). Полученный экстракт центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 минут. Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость фильтровали через мельничную газ и использовали для определения активности пероксидаз сои (Филиппович, 1982; Плешков, 1985).

2.2.2. Определение белка методом Лоури.

Анализ проводили в двух биологических и трех аналитических повторностях (Кочетов, 1980). Метод основан на реакции белков с реактивом Фолина, в результате которой образуются соединения, окрашенные в синий цвет. При определенных концентрациях белка интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации белка в растворе (Lowry, et. al., 1951). Метод используют для определения белка в растворах с концентрацией от 10 до 300 мкг в 1 мл. Поскольку концентрация белка в экстрактах сои высокая, а метод очень чувствительный, то проводили соответствующее разбавление. Измерения проводили на фотоэлектроколориметре (КФК-3, Россия) в кюветах с толщиной оптического слоя 1 см при 750 нм по отношению к контролю.

Калибровочный график строили по серии растворов известной концентрации бычьего сывороточного альбумина. Определение проводили в трех повторностях. В качестве контроля использовали 1 мл дистиллированной воды. Концентрацию (мкг/мл) белка рассчитывали по калибровочному графику с учетом разведения в экстракте.

2.2.3. Определение удельной активности пероксидаз семян сои фотоколориметрическим методом.

Активность пероксидаз сои определяли фотометрическим методом по Бояркину в модификации Мокроносова (Мокроносов, 1994; Ермаков, 1987) на фотоэлектрическом концентрационном колориметре марки КФК-2 по изменению оптической плотности. В качестве субстрата использовали бензидин солянокислый ($C_{12}H_{12}N_2$, Cas [92-87-5], ТУ 6-09-4222-76, основное вещество не менее 99.5%).

В две кварцевые кюветы с толщиной оптического слоя 20 мм приливали 0,02-0,1 мл вытяжки в зависимости от общей активности фермента, 4 мл ацетатного буфера (pH=4,7) и 3 мл бензидина солянокислого. Кюветы в колориметре фотоэлектрическом концентрационном располагали против светофильтров при 670 нм. Устанавливали стрелку гальванометра на нуль. Автоматической пипеткой вносили в открытую кювету 0,5 мл раствора 0,3% H_2O_2 и одновременно включали секундомер. Быстро закрывали кюветную камеру и по шкале оптической плотности следили за развитием синей окраски. По секундомеру замечали время достижения необходимой оптической плотности (0,5). Активность рассчитывали по формуле:

$$A = D \alpha \beta \gamma / td$$

A – активность, выраженная в относительных единицах на 1 г сырой массы за 1 с.

D – зарегистрированная в опыте оптическая плотность.

$\alpha \beta \gamma$ – факторы разведения:

α – отношение количества жидкости, взятой для приготовления вытяжки, мл, к массе навеске, г;

β – степень дополнительного разведения вытяжки после центрифугирования, (если требовалось);

γ – степень постоянного разведения вытяжки в кювете.

Активность пероксидаз определяли в двух биологических и трех аналитических повторностях. Удельную активность выражали в единицах активности на мг белка. $A_{уд.} = A/N$

N – количество белка в пробе, мкг/мл

2.2.4. Статическую обработку материала и расчет коэффициентов корреляций проводили в изложении Плохинского. Все результаты обработаны статистически в программе Excel, на графиках представлены средние арифметические значения и их стандартные отклонения (Плохинский, 1971; Доспехов, 1985).

2.2.5. Определение множественных форм пероксидазсои методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ)

Для изучения множественных форм пероксидаз использовали метод электрофореза в полиакриламидном геле (Devis, 1964). Зоны множественных форм пероксидаз на электрофореграмме называли электрофоретическим спектром (Остерман, 1981). Электрофорез проводили в трубках, заполненных гелем и размещённых между резервуарами, в которые помещены электроды. После окрашивания измеряли расстояния от начала разделяющего геля до белковых полос. Отношение этого расстояния к пробегу красителя использовали как меру подвижности, называли электрофоретической подвижностью и обозначали R_f . Для анализа использовали неочищенные тканевые экстракты (Сафонов, 1971; Андреева, 1988). Выявление множественных форм ферментов пероксидаз после электрофореза проводили бензидиновым реагентом в ацетатном буфере с $pH=4,7$. Гели из трубочек помещали на 20 минут в бензидиновый реагент, а затем переносили в 0,1% водный раствор пероксида водорода, после проявления форм пероксидаз в виде синих полос, переходящих через некоторое время в буры, рассчитывали электрофоретическую подвижность (Садвакасова, 1987).

2.2.6. Определение содержания изофлавонов.

Анализ содержания изофлавонов сои проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в комбинации со спектроскопией в УФ-области спектра на хроматографе «Милихром А-02» при условиях элюирования: колонка с сорбентом ProntoSil C18, размер частиц

5 мкм (Grynkevich, 2005; Khodakov, 2013). Подвижная фаза: 2-х ступенчатый градиент 0,1% уксусной кислоты – ацетонитрил. I ступень: от (85:15) до (40:60) в течение 20 минут, II ступень: от (40:60) до (0:100) в течение 6 минут, скорость потока 150,0 мкл/мин, температура колонки +35 °С. Детектор спектрофотометрический, длина волны 290 нм, шкала 0,01 AUFS. Обработку полученных хроматограмм проводили в программе «Мультихром». В качестве аналитических стандартов использовали изофлавоны производства фирмы Sigma Aldrich: генистин (lot G0897, содержание основного вещества 99,5), даидзин (lot 30408, содержание основного вещества 99,0), глицитин (lot G1296, содержание основного вещества 99,2).

2.2.7. Анализ содержания тяжелых металлов

Содержание ТМ (медь, цинк, кадмий, свинец) в почве и в растениях анализировали методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии на атомно-абсорбционном спектрофотометре АА-6800 «Shimadzu» (Япония) после минерализации тканей смесью концентрированных азотной и хлорной кислот (1:3, об/об) непосредственно в почвенных вытяжках и растворах золы растений без предварительного концентрирования (Семендяева, 2013). Данный метод основан на явлении селективного (избирательного) поглощения (абсорбции) резонансного излучения определяемого элемента атомным паром исследуемого вещества. Превращение анализируемой пробы из жидкого (или твердого) состояния в атомный пар происходил в анализаторе. Пар вводился в аналитическую зону анализатора, просвечиваемую источником излучения с линейчатым спектром изучаемого элемента. Анализ растворов выполняли, сравнивая с их поглощением растворов известной концентрации, приготовленных с тем же растворителем, который применяли для получения анализируемых растворов. Для атомизации анализируемых растворов применяли воздушно-ацетиленовые пламя.

2.2.6. Анализ содержания малонового диальдегида

Об уровне перекисного окисления липидов (ПОЛ) судят по накоплению продукта ПОЛ – малонового диальдегида (МДА). С содержанием МДА определяли по методу с применением тиобарбитуриевой кислоты (Сибгатуллина, 2011). Растительные ткани гомогенизировали в 20 мл 0.1% раствора ТХУ (трихлоруксусной кислоты). Затем гомогенат центрифугировали (Весман J-21) при 12 тыс. об./мин в течение 10 мин при температуре -3°C . Затем к 1мл супернатанта добавляли 4 мл 20% ТХУ, содержащей 0.5% тиобарбитуриевой кислоты и 1мл меркаптоэтанола. Смесь нагревали на водяной бане при температуре $+95^{\circ}\text{C}$, в течение 30 мин и сразу охлаждали во льду. Смесь вновь центрифугировали при тех же условиях (12 тыс. об./мин, 10 мин). Оптическую плотность супернатанта измеряли при двух длинах волн – 532 и 600 нм на Ultraspec-II. Содержание МДА рассчитывали с использованием коэффициента экстинкции, равным $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, после вычисления неспецифического поглощения при 600 нм.

Расчет производят по формуле: $C = ((\Delta D/155) \cdot X \cdot V) / ((m \cdot \Delta m) \cdot 1)$,

где: C – количество МДА, ммоль/г сухого веса, ΔD – разность оптической плотности образца при 532 нм и 600 нм, 155 – коэффициент экстинкции МДА при 532 нм, $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, X – разведение (общий объём реакционной смеси разделить на количество вносимого образца экстракта), V – объём вытяжки, мл, m – масса сырой навески, г, Δm – отношение сухого веса к сырому (см. гл. 5.1.), 1 – длина оптического пути, см. Измерения проводили в трёх биологических и двух аналитических повторностях (Всего 6 повторностей).

ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕМПЕРАТУРНОГО ВЛИЯНИЯ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПЕРОКСИДАЗ СЕМЯН КУЛЬТУРНОЙ И ДИКОЙ СОИ

3.1. Физико-химические свойства пероксидаз семян культурной и дикой сои

Анализ пероксидазной активности семян сои показал, что фермент обладает тканевой специфичностью (табл. 1, рис. 2).

Установлено, что удельная активность пероксидаз семян сои значительно различается в зависимости от вида ткани семени (табл. 1). Исследования проводили в двух биологических и трех аналитических повторностях. Все результаты обработаны статистически в программе Excel, на графиках представлены средние арифметические значения и их относительные отклонения. Минимальная удельная активность пероксидаз выявлена в семядолях, составляет 3,8 ед/мг белка, а максимальная – в семенной оболочке, значение ее составляет 6099,2 ед/мг белка. Минимальная активность пероксидаз семядолей объясняется наличием в их составе запасных питательных веществ, основным веществом семядолей являются белки неферментной природы. Семенная оболочка защищает семя от воздействия разнообразных факторов внешней среды. Наличие высокой удельной активности пероксидаз в семенной оболочке культурной сои дает возможность предположить, что пероксидаза, которая входит в состав антиоксидантной системы, определяет уровень устойчивости растений к различным воздействующим факторам.

Таблица 1

Удельная активность пероксидаз семян культурной сои

А _{уд.} (ед/мг белка)	зародыши	семядоли	семена	семенная оболочка
	109,5 ± 1,7	3,8 ± 0,1	346,4 ± 4,5	6099,2 ± 60,5
НСР _{0,5}	1,6			

Анализ множественных форм пероксидаз показал, что количество форм фермента также различается в зависимости от вида ткани семени (рис. 2).



Рис.2. Схемы энзимограмм пероксидаз сои сорта Соната (1 – зародыши, 2 – семядоли, 3 – семена, 4 – семенная оболочка). Справа на энзимограммах на данном рисунке и далее по тексту указана нумерация выявленных форм фермента согласно их Rf (Иваченко, 2012)

В зародыше выявлено всего две формы фермента П17 (высокомолекулярная форма) и П6 (форма со средней электрофоретической подвижностью), в семядолях – четыре формы П5, П8, П15 и П17, которые обнаружены также в целых семенах наряду с низкомолекулярными формами П2 и П1. В семенной оболочке выявлено 9 множественных форм пероксидаз с разной электрофоретической подвижностью, 6 из которых обнаружены в целых семенах, а 3 формы найдены только в семенной оболочке – П13, П10 и П3. Это, очевидно, связано с большей интенсивностью окислительно-восстановительных процессов в семенной оболочке.

Таким образом, в семенах сои при тканевом анализе всего выявлено 9 форм пероксидаз, отличающихся Rf и тканевой специфичностью. Форма П17 установлена во всех исследуемых образцах.

Скорость энзиматической реакции зависит от природы фермента, характеризующегося низкой или высокой активностью. При прочих равных условиях и при наличии избытка субстрата и кофакторов начальная скорость

энзиматической реакции пропорциональна концентрации фермента (рис.3). Установлено, что при малых концентрациях белка активность пероксидаз возрастает постепенно, а при больших – значительно быстрее.

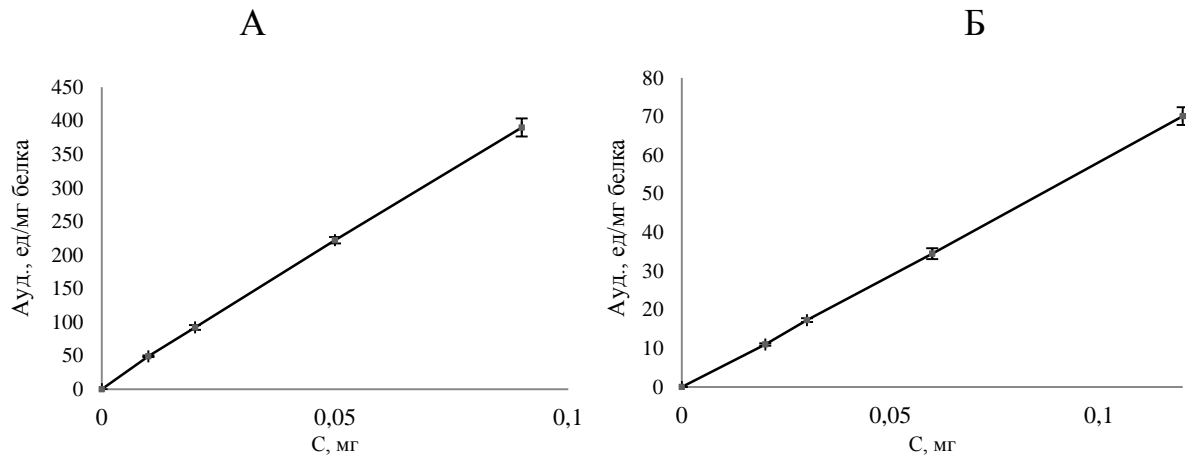


Рис. 3. Зависимость удельной активности пероксидаз семян культурной (А) и дикой (Б) сои от концентрации белка (С, мг)

Зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата выражается в виде логарифмической кривой. При низком содержании субстрата в системе наблюдается отчетливая зависимость между его концентрацией и скоростью реакции. При больших концентрациях подобное влияние отсутствует (рис. 4).

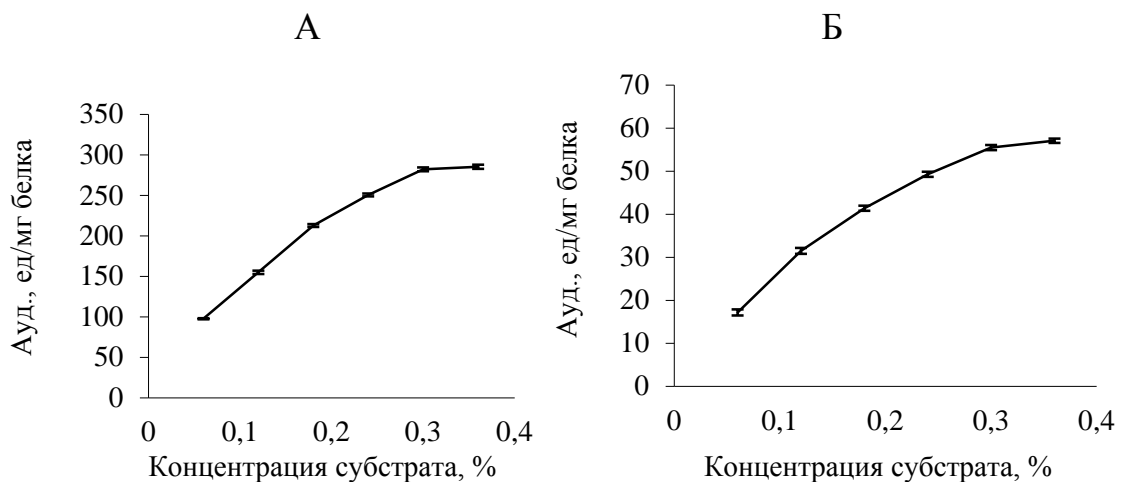


Рис. 4. Зависимость активности пероксидаз семян дикой (а) и культурной (б) сои от концентрации субстрата

Постоянную скорость, наблюдаемую в реакции при избытке субстрата, полностью насыщающего фермент, называется максимальной скоростью энзиматической реакции. Пероксидазная активность семян дикой и культурной сои достигает максимальной активности при 0,3% концентрации субстрата, а дальнейшее увеличение концентрации не приводит к изменению активности (рис.4).

Разные ферменты активны при различных значениях рН. При рН выше и ниже оптимальной их активность снижается. Оптимум рН обычно находится в пределах, близких к нейтральной среде, для некоторых энзимов - в кислой или щелочной области. Эффект рН складывается из влияния на стабильность фермента и на величину ионизации функциональных групп его белковой части, субстратов и кофакторов.

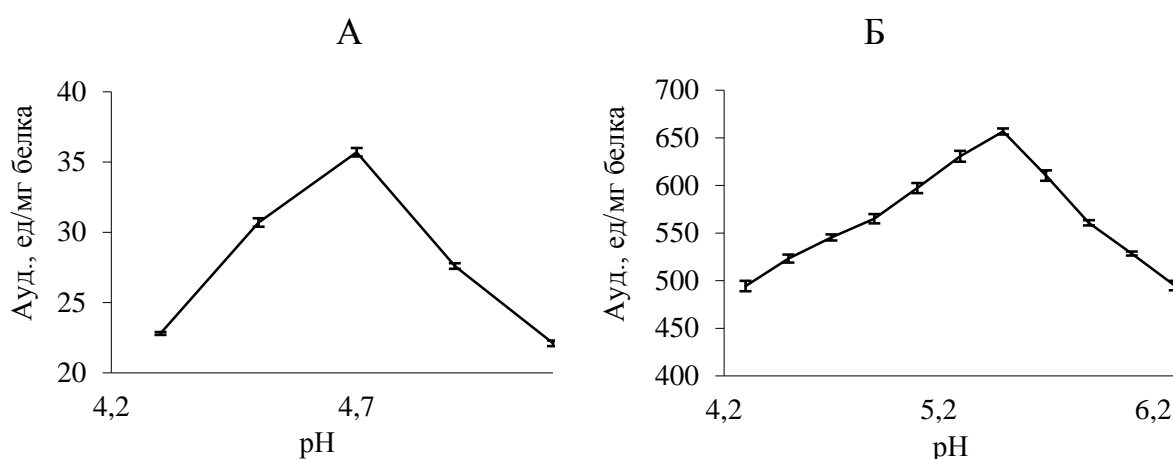


Рис. 5. Зависимость удельной активности пероксидаз семян культурной (А) и дикой (Б) сои от рН среды

Метаболическая регуляция на примере регуляции рН. Метаболическую систему регуляции, которая основана на изменении активности ферментов, называют также ферментной. Поскольку активность ферментов зависит от рН, а влияние стрессоров приводит обычно к снижению рН цитоплазмы, регуляция внутриклеточного рН в условиях стресса приобретает особое значение. Действительно, закисление цитоплазмы возможно не только при стрессовых воздействиях, но и в нормальных физиологических условиях, когда вход протонов преобладает над их выходом. Вероятно, поэтому

растительные клетки приобрели уникальный биохимический рН-стат для поддержания протонного гомеостаза.

Для экспериментального определения оптимума рН измеряли скорость ферментативной реакции, используя буферные растворы с различными значениями водородного показателя. На кривую зависимости активности фермента от рН существенное влияние могут оказывать такие факторы, как состав буфера и величина ионной силы. Для семян культурной сои пик активности пероксидаз выявлен при рН 4,7, а для дикой сои – при рН 5,5. (рис. 5).

3.2. Характеристика устойчивости семян культурной и дикой сои к воздействию температур с участием пероксидаз

Нами показано, что при температурах +4 и +45 °С в семенах дикой и культурной сои повышается содержание МДА в отличие от содержания при +23 °С (нормальные условия) (табл. 2).

Таблица 2

Уровень МДА, нмоль/г сухого веса в семенах дикой и культурной сои в различных температурных условиях при проращивании в течение 5 часов

Температура, °С	+4	+10	+23	+37	+42	+45
Дикая соя	4,86±0,23	2,56±0,17	2,12±0,11	2,24±0,13	2,54±0,18	5,96±0,34
Культурная соя	3,4±0,11	2,02±0,10	1,80±0,09	2,11±0,12	2,36±0,17	4,12±0,25

Для дикой – при +4 °С количество МДА повышается с 2,12 до 4,86, при +45 °С – до 5,96, для культурной – при +4 °С возрастает с 1,80 до 3,4, при +45 °С – до 4,12, что характеризует наличие температурного стресса в семенах сои (табл. 2).

Пероксидаза является ферментом, регулирующим уровень перекисных соединений. Доказано ее участие в азотном обмене, ростовых процессах, в ее

присутствии регулируются созревание и старение тканей, а также синтез лигнина, входящего в состав клеточных стенок, проницаемость клеточных мембран (Минибаева, 2003). Некоторые пероксидазы обладают наибольшим сродством к искусственному субстрату. Это предполагает, что пероксидазы выполняют защитную функцию, защищая клетки от действия стрессоров различной природы (Лапина, 2009).

Результаты исследования удельной активности пероксидаз семян сои различного филогенетического происхождения показали, что фермент высокоактивен в семенах дикой сои. Способность пероксидазы сохранять каталитическую активность при низких температурах непосредственно связана с внутримолекулярной подвижностью его структуры.

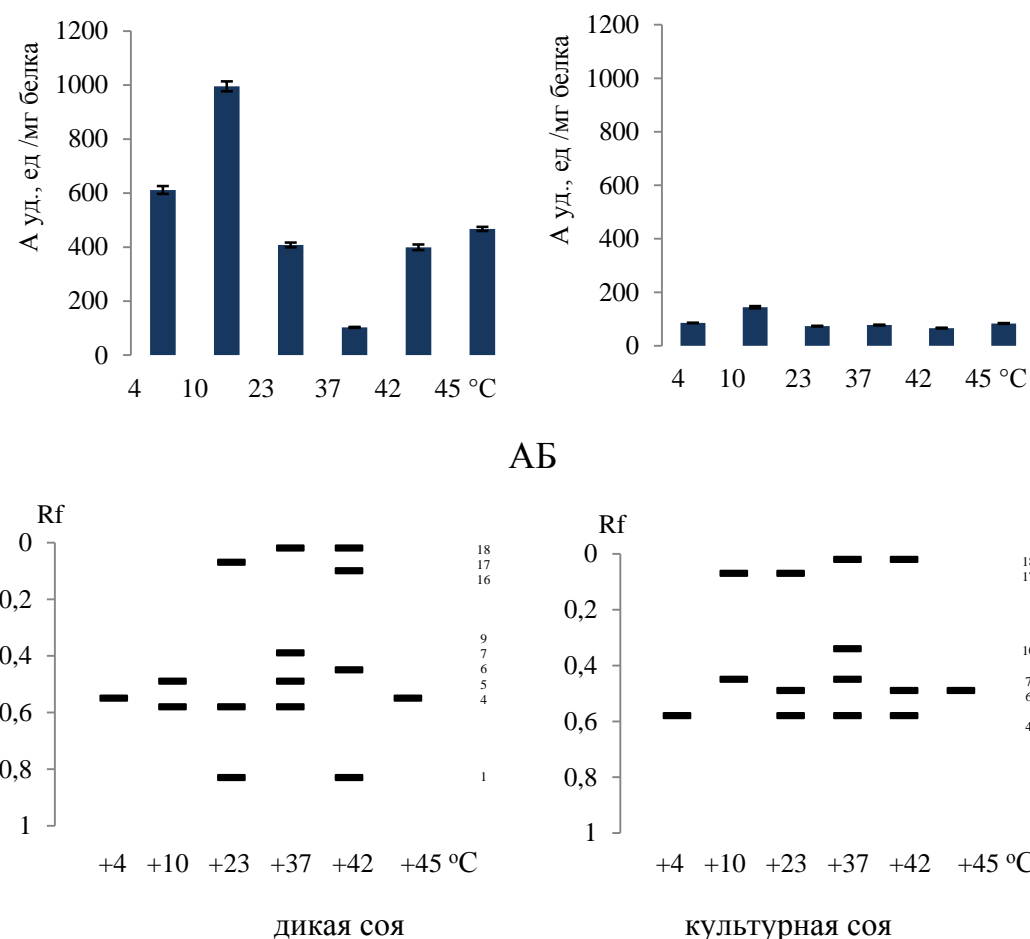


Рис. 6. Удельная активность (А) и схема энзимограмм пероксидаз (Б) семян семян дикорастущей и культурной сои в условиях температурного стресса. Здесь и далее справа на энзимограммах указана нумерация выявленных форм фермента согласно их Rf (Иваченко, 2011)

Существование дискретных функциональных температурозависимых структурных состояний фермента как в растворе, так и в мембране имеет не только регуляторное, но и важное экологическое значение. Самая высокая удельная активность фермента выявлена при температуре $+10^{\circ}\text{C}$ (рис.6).

При повышении температуры до $+42-45^{\circ}\text{C}$ удельная активность пероксидаз семян сои изменялась незначительно, что можно объяснить процессами денатурации белков.

Методом электрофореза установлено, что при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ и $+45^{\circ}\text{C}$ в семенах дикой сои появилась только одна форма пероксидаз со средней электрофоретической подвижностью П5, а в семенах культурной сои – форма П6 (рис. 6). При других температурах выявились высокомолекулярные формы с низкой электрофоретической подвижностью, которые обуславливают более высокую активность фермента. Проращивание семян культурной сои при температуре $+23^{\circ}\text{C}$, $+37^{\circ}\text{C}$ и $+42^{\circ}\text{C}$ привело к возникновению дополнительных форм пероксидаз со средней электрофоретической подвижностью и невысокой активности фермента. Появление этих же форм со средней электрофоретической подвижностью семян дикорастущей сои, пророщенных при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ снижало активность фермента до минимума. При температуре $+23^{\circ}\text{C}$ и $+42^{\circ}\text{C}$ только в семенах дикой сои были обнаружены формы с высокой Rf.

Получено, что реакция сои на температурный стресс при разных температурах имеет качественно различный характер, поэтому механизмы обеспечения их устойчивости, которые выражаются в изменении активности пероксидаз, неодинаковы. Это может быть связано с синтезом стресс-белков, в том числе пероксидаз, которые выполняют защитные функции. Увеличение количества множественных форм пероксидаз является следствием процесса адаптации сои к температурному стрессу. Выявлены несколько форм пероксидаз семян сои с высокой термоустойчивостью. Адаптивные конформационные перестройки пероксидаз, позволяющие ей

функционировать при низких температурах, способствуют устойчивости сои к низким температурам в условиях Амурской области. Существование таких экологически обусловленных термосостояний пероксидазы в растениях сои вытекает из хорошо известного факта о том, что адаптация организма к низким температурам сопровождается выработкой вариантов фермента, у которого зависимость активности от температуры находится в соответствии с термической экологией вида (Алексеев, 1994).

3.3. Оценка устойчивости проростков сои к температурному стрессу в течение 5 суток с участием пероксидаз, изофлавонов и ДГК

Помимо тяжелых металлов сильное воздействие на проростки сои оказывают температурные перепады. Для Амурской области колебания температур является одним из ключевых факторов, влияющих на растения, т.к. климат области является резко континентальным. Летом часто наблюдаются низкие (+4°C) и высокие (+45°C) положительные температуры.

В ранее проведенном эксперименте по влиянию температуры на семена сои в течение 5 часов определено, что при температуре +4°C и +45°C повышается уровень малонового диальдегида, соответственно данные температуры вызывают окислительный стресс в семенах сои.

В проведенном эксперименте определена совместная роль ДГК, изофлавонов и пероксидаз в формировании устойчивости проростков сои к воздействию низкой положительной температуры +4°C и высокой положительной температуры +45°C в течение 5 часов и дальнейшем проращивании проростков в течение 5 суток (определение устойчивости проростков к температурному стрессу).

Установлено, что при влиянии температуры +4°C в течение 5 суток на проростки сои уровень МДА повышается в 2 раза по сравнению с контрольными образцами и составляет 4,12, а при влиянии температуры +45°C повышается в 2,35 раз по сравнению с контрольными образцами, что характеризует наличие

процессов окислительного (температурного) стресса в проростках сои при влиянии данных температур (табл. 3).

Таблица 3

Уровень МДА, нмоль/г сухого веса в проростках культурной сои при влиянии температур +4°C и +45°C в течение 5 часов и дальнейшем проращивании при нормальных условиях (+23°C) в течение 5 сут (без добавления и с добавлением ДГК)

Температура, °С (внесение ДГК)	+23 (контроль)	+4 + ДГК $3 \times 10^{-5} \text{M}$	+4	+45 + ДГК $3 \times 10^{-5} \text{M}$	+45
Уровень МДА, нмоль/г сухого веса	2,11±0,12	4,12±0,33	3,42±0,31	4,96±0,28	2,80±0,14

Добавление ДГК в среду для проращивания сои при изученных температурах снижает уровень МДА, способствуя повышению устойчивости проростков сои к воздействию температурного стресса, что связано с антиоксидантным действием ДГК.

Проращивание семян сои при температуре +4°C в течение 5 часов стимулирует ростовые процессы сои по сравнению с проращиванием при температуре +23°C, а проращивание семян в течение 5 часов при температуре +45°C затормаживает ростовую активность проростков. Добавление ДГК в среду для проращивания семян сои в концентрации $3 \times 10^{-5} \text{M}$ улучшает показатели ростовых процессов.

Так совместное влияние ДГК и температуры +4°C улучшает биометрические показатели через 5 суток на 50%, совместное влияние ДГК и температуры +45°C приводит значения показателей до показателей контрольных образцов, выращенных при температуре +23°C, что показывает защитную функцию ДГК (рис. 7).

Проращивание семян сои при температуре +4°C в течение 5 часов незначительно повышает удельную активность пероксидаз (на 17%) по сравнению с контрольным образцом, выращенным при нормальных условиях. Добавление ДГК в эту среду увеличивает активность пероксидаз на 28%.

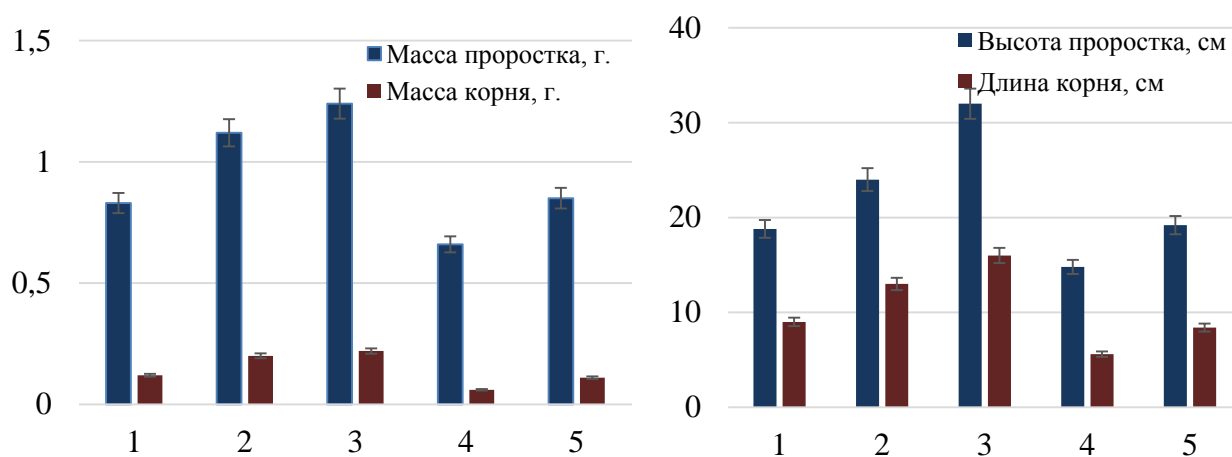


Рис. 7. Биометрические показатели проростков сои при влиянии температур +4°C и +45°C в течение 5 часов и дальнейшем проращивании при нормальных условиях (+23°C) в течение 5 суток (без добавления и с добавлением ДГК). (1 – контроль, 2 – +4°C, 3 – +4°C + ДГК (3x10⁻⁶М), 4 – +45°C, 5 – +45°C + ДГК (3x10⁻⁶М)

Проращивание семян сои при температуре +45°C в течение 5 часов снижает удельную активность пероксидаз на 30% по сравнению с контрольным образцом, а добавление ДГК в данные условия проращивания повышает удельную активность практически до уровня контроля (рис. 8).

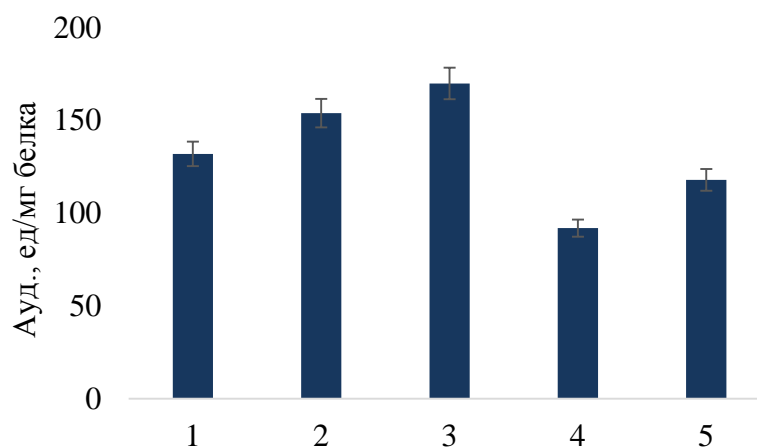


Рис. 8. Удельная активность пероксидаз проростков сои при влиянии температур +4°C и +45°C в течение 5 часов и дальнейшем проращивании при нормальных условиях (+23°C) в течение 5 суток (без добавления и с добавлением ДГК) (1 – контроль, 2 – +4°C, 3 – +4°C + ДГК (3x10⁻⁶М), 4 – +45°C, 5 – +45°C + ДГК (3x10⁻⁶М)

Таким образом, добавление ДГК в среду для проращивания приводит к стимулированию пероксидазной активности.

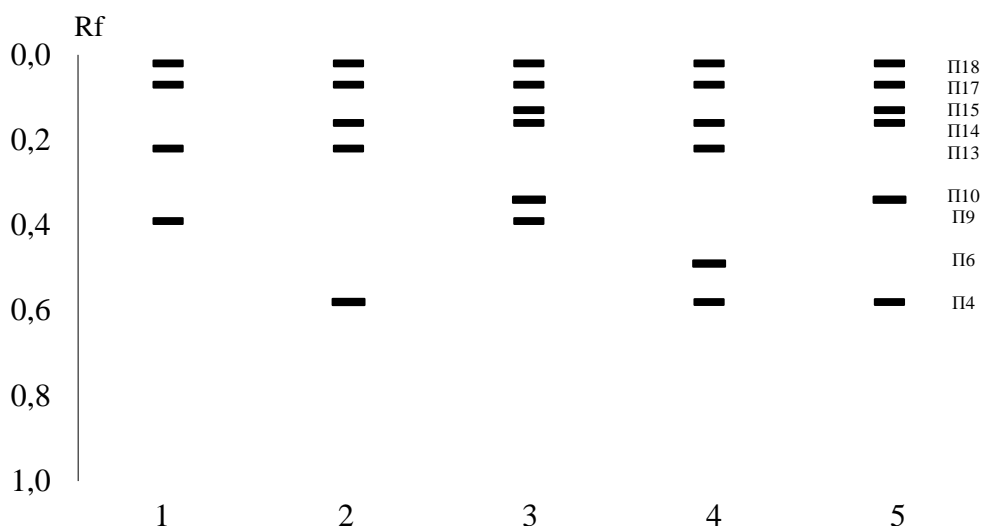


Рис. 9. Схемы энзимограмм пероксидаз проростков сои при влиянии температур +4°C и +45°C в течение 5 часов и дальнейшем проращивании при нормальных условиях (+23°C) в течение 5 суток (без добавления и с добавлением ДГК) (1 – контроль, 2 – +4°C, 3 – +4°C + ДГК ($3 \times 10^{-6} \text{M}$), 4 – +45°C, 5 – +45°C + ДГК ($3 \times 10^{-6} \text{M}$)).

Одновременное присутствие в клетках множественных молекулярных форм одного и того же фермента наряду с другими механизмами регуляции способствуют согласованности процессов обмена веществ в клетке и быстрой адаптации растения к изменениям внешней среды (Андреева, 1988; Попов, 2003). При анализе электрофоретических спектров установлено, что во всех образцах сои через 5 дней проращивания присутствует МФ П17 и П18 (рис. 9). В контрольном образце обнаружено 4 множественных формы П9, П13, П17 и П18.

Ранее показано, что проращивание семян при температуре +4°C в течение 5 часов приводит к образованию только одной формы пероксидаз П5 (п. 3.2, рис.6). Дальнейшее проращивание семян в течение 5 суток приводит к исчезновению данной формы, но появляются 5 других форм П4, П13, П14, П17 и П18, которые принимают участие в длительной адаптации и функционируют при окислительном стрессе. Внесение ДГК в среду для проращивания вызывает исчезновение форм П4 и П14, но появляются новые формы, функционирующие в данных условиях П9, П10 и П15, которые, видимо, способствуют лучшей адаптации к окислительному стрессу, что

подтверждается снижением количества МДА и приводит к улучшению ростовых показателей проростков сои.

В ранее проведенных экспериментах установлено, что проращивание семян при температуре $+45^{\circ}\text{C}$ в течение 5 часов приводит к образованию только одной формы пероксидаз П6, принимавшей участие в быстрой адаптации сои к высокой температуре $+45^{\circ}\text{C}$ (п. 3.2, рис.6). При дальнейшем проращивании растений в течение 5 суток происходит появление 5 дополнительных форм П4, П13, П14, П17 и П18, которые принимают участие в длительной адаптации и функционируют при окислительном стрессе.

При добавлении ДГК в среду для проращивания происходит исчезновение форм П6 и П13, но появляются новые формы, функционирующие в данных условиях П10 и П15, которые, видимо, способствуют лучшей адаптации к окислительному стрессу, что подтверждается снижением количества МДА и приводит к улучшению биометрических показателей проростков сои до уровня контроля.

Таким образом, самыми адаптивными формами к условиям среды являются П17 и П18. При процессе длительной адаптации проростков сои к окислительному стрессу, вызванному низкими положительными и высокими температурами, появляются новые формы, устойчивые к воздействию окислительного стресса. Внесение ДГК в среду для проращивания вызывает появление форм П9, П10 и П15, способствующие более лучшей устойчивости к влиянию температур, что подтверждается снижением уровня МДА и улучшением биометрических показателей проростков сои.

Успешная адаптация сои к резким суточным и сезонным перепадам температур предполагает, очевидно, экологическую подгонку геометрии молекулы пероксидазы к наиболее выгодной оптимальной конфигурации. В результате увеличивается информационная подвижность белковой глобулы пероксидазы, что позволяет ей сохранять каталитическую активность в широком диапазоне как низких положительных, так и высоких температур. Литературные данные (Алексеев, 1994) свидетельствуют о том, что изменение

конформации фермента в процессе адаптации растения к холоду и жаре – скорее правило, чем исключение.

В ответ на действие стрессового или любого неблагоприятного фактора в клетках растений резко повышается количество фенольных соединений (Shalata, 2001; Загоскина, 2005, 2010). Таким же образом клетки растения реагируют и при механических повреждениях или проникновениях патогена в клетку. Это доказывает участие фенольных соединений в защитных функциях растений (Lee, 2018). Практически все фенольные соединения являются универсальными компонентами растительной ткани, участвуют в клеточном обмене и играют существенную роль в таких важнейших для растения физиологических процессах как дыхание и фотосинтез (Запрометов, 1996; Ivanova, 2012; Cheynier, 2013). В целом фенольные соединения играют важную роль в обмене веществ растительной клетки и по праву отнесены к биологически активным веществам (Барабой В.А., 2009). Интересно рассмотреть роль фенольных соединений в защите растений от окислительного стресса.

Антиоксидантные свойства изофлавонов предлагает дополнительный важный механизм, посредством которого они защищают от различных воздействий (Pulido, 2000). Для анализа изофлавонов в сое была разработана методика определения хроматографическим методом на ВЭЖХ «Милихром А-02». Подобраны наиболее оптимальные условия элюирования для наибольшей эффективности разделения пиков изофлавонов.

Анализ содержания изофлавонов в проростках сои, выращенных при нормальных условиях, выявил высокие концентрации глицитина и генистина и низкую – даидзина (рис. 10).

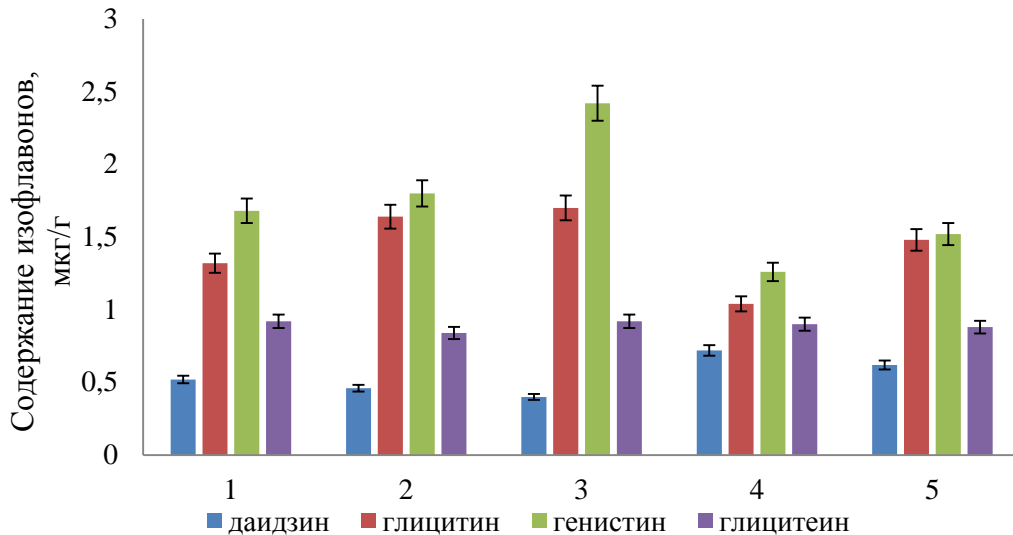


Рис. 10. Уровень изофлавонов в проростках сои, выращенных при при влиянии температур +4°C и +45°C в течение 5 часов и дальнейшем проращивании при нормальных условиях (+23°C) в течение 5 суток (без добавления и с добавлением ДГК) (1 – контроль, 2 – +4°C, 3 – +4°C + ДГК (3×10^{-6} М), 4 – +45°C, 5 – +45°C + ДГК (3×10^{-6} М))

Проращивание семян сои при температуре +4°C в течение 5 часов вызывает снижение количества даидзина на 12 %, содержание глицитина и генистина при этом повышается, количество глицитеина не изменяется, что свидетельствует об ответной реакции растения на температурный стресс. Внесение ДГК в эту среду приводит к увеличению количества даидзина на 33%, глицитина на 29%, генистина на 44%, количество глицитеина при этом не изменяется. Проращивание семян сои при температуре +45°C в течение 5 часов и дальнейшем проращивании при нормальных условиях (+23°C) в течение 5 суток приводит к увеличению содержания даидзина, снижению глицитина и генистина, содержание глицитеина при этом не изменяется, добавление ДГК приводит показатели содержания всех исследуемых изофлавонов к значениям содержания изофлавонов в контрольных проростках.

Таким образом, проращивание сои в течение пяти суток при при влиянии температур +4°C и +45°C в течение 5 часов и дальнейшем проращивании при нормальных условиях (+23°C) в течение 5 суток приводит к проявлению окислительного (температурного) стресса в проростках, при этом

уменьшается уровень МДА, изменяется активность пероксидаз, содержание изофлавонов и биометрические показатели в зависимости от условий проращивания.

Установлено, что внесение ДГК оказывает защитную функцию проростков сои от температурного стресса, вызванного низкой положительной +4°C и высокой +45°C температурами, значительно снижая при этом уровень МДА. Полученным результатам можно сделать вывод, что кратковременное влияние положительной низкой температуры оказывает наименьшее влияние на проростки, при этом происходит так называемое «закаливание» проростков. Кратковременное влияние высокой температуры приводит к более негативным последствиям, снижая адаптивный потенциал проростков сои.

Увеличение каталитической активности пероксидазы является, по нашему мнению, одним из сопутствующих факторов, определяющих общие тенденции в эизиматическом механизме адаптации сои к экстремальным условиям Амурской области, которые позволяют специфическим реакциям протекать в условиях резко изменяющихся температур, за более короткий период вегетации. Увеличение количества МФ пероксидаз биологически оправдано, так как расширяет физиолого-биохимические возможности сои в ее приспособлении к неблагоприятным условиям, обеспечивает слаженность и гибкость работы механизмов адаптации антиоксидантной системы сои.

ГЛАВА 4. ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ СОИ К ВОЗДЕЙСТВИЮ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ С УЧАСТИЕМ ПЕРОКСИДАЗ, ИЗОФЛАВОНОВ И ДГК

4.1. Оценка устойчивости сои к влиянию солей ТМ на разных стадиях онтогенеза с участием пероксидаз и ДГК

Дигидрохверцетин является антиоксидантом. Интересным является анализ влияния разных концентраций ДГК на активность пероксидаз сои. В результате проведенных исследований установлено, что наибольшая активность фермента достигается при проращивании семян сои в 3×10^{-3} М и 3×10^{-4} М растворе ДГК, а 3×10^{-2} М раствор ДГК оказывает наименьшее влияние на активность пероксидаз (табл. 4).

Таблица 4

Влияние разных концентраций ДГК 90%-й чистоты на активность пероксидаз семян сои

Сорт Соната	Контроль	Концентрация раствора ДГК		
		3×10^{-4} М	3×10^{-3} М	3×10^{-2} М
А _{уд.} , ед/мг белка	$169,3 \pm 7,0$	$192,0 \pm 8,0$	$202,5 \pm 10,0$	$178,7 \pm 7,5$

Анализ спектра множественных форм пероксидаз показал, что при проращивании семян сои в течение трех часов в 3×10^{-4} М растворе ДГК количество форм фермента по сравнению с контрольными образцами не изменилось, а в 3×10^{-2} М растворе обнаружена всего одна форма пероксидазы со средней R_f (рис. 11).

Таким образом, установлено, что в присутствии исследуемых концентраций ДГК активность пероксидаз семян сои возрастает незначительно.

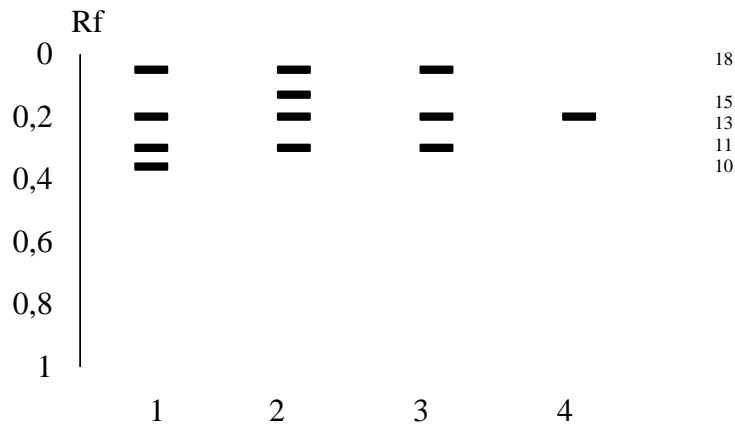


Рис. 11. Схема энзимограмм пероксидаз семян сои в зависимости от концентраций ДГК (1 – H₂O, 2 – 3×10⁻⁴М, 3 – 3×10⁻³М, 4 – 3×10⁻²М)

Количество форм пероксидаз при низких концентрациях почти не меняется по сравнению с контролем, тогда как, при 3×10⁻²М растворе происходит инактивация форм, остается только одна форма со средней электрофоретической подвижностью П13.

4.2. Влияние солей ТМ на удельную активность и множественные формы пероксидаз культурной и дикой сои на разных стадиях онтогенеза

Одной из важнейших проблем в экологии растений является изучение ответной реакции растений на действие солей ТМ, которые при повышенных концентрациях оказывают токсическое действие на самые разнообразные физиологические процессы. Данная проблема имеет не только практическое значение, связанное с возрастающим загрязнением окружающей среды ТМ, но и с исследованием механизмов адаптации растений. Среди ТМ наиболее распространенными токсикантами являются Cd и Pb, тогда как Cu и Zn относятся также к биогенным элементам. Поступая в клетки, ТМ приводят к нарушениям метаболизма, вызывая окислительный стресс, что лежит в основе высокой токсичности ТМ. Прочность связывания ионов тяжелых металлов с функциональными группами биополимеров может различаться, что может быть одной из причин различной токсичности ТМ. Поэтому, в наших исследованиях были выбраны широко распространенные ТМ: Cd, Pb, Cu, Zn,

Которые, во-первых, обладают различным сродством к функциональным группам биополимеров, а во-вторых, накапливаются в разных частях клетки.

Амурская область является основным регионом возделывания сои в России. Расширение посевных площадей этой ценной культуры неизбежно приведет к размещению ее на почвах, загрязненных ТМ. В связи с этим актуальными являются исследования, которые позволят оценить влияние загрязнения почвы ТМ на развитие сои, ее адаптацию к измененным условиям выращивания.

В результате проведенных исследований установлено, что удельная активность пероксидаз в контрольных образцах культурной и дикой сои на изученных стадиях вегетации изменяется незначительно (рис. 12). При проращивании сои сорта Соната с внесением в почву сульфатов цинка, меди и свинца в исследуемых концентрациях активность пероксидаз увеличивается незначительно по сравнению с контролем на этапе формирования первого тройчатого листа и значительно возрастает в период цветения (рис. 12).

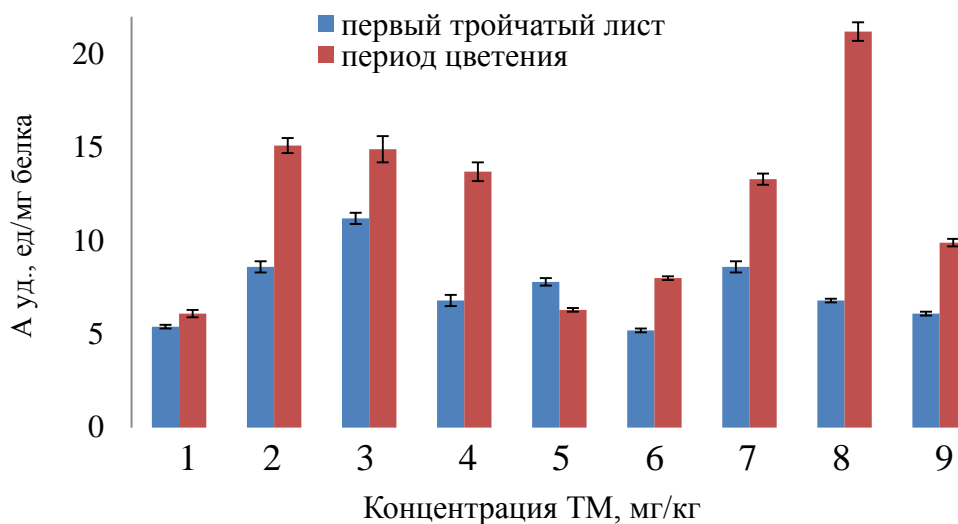


Рис. 12. Влияние солей ТМ на удельную активность пероксидаз культурной сои на разных стадиях вегетации (1 – контроль, 2 – $ZnSO_4$ (15 мг/кг), 3 – $ZnSO_4$ (2 ОДК), 4 – $CdSO_4$ (0,2 мг/кг), 5 – $CdSO_4$ (2 ОДК), 6 – $CuSO_4$ (1,6 мг/кг), 7 – $CuSO_4$ (2 ОДК), 8 – $PbSO_4$ (2,75 мг/кг), 9 – $PbSO_4$ (2 ОДК))

Следует отметить, что сульфат кадмия вызывает незначительное повышение активности пероксидаз в период формирования тройчатого листа и в период цветения при концентрации этой соли 2 ОДК.

При проращивании дикой сои с внесением в почву солей сульфата цинка и кадмия в исследуемых концентрациях активность пероксидаз увеличивается незначительно по сравнению с контролем (рис. 13) на этапе формирования первого тройчатого листа и в период цветения, за исключением образцов, выращенных на почве с содержанием сульфата цинка в концентрации 46 мг/кг на стадии первого тройчатого листа, где активность фермента была минимальна.

При внесении сульфата меди различной концентрации активность пероксидаз значительно возрастает по сравнению с контролем на всех этапах вегетации.

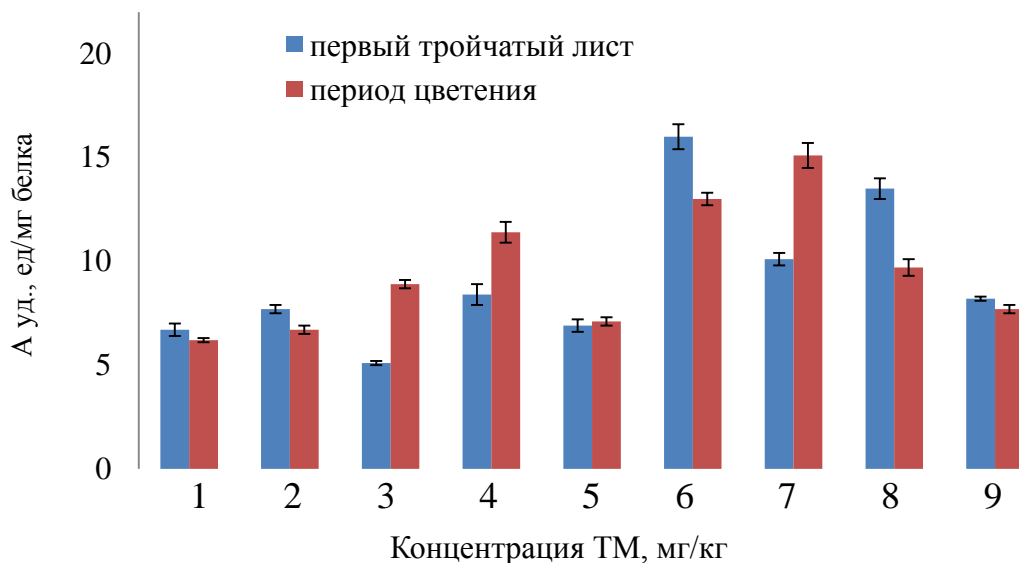


Рис. 13. Влияние солей ТМ на удельную активность пероксидаз дикой сои на разных стадиях вегетации (1 – контроль, 2 – $ZnSO_4$ (15 мг/кг), 3 – $ZnSO_4$ (2 ОДК), 4 – $CdSO_4$ (0,2 мг/кг), 5 – $CdSO_4$ (2 ОДК), 6 – $CuSO_4$ (1,6 мг/кг), 7 – $CuSO_4$ (2 ОДК), 8 – $PbSO_4$ (2,75 мг/кг), 9 – $PbSO_4$ (2 ОДК))

Соли свинца в концентрации 2,75 мг/кг увеличивают активность пероксидаз по сравнению с контролем в период формирования тройчатого листа и в период цветения, а использование этой соли в концентрации 12 мг/кг

приводит к незначительному повышению пероксидазной активности по сравнению с контролем.

Сравнивая энзимограммы пероксидаз в период формирования первого тройчатого листа и в период цветения, следует отметить увеличение количества форм фермента в период цветения. Причём для культурной сои в период первого тройчатого листа с трёх-четырёх форм, а в период цветения до четырёх-шести у культурной в период цветения и у дикой сои от трёх до пяти форм (рис. 14, 15).

В контроле дикой сои выявлено по четыре стабильные формы, а для культурной сои в фазе цветения установлено пять форм пероксидаз. Высокой встречаемостью выделились формы с высокой электрофоретической подвижностью (П18, П17, П13 и П9).

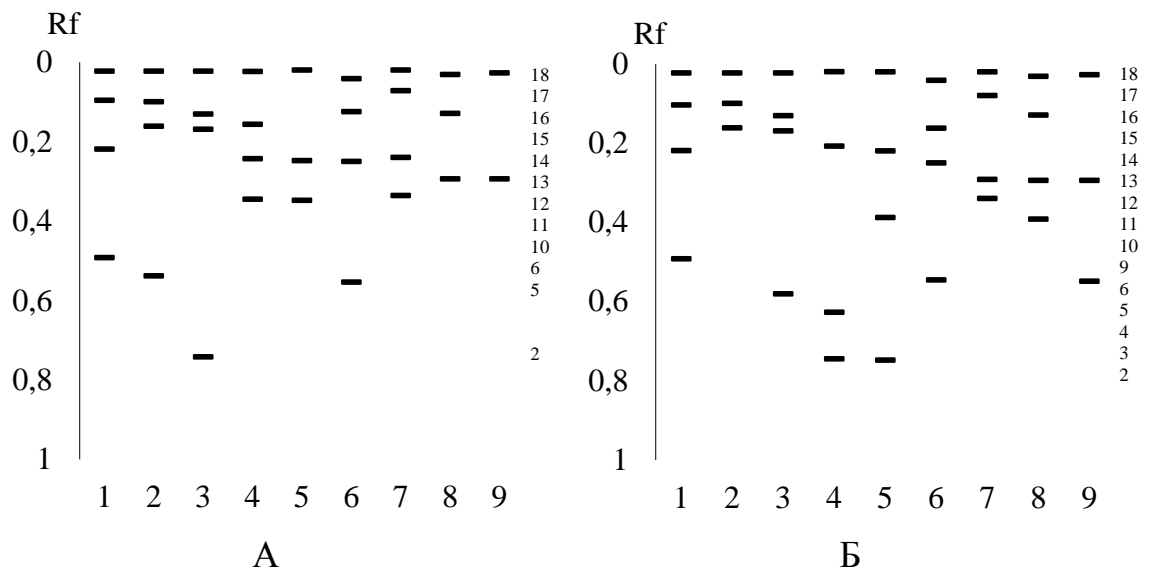


Рис. 14. Схемы энзимограмм пероксидаз культурной сои в период формирования первого тройчатого листа (А) и в период цветения (Б), выращенной в почве с внесением солей ТМ: 1 – контроль, 2 – ZnSO₄ (15 мг/кг), 3 – ZnSO₄ (2 ОДК), 4 – CdSO₄ (0,2 мг/кг), 5 – CdSO₄ (2 ОДК), 6 – CuSO₄ (1,6 мг/кг), 7 – CuSO₄ (2 ОДК), 8 – PbSO₄ (2,75 мг/кг), 9 – PbSO₄ (2 ОДК).

При внесении солей ТМ появляются формы с высокой и средней Rf, особенно для дикой сои. У культурной сои в период формирования первого тройчатого листа выявлено угнетение форм пероксидазы при внесении солей кадмия высокой концентрации (2 ОДК) и свинца.

В период цветения в листьях культурной сои выращенных с добавлением соли цинка и свинца (2 ОДК) установлено максимальное количество форм – шесть.

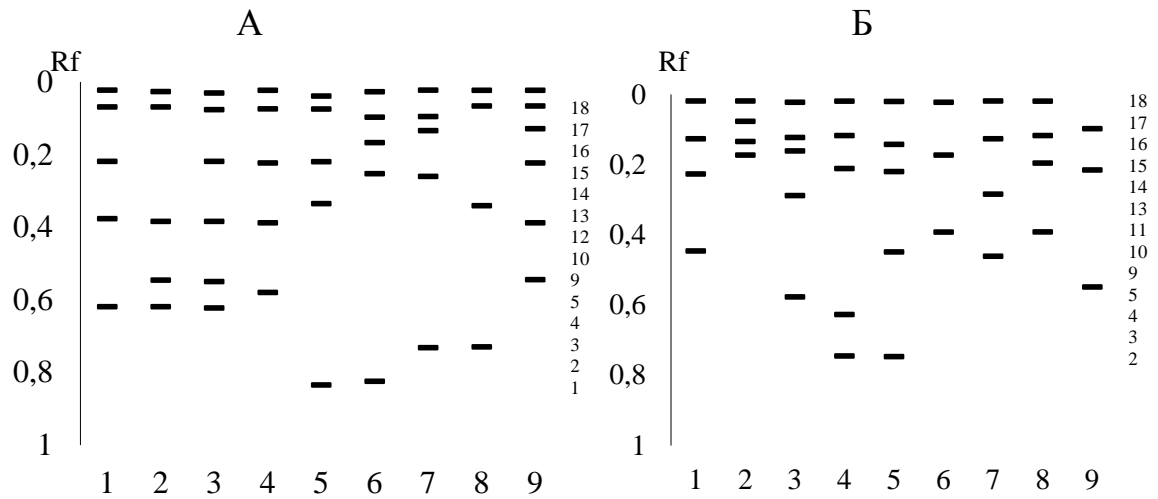


Рис. 15. Схемы энзимограмм пероксидаз дикой сои в период формирования первого тройчатого листа (А) и в период цветения (Б), выращенной в почве с внесением солей ТМ: 1 – контроль, 2 – ZnSO₄ (15 мг/кг), 3 – ZnSO₄ (2 ОДК), 4 – CdSO₄ (0,2 мг/кг), 5 – CdSO₄ (2 ОДК), 6 – CuSO₄ (1,6 мг/кг), 7 – CuSO₄ (2 ОДК), 8 – PbSO₄ (2,75 мг/кг), 9 – PbSO₄ (2 ОДК)

В листьях дикой сои в этих образцах обнаружено минимальное количество форм. В образцах культурной сои после внесения ТМ выявлено 8 дополнительных форм пероксидаз по сравнению с контролем, а дикорастущей – 11, что свидетельствует о повышенном адаптивном потенциале дикой сои.

Таким образом, установлено, что внесение исследуемых солей ТМ в почву вызывает увеличение пероксидазной активности в фазе цветения культурной сои за исключением сульфата кадмия в высокой и сульфата меди в минимальных концентрациях. Соли ТМ повышают пероксидазную активность дикорастущей сои на стадии формирования первого тройчатого листа, либо она остается на уровне контроля на всех этапах вегетации, за исключением сульфата цинка в максимальной концентрации.

Выявлена интересная закономерность, как для культурной, так и для дикой сои: если в фазу первого тройчатого листа удельная активность пероксидаз выше, то в стадии цветения она снижается и, наоборот. Соли

биоогенных металлов цинка и меди оказывают незначительное влияние на удельную активность пероксидаз, чем соли наиболее токсичных металлов кадмия и свинца. Фазы развития сои различаются по количеству множественных форм пероксидаз. Больше количество форм выявлено в фазу цветения для культурной сои. Пероксидазную активность можно использовать как биохимический тест на устойчивость сои к воздействию солей ТМ.

4.3. Определение устойчивости семян сои к воздействию солей ТМ в течение 5 часов с участием пероксидаз и ДГК

При обработке семян сои растворами, содержащими соли ТМ и ДГК, установлено проникновение данных ТМ и флавоноида в семена в количествах, соответствующих содержанию солей данных металлов в используемых для обработки растворах (табл. 5).

Таблица 5

Количество ТМ и ДГК, мкг/г семян сои при проращивании в растворах в течение 5 часов, содержащих их сульфаты

ДГК, 3×10^{-6} М	Концентрация соли, М	Zn	Cu	Cd
4,12±0,84	5×10^{-4}	228,26±27,34	212,26±20,30	402,26±47,02
	5×10^{-5}	22,04±3,62	19,34±2,32	41,18±3,96
	5×10^{-6}	1,89±0,12	2,06±0,22	3,88±0,56

Установлено, что уровень МДА повышается во всех вариантах опыта при внесении солей ТМ, что объясняется наличием окислительного стресса у семян сои, вызванного данным видом солей (табл. 6). Добавление ДГК в среду для проращивания снижает уровень МДА, способствуя формированию защитного механизма сои от стрессового воздействия солей ТМ.

Таблица 6

Уровень МДА, нмоль/г сухого веса в семенах культурной сои при влиянии солей ТМ и ДГК

Контроль	ДГК*	Концентрация соли, М	ZnSO ₄	ZnSO ₄ + ДГК*	CuSO ₄	CuSO ₄ +ДГК*	CdSO ₄	CdSO ₄ +ДГК*
2,58 ±0,16	2,27 ±0,15	5×10 ⁻⁴	4,46± 0,24	3,76± 0,19	5,34± 0,29	4,0± 0,29	6,14± 0,42	2,85± 0,10
		5×10 ⁻⁵	3,68± 0,17	2,85± 0,13	5,46± 0,30	4,12± 0,26	6,58± 0,38	3,12± 0,18
		5×10 ⁻⁶	2,60± 0,13	2,48± 0,11	5,56± 0,30	2,88± 0,18	6,25± 0,38	3,06± 0,16

* концентрация ДГК равняется 3×10⁻⁶ М

Установлено, что проращивание семян сои в течение 5-ти часов с добавлением солей ТМ различных концентраций приводит к изменению удельной активности пероксидаз в зависимости от вида соли ТМ и их концентраций (рис. 16).

Получено, что при внесении высоких концентраций цинка и меди наблюдается увеличение активности фермента, а при невысоких – активность остается на уровне контроля. Внесение солей кадмия и свинца вызывает обратную зависимость по сравнению с солями цинка и меди: при воздействии низких концентраций кадмия и свинца происходит значительное увеличение активности пероксидазы по сравнению с контролем.

Установлено, что проращивание семян сои в растворах солей цинка и меди в низких концентрациях (5×10⁻⁵М; 5×10⁻⁶М) и солей свинца и кадмия в высоких концентрациях (5×10⁻⁴М) приводит к обеднению спектра. В этих условиях выявлено всего три формы. При проращивании семян сои в растворе сульфата цинка в концентрации 5×10⁻⁴М выявлено максимальное количество форм – пять.

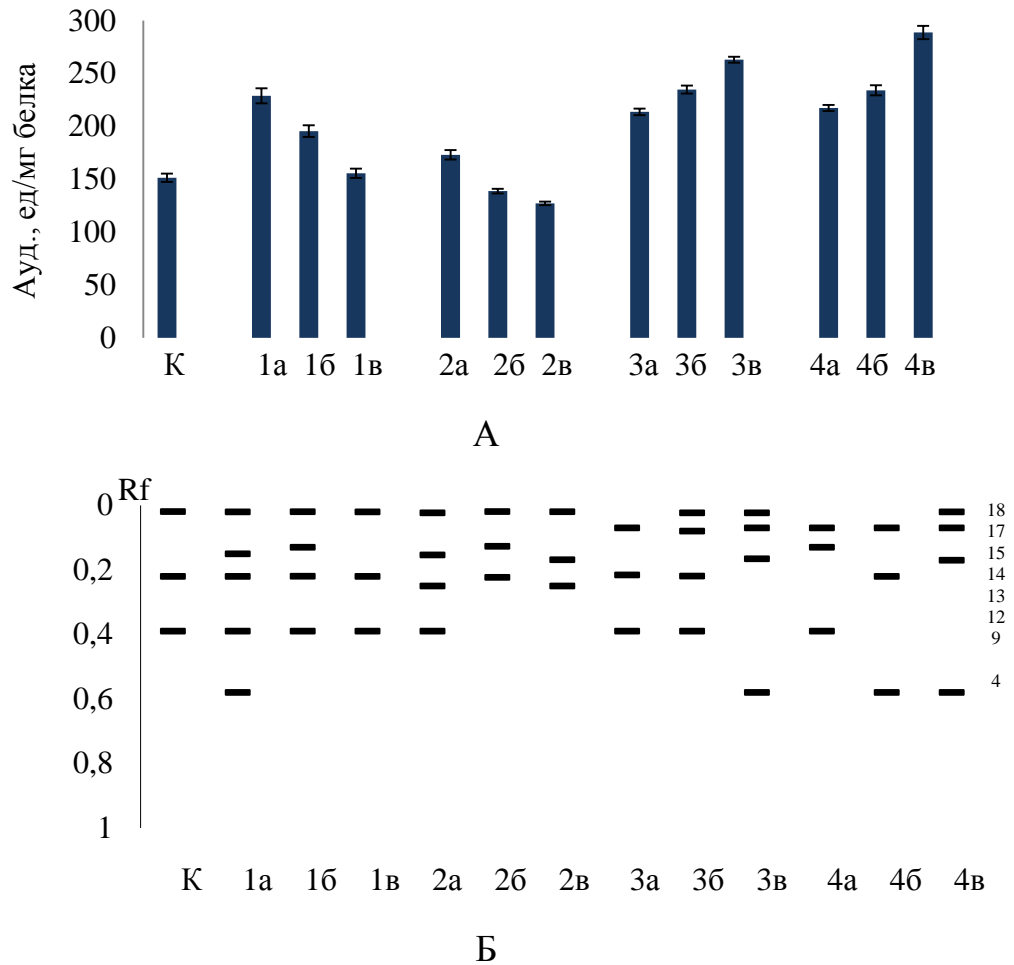
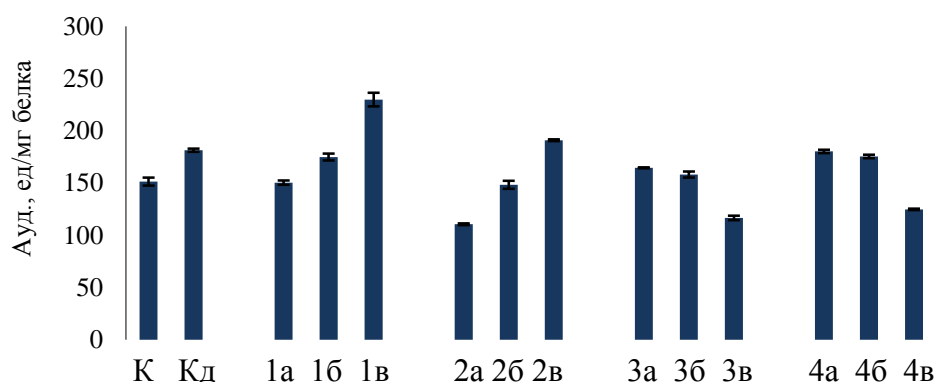


Рис. 16. Удельная активность (А) и схема энзимограмм (Б) пероксидаз сои, полученных в условиях проращивания семян с добавлением солей ТМ. К – контроль; 1 – $ZnSO_4$, 2 – $CuSO_4$, 3 – $CdSO_4$, 4 – $Pb(CH_3COOH)_2$. Концентрация солей тяжелых металлов: а – $5 \times 10^{-4}M$, б – $5 \times 10^{-5}M$, в – $5 \times 10^{-6}M$.

Таким образом, сульфаты биогенных металлов цинка и меди оказывают незначительное влияние на удельную активность пероксидаз. Соли более токсичных металлов: Cd и Pb в концентрациях $5 \times 10^{-5}M$; $5 \times 10^{-6}M$ вызывают значительное увеличение активности пероксидаз семян сои по сравнению с контролем. Воздействие солей ТМ изменяет компонентный состав пероксидаз. При этом появляются новые или исчезают ранее присутствовавшие в спектре компоненты, что связано с процессами адаптации к воздействию солей ТМ.



Б

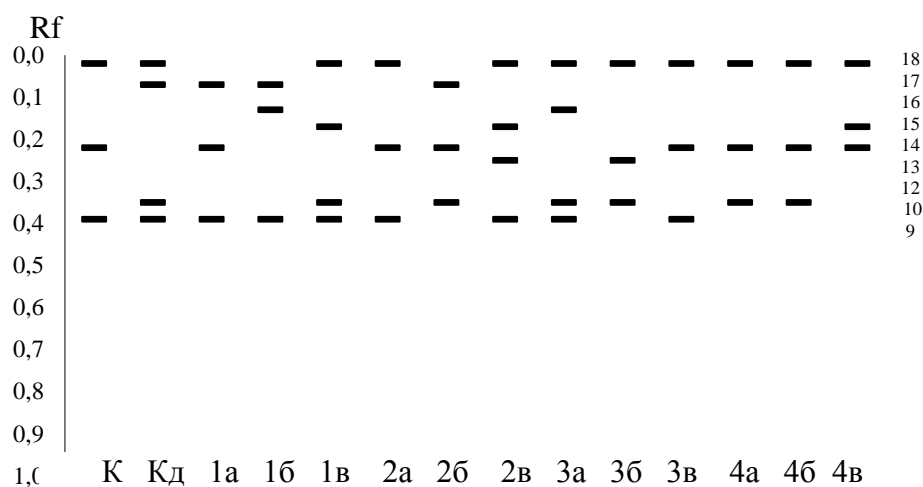


Рис. 17. Удельная активность (А) и схема энзимогрaмм (Б) пероксидаз сои, полученных при проращивании семян с добавлением ТМ и ДГК ($3 \times 10^{-6} \text{M}$). К – контроль, Кд – контроль с ДГК; 1 – $\text{ZnSO}_4 + \text{ДГК}$, 2 – $\text{CuSO}_4 + \text{ДГК}$, 3а – $\text{CdSO}_4 + \text{ДГК}$, 4 – $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COOH})_2 + \text{ДГК}$. Концентрация солей ТМ: а – $5 \times 10^{-4} \text{M}$, б – $5 \times 10^{-5} \text{M}$, в – $5 \times 10^{-6} \text{M}$.

Анализ энзимогрaмм пероксидаз выявил зависимость между удельной активностью пероксидаз сои и их множественными формами. При изучении спектра пероксидаз выявлено, что воздействие солей ТМ на семена сои приводит к появлению новых форм. Проращивание семян сои в растворах сульфатов цинка ($5 \times 10^{-4} \text{M}$), кадмия ($5 \times 10^{-6} \text{M}$) и ацетата свинца ($5 \times 10^{-5} \text{M}$; $5 \times 10^{-6} \text{M}$) способствовало образованию формы П4, которая отсутствует в контроле, что соответствует высокой активности пероксидаз. Установлено, что увеличение удельной активности пероксидаз связано с появлением новых форм

фермента П4, П14, П15 и П17, что свидетельствует об участии данных форм в адаптации к окислительному стрессу.

Адаптивными формами являются П9, П13 и П18, выявленные в контрольном и в опытных образцах.

Внесение ДГК характеризуется появлением форм П10 и П17, которые выявлены при воздействии солей ТМ и ДГК, что соотносится с снижением удельной активности пероксидаз до уровня контрольных образцов и свидетельствует о том, что ДГК уменьшает токсичное действие ТМ (рис. 17).

Таким образом, установлено, что внесение сульфатов биогенных металлов цинка и меди высоких концентраций и токсичных металлов кадмия и свинца всех исследованных концентраций увеличивают удельную активность пероксидаз по сравнению с контролем. Совместное антиоксидантное действие пероксидазы сои и низкомолекулярного антиоксиданта ДГК, добавляемого в среду, играет важную роль в формировании защитного механизма семян сои в условиях окислительного стресса, что обуславливает устойчивость семян сои к воздействию ТМ.

4.4. Формирование устойчивости проростков сои к окислительному стрессу, вызванному воздействием солей ТМ в течение 5 суток, с участием пероксидаз, изофлавонов и ДГК

Антиоксидантный комплекс растений важен для формирования устойчивости растений к разнообразным стрессорам. Для нас значительный интерес представляли исследуемые антиоксиданты во время развития проростков в течение 5 дней, когда на проростки влияют самые различные факторы среды, такие как повышенная и пониженная температура, недостаток влаги, тяжелые металлы в почве и т.д. Так как иммунная система растения только начинает формироваться, поэтому на данном этапе развития растение наиболее уязвимо к стрессовому воздействию.

На 1 этапе исследований проверено влияние различных концентраций ДГК на пероксидазную активность проростков сои (рис. 18).

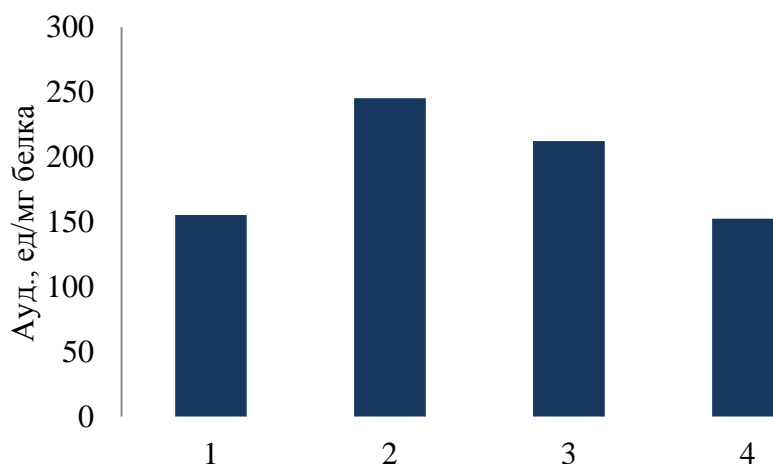


Рис. 18. Влияние ДГК на пероксидазную активность проростков сои (1 – контроль, 2 – 6×10^{-4} М ДГК, 3 – 1×10^{-3} М ДГК, 4 – 6×10^{-3} М ДГК)

Анализ пероксидазной активности показал, что обработка растворами разных концентраций ДГК приводит к увеличению активности пероксидаз по сравнению с контролем (рис. 18), что показывает положительное влияние ДГК на АОС растения.

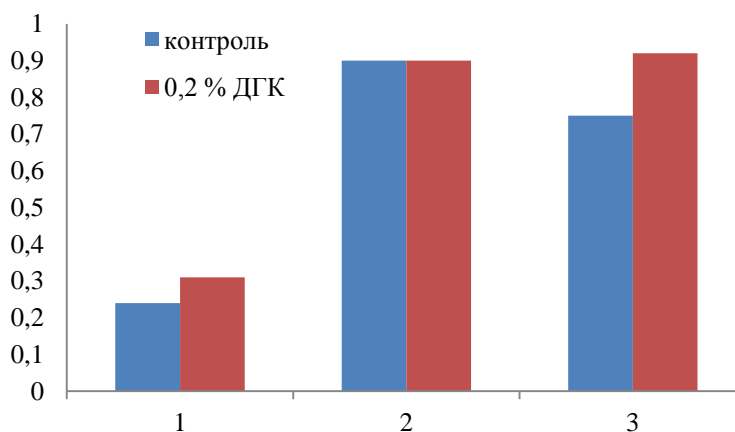


Рис. 19. Влияние ДГК на содержание изофлавонов в проростках сои (1 – даидзин, 2 – глицитин, 3 – генистин)

Даже обработка 6×10^{-3} М раствором ДГК не снижает пероксидазную активность по сравнению с контролем, что характеризует отсутствие угнетающего действия ДГК на растения в большой концентрации.

В результате проведенного эксперимента по влиянию ДГК на содержание изофлавонов выявлено, что количество даидзина и генистина возрастает по сравнению с содержанием в контрольном образце, а количество глицитина не изменяется (рис. 19), что свидетельствует о повышении антиоксидантного статуса растения.

Анализ биометрических показателей выявил, что при проращивании сои в растворах ДГК исследуемых концентраций длина корня меняется незначительно, но появляется больше боковых придаточных корней, что способствует увеличению массы корня, высоты проростков и вегетативной массы растения в 1,5 раза (рис. 20).

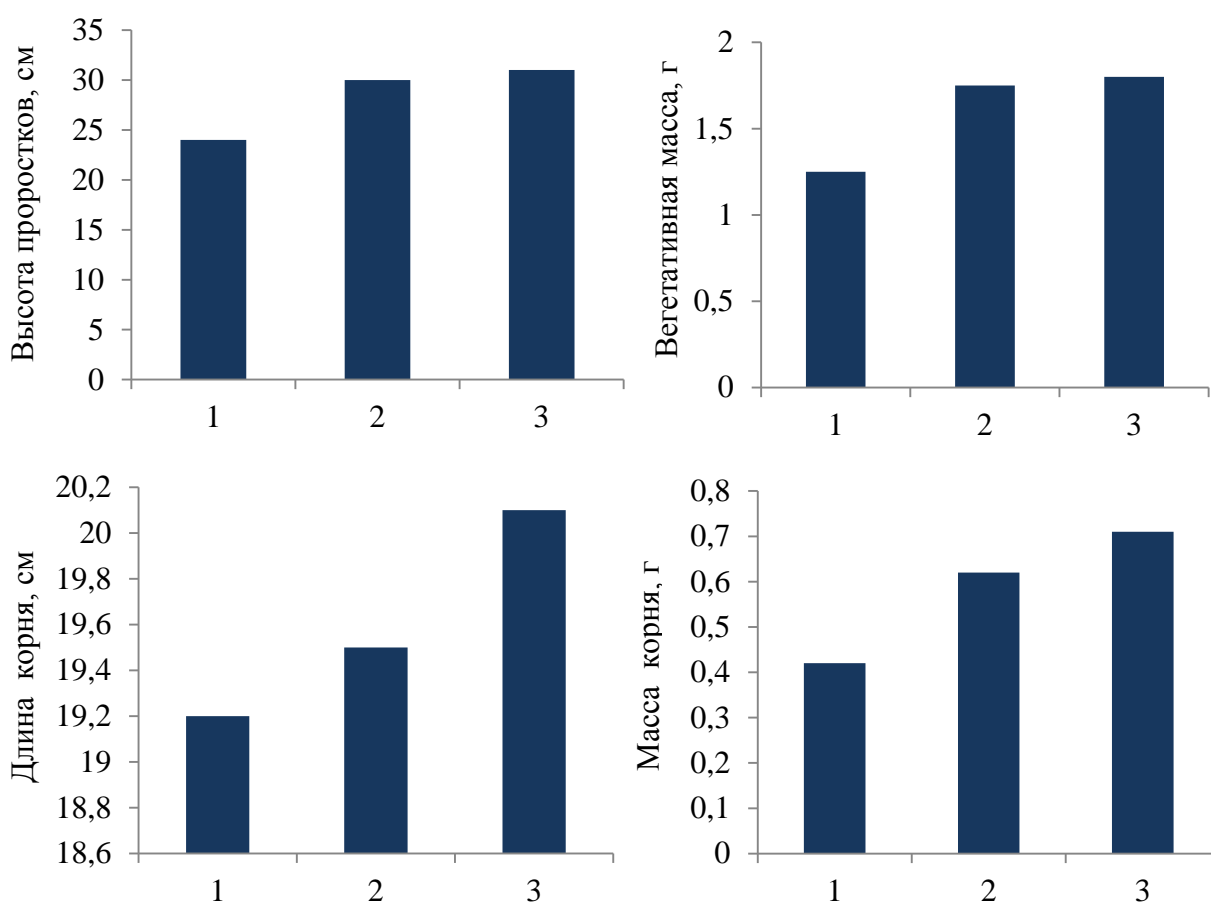


Рис. 20. Биометрические показатели проростков сои при проращивании в растворах ДГК (1 – контроль, 2 – 3×10^{-5} М ДГК, 3 – 3×10^{-6} М ДГК)

На следующем этапе была определена совместная роль ДГК, изофлавонов и пероксидаз в формировании устойчивости проростков сои к воздействию солей ТМ.

Сначала было определено содержание солей ТМ и ДГК в проростках сои после их проращивания в течение 5 суток в растворах, содержащих данные вещества. Получено, что содержание в проростках соответствует концентрации данных веществ в используемых растворах (табл. 7).

Таблица 7

Содержание ТМ и ДГК, мкг/г в проростках сои при их проращивании в течение 5 суток в растворах, содержащих ДГК, соли Сди Рb

ДГК		Cd ²⁺			Pb ²⁺		
3x10 ⁻⁵ М	3x10 ⁻⁶ М	5x10 ⁻⁴	5x10 ⁻⁵	5x10 ⁻⁶	5x10 ⁻⁴	5x10 ⁻⁵	5x10 ⁻⁶
4,32±	4,12±	368,42±	32,44±	3,16±	368,42±	32,44±	3,16±
7,10	0,84	26,12	3,16	0,22	26,12	3,16	0,22

Установлено, что уровень МДА повышается во всех вариантах опыта при внесении солей ТМ, что характеризует воздействие окислительного стресса на проростки сои (табл. 8). Добавление ДГК в среду для проращивания снижает уровень МДА и способствует повышению устойчивости проростков сои к воздействию солей ТМ.

Таблица 8

Уровень МДА, нмоль/г сырого веса в проростках сои при влиянии солей ТМ и ДГК

Содержание ДГК в растворе, М	Уровень МДА нмоль/г сырого веса						
		Содержание Cd ²⁺ в растворе, М			Содержание Pb ²⁺ в растворе, М		
		5x10 ⁻⁴	5x10 ⁻⁵	5x10 ⁻⁶	5x10 ⁻⁴	5x10 ⁻⁵	5x10 ⁻⁶
–	1,35± 0,14 (контроль)	7,88± 0,66	7,24± 0,60	6,12± 0,44	6,05± 0,50	6,14± 0,42	5,26± 0,32
3x10 ⁻⁵ М	1,12± 0,02	3,96± 0,24	5,22± 0,26	2,12± 0,04	2,74± 0,14	3,34± 0,32	1,88± 0,08
3x10 ⁻⁶ М	1,02± 0,06	2,86± 0,08	4,12± 0,18	0,96± 0,02	2,62± 0,15	3,86± 0,26	1,54± 0,04

Внесение ДГК стимулирует ростовые процессы сои, а внесение солей ТМ затормаживает ростовую активность проростков, особенно, добавление ТМ в концентрации 5·10⁻⁴М уменьшает показатели ростовых процессов в 1,5-2 раза.

Внесение ДГК в среду, содержащую ТМ в меньших концентрациях, приводит к улучшению биометрических показателей до уровня контроля и выше, что показывает защитную функцию ДГК.

При внесении в среду для проращивания семян сои ДГК невысоких концентраций удельная активность пероксидаз возрастает, а при добавлении солей свинца и кадмия – снижается. Причем, чем выше концентрация ТМ, тем ниже активность фермента. ДГК добавленный к растворам, содержащим соли ТМ, увеличивает активность пероксидаз по сравнению с удельной активностью фермента проростков сои, выращенных в среде с ТМ (рис. 21).

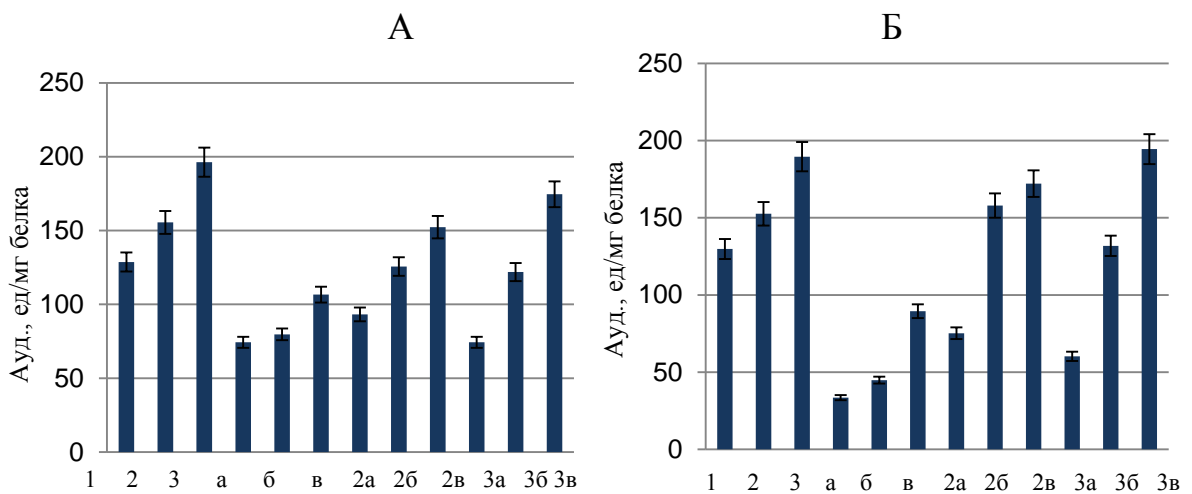


Рис. 21. Удельная активность пероксидаз проростков сои, полученных в условиях проращивания с добавлением ацетата свинца (А), сульфата кадмия (Б) и ДГК. 1 – контроль; концентрации ДГК: 2 – 3×10^{-5} , 3 – 3×10^{-6} , концентрации ТМ: а – 5×10^{-4} М, б – 5×10^{-5} М, в – 5×10^{-6} М)

При невысокой концентрации солей ТМ внесение ДГК увеличивает активность фермента по сравнению с контролем, что свидетельствует о проявлении антиоксидантного действия ДГК.

Внесение ДГК невысоких концентраций в раствор для проращивания сои вызывает увеличение активности пероксидаз, а внесение солей ТМ исследуемых концентраций приводит к снижению удельной активности фермента, причем, чем выше концентрация ТМ, тем ниже активность фермента. ДГК, добавленный к растворам, содержащим соли ТМ различной

концентрации, приводит к изменению активности пероксидаз. Внесение ДГК в концентрации 3×10^{-5} М увеличивает активность фермента в полтора раза по сравнению активностью фермента проростков сои, выращенных в среде с ТМ.

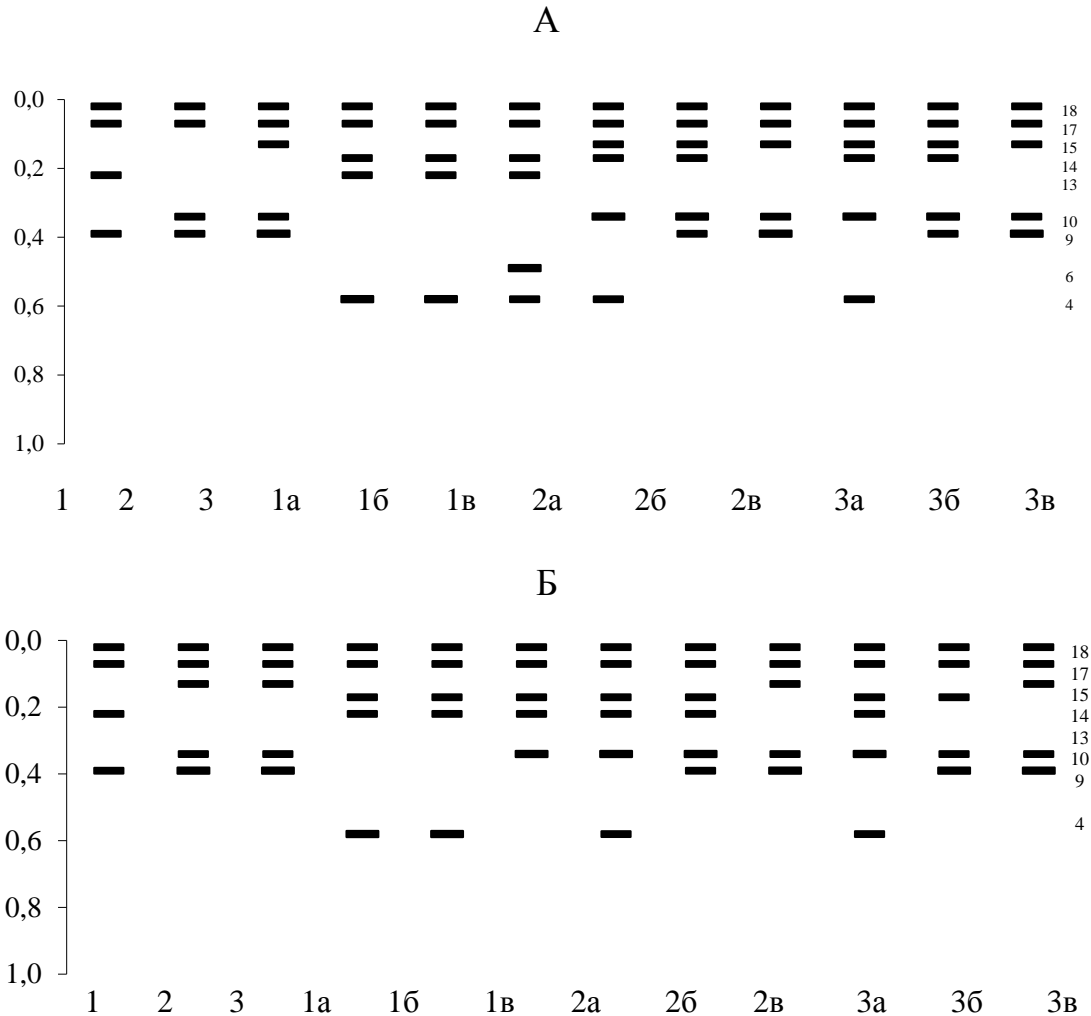


Рис. 22. Схемы энзимограмм пероксидаз проростков сои, полученных в условиях проращивания с добавлением ацетата свинца (А), сульфата кадмия (Б) и ДГК. 1 – контроль; концентрации ДГК: 2 – 3×10^{-5} М, 3 – 3×10^{-6} М, концентрации ТМ: а – 5×10^{-4} М, б – 5×10^{-5} М, в – 5×10^{-6} М.

При высокой концентрации соли внесение ДГК в концентрации 3×10^{-6} М не вызывает повышение активности фермента. При невысокой концентрации соли ТМ внесение ДГК исследуемой концентрации увеличивает активность фермента по сравнению с контролем, что свидетельствует о проявлении антиоксидантного действия ДГК. Активность пероксидаз при добавлении ДГК в раствор для проращивания с солью кадмия,

выше, чем с солью свинца. Возможно, в данном эксперименте кадмий наименее токсичен для семян сои.

При анализе электрофоретических спектров установлено, что во всех образцах присутствует формы П17 и П18 (рис. 22). Внесение ДГК в среду для проращивания вызывает появление форм П10 и П15, которые сохраняются в условиях окислительного стресса при добавлении соли свинца, форма П15 сохраняется при добавлении соли кадмия. Добавление солей ТМ вызывает окислительный стресс и появление формы П4, которая сохраняется и при внесении ДГК, что коррелирует с низкой удельной активностью, сопровождается угнетением физиологических процессов и приводит к снижению биометрических показателей.

Форма П9 присутствует в контрольном образце, в образцах с ДГК и при совместном влиянии ДГК и ТМ в низких концентрациях. Т.о., форма П9 функционирует в оптимальном условиях среды, но при высоких концентрациях солей ТМ инактивируется. Добавление ДГК активирует форму П9, о чем свидетельствует повышение удельной активности пероксидаз в образцах, где выявлена данная форма.

Форма П13 выявлена в контрольных образцах, при добавлении ТМ, и активна при внесении ДГК в растворы солей кадмия высокой концентрации, т.е. устойчива при окислительном стрессе. Форма П14 проявляется в образцах с добавлением солей ТМ и функционирует при внесении ДГК к растворам, содержащим соли ТМ в высокой концентрации.

Т.о., самыми адаптивными формами к условиям среды являются П17 и П18. Формы П4, П13 и П14 проявляются при окислительном стрессе, вызванном действием солей кадмия и свинца исследованных концентраций. Внесение ДГК вызывает появление форм П10 и П15.

Анализ энзимограмм пероксидаз показал, что адаптивными формами к условиям среды являются П17 и П18 (рис. 22). Формы П4, П13 и П14 проявляются при окислительном стрессе, вызванном действием солей кадмия

и свинца исследованных концентраций. Внесение ДГК вызывает появление форм П10 и П15.

Фенольным соединениям отводится важная роль в защите и приспособлении растений к неблагоприятным условиям среды (Волинец, 2014; Загоскина, 2016). В работах Барабой (2009) недостаточно описаны функции изофлавонов в растениях. Автором указано, что роль изофлавонов в растениях однозначно не определена. Но автор также утверждает, что многие изофлавоноиды играют активную физиологическую роль в растениях. Они могут сравнительно легко окисляться и восстанавливаться и их окислительно-восстановительный потенциал свидетельствует о том, что они принимают участие в обмене веществ. Также указано, что изофлавоны способны ингибировать рост патогенных грибов и понижать скорость размножения вирусов и бактерий. Изофлавоноиды являются метаболитами растительных тканей, но скапливаются в месте инфекции, поэтому их главной задачей скорее всего заключается в защите растений от инфекции (Кзаков и др., 1985).

В первую очередь следует отметить, что изофлавоны обнаружены нами только в надземной части сои, в корнях не обнаружены, что вероятно связано с функционированием хлоропластов – основного места биосинтеза фенольных соединений. Анализ содержания изофлавонов в проростках сои выявил высокие концентрации глицитина и генистина и низкую – даидзина (рис. 23). Внесение ДГК снижает уровень даидзина, но повышает уровень остальных изофлавонов. Добавление в среду для проращивания сои солей ТМ разных концентраций вызывает увеличение количества даидзина более чем в 2 раза, а содержание других изофлавонов наоборот – уменьшение, что свидетельствует об ответной реакции растения на окислительный стресс.

Внесение ДГК в среду, содержащую соли ТМ в высокой концентрации, не изменяет количество изофлавонов, а при меньших концентрациях соли внесение ДГК увеличивает содержание глицитина и генистина выше контроля, что приводит к увеличению адаптивного потенциала сои к окислительному стрессу. Соли кадмия сильнее снижают содержание

изофлавонов сои, что также характеризует его наибольшую токсичность для растения сои.

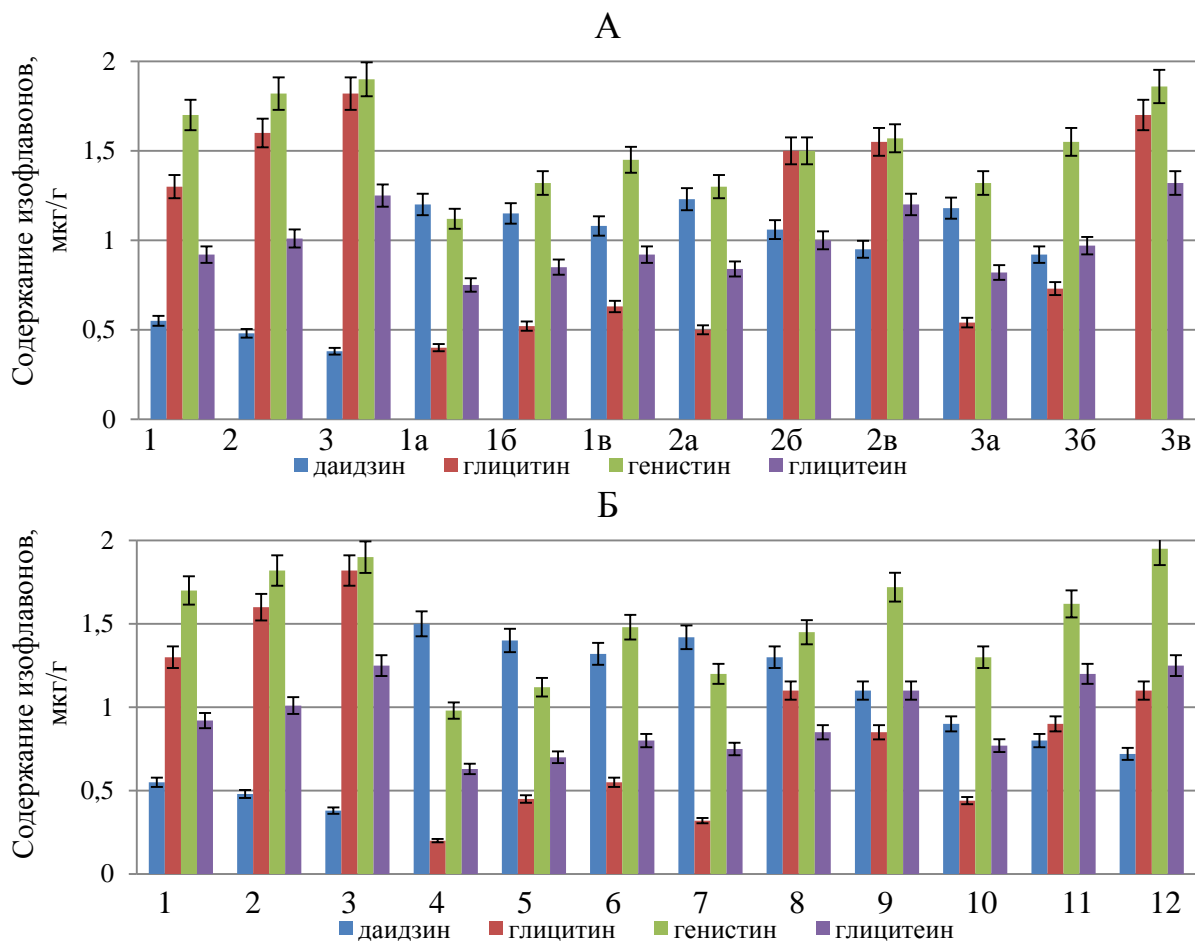


Рис. 23. Уровень изофлавонов в проростках сои, полученных в условиях проращивания с добавлением ацетата свинца (А), сульфата кадмия (Б) и ДГК. 1 – контроль; концентрации ДГК: 2 – 3×10^{-5} М, 3 – 3×10^{-6} М, концентрации ТМ: а – 5×10^{-4} М, б – 5×10^{-5} М, в – 5×10^{-6} М)

Уменьшение ростовых параметров в проростках сои можно рассматривать как их защитно-приспособительную реакцию при действии стрессовых факторов (солей ТМ), что неоднократно отмечалось в литературе.

Установлено, что внесение ДГК оказывает защитную функцию проростков сои от окислительного стресса при невысоких концентрациях соли, Таким образом, добавление ДГК в среду для проращивания способствует повышению адаптивного потенциала.

Проращивание сои в течение пяти суток с добавлением соли ТМ различных концентраций приводит к увеличению уровня МДА, изменению

активности пероксидаз, содержанию изофлавонов и биометрических показателей в зависимости от концентрации солей. Установлено, что внесение ДГК оказывает защитную функцию сои от окислительного стресса при невысоких концентрациях солей, значительно снижая при этом уровень МДА.

4.5. Оценка влияния ДГК, АГ и их комплексов на активность пероксидаз и содержание изофлавонов в семенах сои

В процессе выделения и изучения данных веществ разработан и запатентован комплекс ДГК и АГ (рис. 24). При получении комплекса методом распылительного высушивания происходит взаимодействие молекул ДГК с комплексообразователем АГ. Молекула ДГК может внедряться между длинными полисахаридными цепями АГ, формируя супрамолекулярный комплекс, который обладает более высокой растворимостью в воде по сравнению с малорастворимым ДГК.

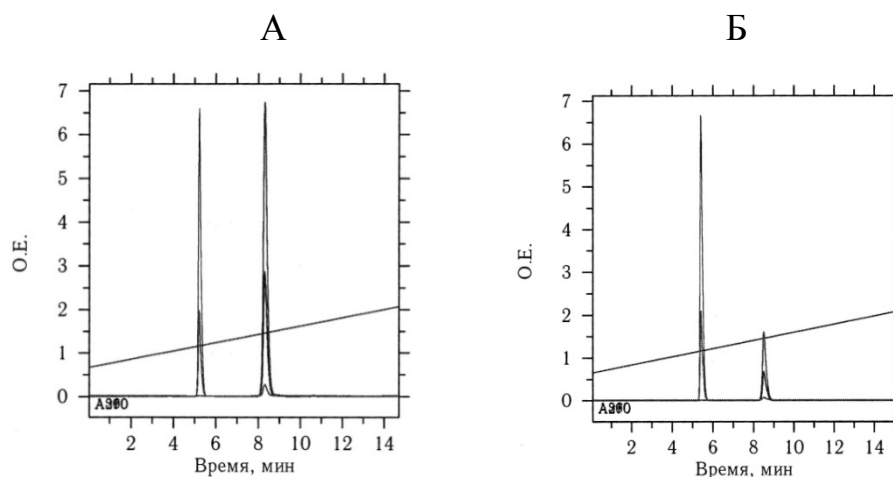


Рис. 24. Хроматограммы стандартного образца ДГК (а) и комплекса ДГК:АГ (1:3) (б) с использованием внутреннего стандарта кофеина. Пик ДГК, входящего в комплекс, на хроматограмме соответствует пику стандартного образца

Для определения содержания ДГК комплекс анализировался хроматографическим методом. Содержание АГ в комплексе определяли фотометрическим методом по реакции с антроном в кислой среде. Данные по составу полученных водорастворимых комплексов приведены в таблице 9.

Содержание компонентов в комплексе АГ+ДГК

Массовые соотношения ДГК:АГ	Количественное содержание арабиногалактана, %	Количественное содержание дигидрокверцетина, %	Суммарное содержание АГ и ДГК в комплексе, %
1:3	75,2	22,8	98,0

Из таблицы 9 следует, что при образовании комплекса методом распылительной сушки новых химических связей не образуется, химические вещества по составу не меняются, а происходит образование только межмолекулярных связей между молекулой ДГК и АГ, повышающих растворимость ДГК в воде.

Проведен эксперимент по исследованию водорастворимости полученного комплекса. Для этого образцы растворяли в 100 мл дистиллированной воды при температуре +20°C на магнитной мешалке (400 об/мин). Растворение проводили до тех пор, пока добавляемые навески не прекращали растворяться. Концентрацию ДГК в растворе определяли фотометрическим методом.

Таблица 10

Растворимость комплекса АГ+ДГК

Массовые соотношения ДГК:АГ	Способ получения	Растворимость ДГК в воде, г/л	Увеличение растворимости ДГК, (~ количество раз)
1:3	метод распылительной сушки	7,1	11,8
Растворимость ДГК в воде – 0,6 г/л			

Из таблицы 10 видно, что в комплексе с АГ растворимость ДГК увеличивается.

В результате проведенных исследований выявлено, что проращивание семян сои в течение 5-ти часов с добавлением ДГК, АГ и их комплексов в различных соотношениях приводит к изменению удельной активности и множественных форм пероксидаз в зависимости от соотношения ДГК и АГ.

Установлено, что добавление ДГК в среду для проращивания незначительно увеличивает удельную активность пероксидаз по сравнению с контролем, что, видимо, связано с его низкой биодоступностью (рис. 25).

Проращивание семян сои с добавлением АГ в среду вызывает увеличение активности пероксидаз на 40 %, что, видимо, стимулирует ростовые процессы в сое арабиногалактаном на начальном этапе онтогенеза.

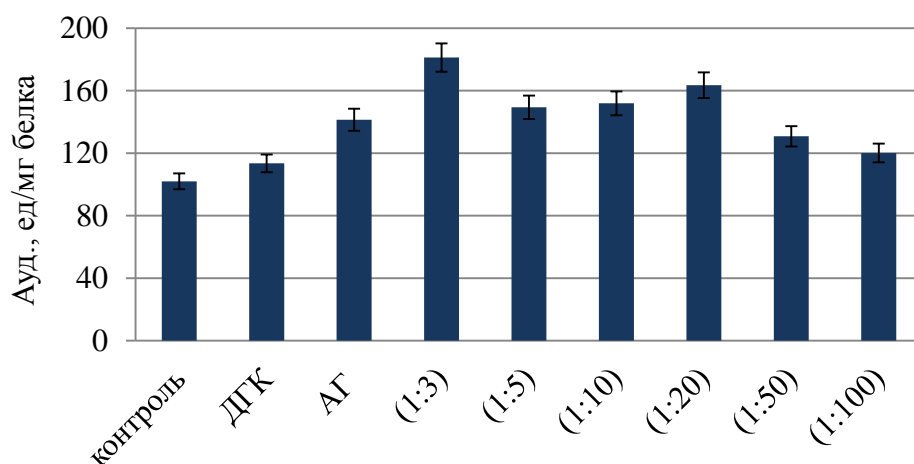


Рис. 25. Удельная активность пероксидаз семян сои, полученных в условиях проращивания семян с добавлением ДГК, АГ в концентрациях $6 \cdot 10^{-5}$ М и их комплексов в разных соотношениях

Внесение в среду для проращивания комплекса ДГК и АГ привело к большему увеличению активности пероксидаз и способствовало увеличению интенсивности обменных процессов. Наибольшую активность фермент проявил при внесении в среду для выращивания семян сои комплексов ДГК и АГ в соотношении (1:3) и (1:20), что показывает наиболее оптимально подобранные концентрации данных веществ в комплексе.

Анализ динамики пероксидазной активности в проростках сои в процессе роста и развития показал увеличение удельной активности пероксидаз, что связано с активным участием фермента в процессах роста и развития растения. Обработка растворами ДГК, АГ и их комплекса оказала положительное влияние данных препаратов на антиоксидантную систему растения, вызвала

стимуляцию биохимических процессов, протекающих в сое, что привела к увеличению удельной активности пероксидаз (рис. 25).

Анализ электрофоретических спектров выявил невысокую гетерогенность пероксидаз исследуемых образцов семян сои (рис. 26). Установлено от 3 до 5 форм фермента в каждом образце.

Всего выявлено 6 форм пероксидаз с разной электрофоретической подвижностью: П9, П10, П13, П15, П17, П18. Форма П18 установлена во всех исследуемых образцах. В контрольном образце выявлено 3 формы пероксидаз: П9, П12, П18.

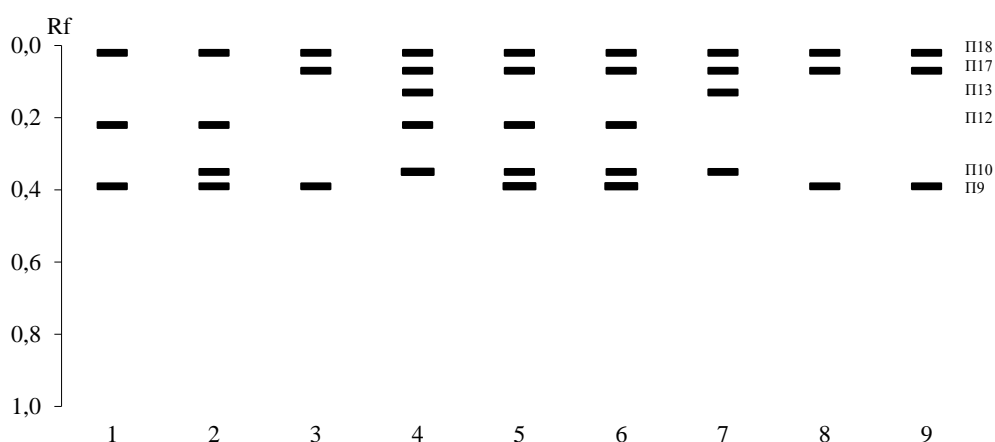


Рис. 26. Схема электрофоретических спектров пероксидаз семян сои, полученных в условиях проращивания семян с добавлением ДГК, АГ и их комплексов в соотношениях: 1 – контроль; 2 – ДГК ($6 \cdot 10^{-5}$ М); 3 – АГ ($6 \cdot 10^{-5}$ М); 4 – ДГК:АГ(1:3); 5 – ДГК:АГ (1:5); 6 – ДГК:АГ (1:10); 7 – ДГК:АГ (1:20); 8 – ДГК:АГ(1:50); 9 – ДГК:АГ (1:100)

При добавлении ДГК появляется форма П10, которая также обнаружена при внесении комплексов ДГК:АГ в соотношениях 1:(3-20), а при увеличении содержания АГ в комплексе данная форма не выявлена.

При внесении АГ в среду для проращивания семян сои проявляются формы П9 и П18, присутствующие в контрольном образце. Кроме того, обнаружена форма П17 с низкой Rf, которая установлена также во всех образцах, проращенных с добавлением АГ.

Форма П15 выявлена только в двух образцах с добавлением комплексов ДГК:АГ в соотношениях (1:3) и (1:20), в которых обнаружена самая высокая

удельная активность фермента. Следует отметить, что в данных образцах отсутствует форма П9, установленная в контрольном и в остальных исследуемых образцах.

Высокая удельная активность пероксидаз коррелирует с повышением гетерогенности фермента в исследуемых образцах в зависимости от содержания в комплексах ДГК и АГ. Внесение ДГК в среду для проращивания семян сои вызывает появление формы П10, а добавление АГ – формы П17, что вызывает увеличение активности пероксидаз. Появление новых форм фермента приводит к усилению метаболических процессов и адаптивного потенциала семян сои.

При обработке семян сои комплексом АГ:ДГК в соотношении 1:3 была получена самая высокая активность и гетерогенность пероксидаз, что позволило использовать данный комплекс для создания препарата «Эколарикс», который был зарегистрирован в РФ в качестве регулятора роста сои.

При обработке семян растворами ДГК, АГ и их совместного комплекса в соотношении (1:3) происходит улучшение всхожести семян сои (рис. 27).

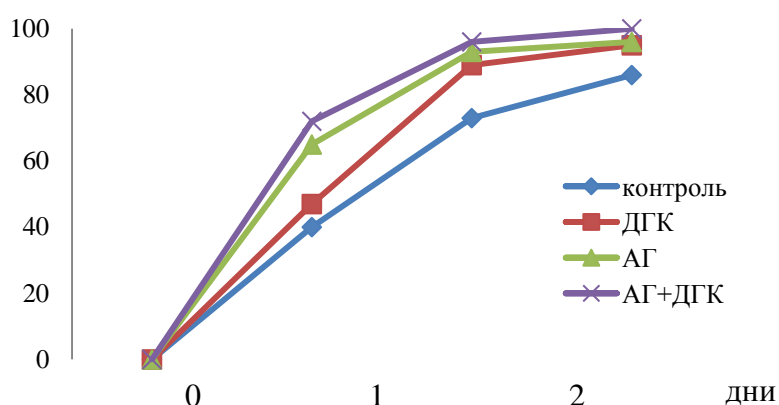


Рис. 27. Всхожесть семян сои при обработке их растворами ДГК, АГ и их комплекса

Максимальное количество взошедших семян, обработанных комплексом АГ+ДГК по сравнению с контролем, объясняется увеличением биодоступности ДГК, находящемся в водорастворимом комплексе с АГ.

На ранней стадии онтогенеза сои происходит накопление изофлавонов, что связано с их участием в процессах роста и развития растения (рис. 28).

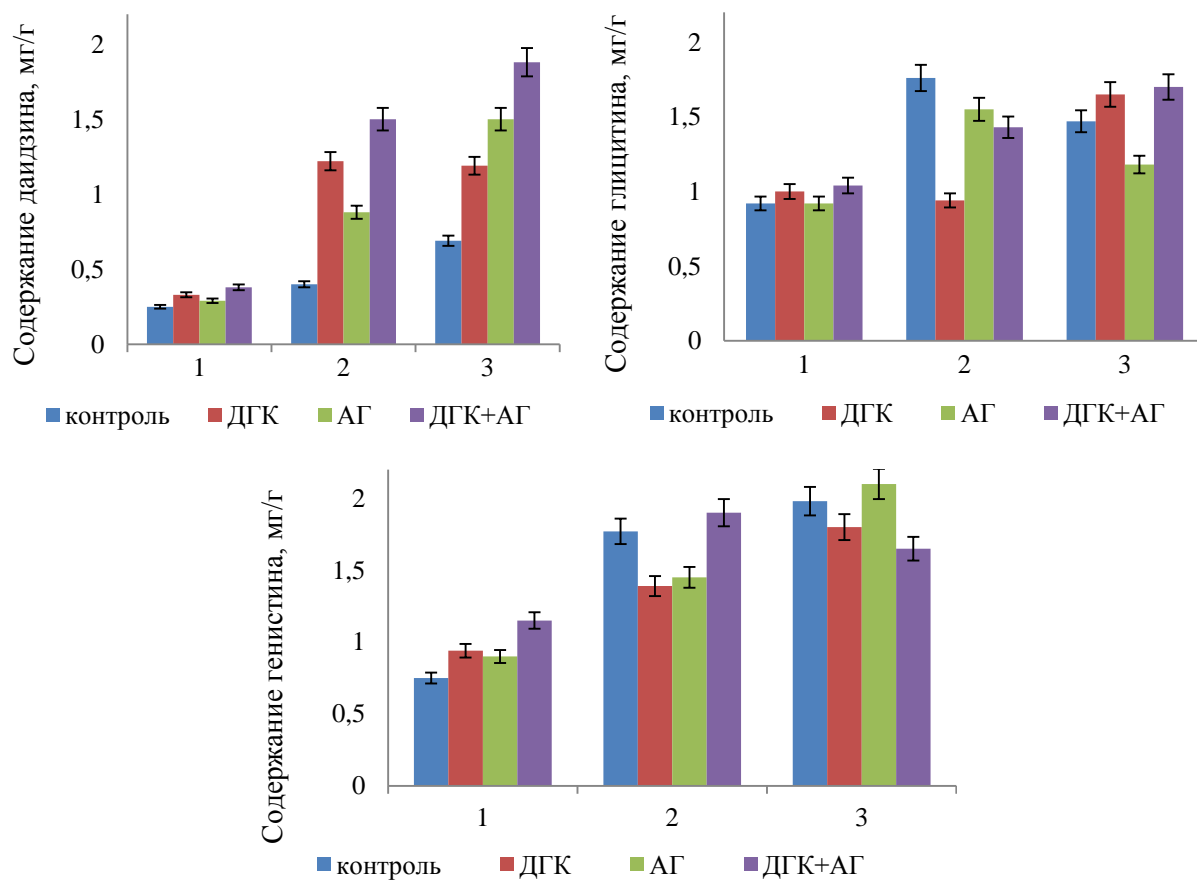


Рис. 28. Динамика изменения количества изофлавонов в проростках сои при обработке семян сои растворами ДГК, АГ и их комплекса через: 1 – 3 дня, 2 – 5 дней, 3 – 21 день

При проращивании сои в растворах исследуемых препаратов высота и масса растения увеличивалась, при этом наибольшие показатели выявлены при обработке комплексом, что связано с улучшением проницаемости ДГК в корни растения за счет повышения его растворимости в воде (рис. 29).

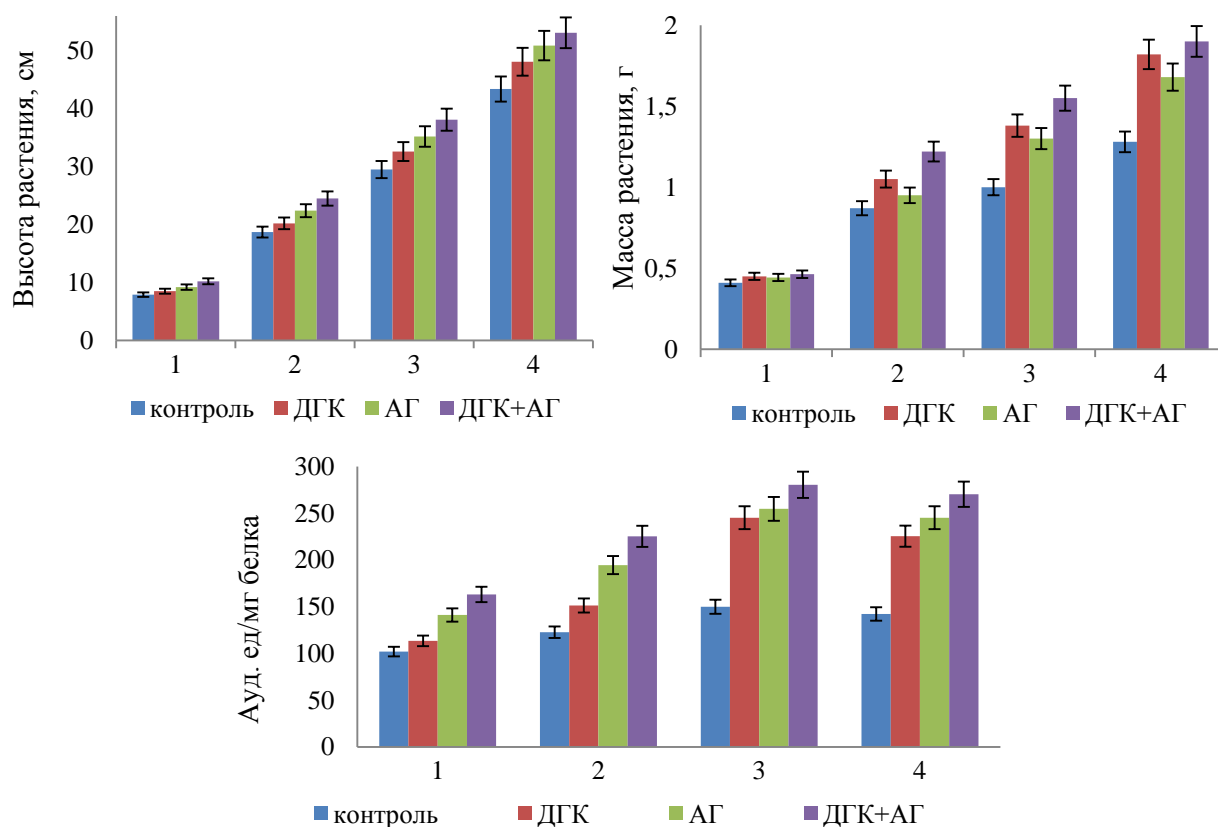


Рис. 29. Биометрические показатели и удельная активность пероксидаз сои на ранних стадиях онтогенеза при проращивании в растворах ДГК, АГ и их комплекса (1:3) через: 1 – 3 дня, 2 – 5 дней, 3 – 14 дней, 4 – 21 день

В условиях полевого опыта предпосевная обработка семян сои исследуемыми препаратами оказала положительное влияние на биометрические показатели (табл.11).

При обработке семян раствором ДГК, АГ и их водорастворимого комплекса привело к улучшению всех изученных биометрических характеристик, при этом произошло увеличение количества бобов, среднее количество семян и их масса увеличились от 25 до 55 %, что привело к повышению урожайности от 3,8 до 5,5 ц/га по сравнению с контролем.

Таблица 11

Влияние ДГК, АГ и их комплекса на биометрические показатели сои, выращенной после предпосевной обработки семян

Вариант Опыта	Высота растений, см	Количество бобов с одного растения, шт.	Количество семян с одного растения, шт.	Масса семян с одного растения, г	Урожайность, ц/га
Контроль	81,2 ± 4,1	29 ± 2,5	63 ± 3,8	9,4 ± 0,8	12,3 ± 1,2
ДГК	85,7 ± 3,2	44 ± 3,6	99 ± 4,6	13,4 ± 1,1	16,1 ± 1,5
АГ	92,4 ± 4,7	36 ± 3,0	79 ± 4,2	12,7 ± 1,0	15,2 ± 1,4
ДГК+АГ	93,6 ± 4,8	54 ± 4,5	102 ± 5,2	14,8 ± 1,3	17,8 ± 1,5

Таким образом, исследуемые препараты обладают ростостимулирующей активностью, вызывают усиление обменных процессов, что приводит к повышению содержания изофлавонов, увеличению пероксидазной активности, улучшению биометрических показателей и приводит к повышению урожайности сои.

Полученные результаты способствовали компании АО «Аметис» зарегистрировать комплекс ДГК и АГ в соотношении (1:3) в качестве регулятора роста растений под названием «ЭкоЛарикс».

ГЛАВА 5. ВСТРЕЧАМОСТЬ И ХАРАКТЕРИСТИКА МНОЖЕСТВЕННЫХ ФОРМ ПЕРОКСИДАЗ СОИ И ИХ РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ УСТОЙЧИВОСТИ *GLYCINE MAX* И *GLYCINE SOJA* К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ

Высокая динамичность экологических факторов, в том числе, в Амурской области, способствует выработке организмами способности синхронизировать интенсивность и темпы своих внутренних процессов с градиентом экологических факторов в местах обитания. Без такой экологической корректировки многочисленных разнохарактерных физиологических, биохимических и морфогенетических процессов было бы невозможным нормальное существование растений и животных в изменчивой внешней среде. Экологические факторы действуют через адаптивные функциональные системы, полезный результат деятельности которых, способствуя адаптации организма к меняющимся условиям внешней среды, поддерживает его устойчивость.

В связи со сложной экологической обстановкой в Амурской области вызывает интерес воздействие окислительного стресса на сою и повышение устойчивости к нему при участии отзывчивого фермента пероксидазы, которая представлена в сое высоким набором множественных форм. Формы пероксидаз образуются из слабо взаимодействующих подсистем, которые представляют собой самостоятельные структуры, способные существовать независимо от остальной части молекулы. Эти подсистемы в функциональном отношении могут быть активными и пассивными, в зависимости от этого формы изменяются быстрее или медленнее (Алексеев, 1994). Данное свойство формы пероксидазы может иметь важное экологическое значение, так как позволяет молекуле фермента адекватно настраиваться на тот или иной экологический фактор (свет, температура, влага, тяжелые металлы и др.).

Выбор пероксидазы в качестве модельного фермента при изучении молекулярных механизмов эколого-биохимической адаптации сои обусловлен

тем, что фермент широко распространен в растительной клетке. А также широкий спектр функций, множественность молекулярных форм, высокая чувствительность к внешним воздействиям делают пероксидазу адаптогенным ферментом с широкой экологической пластичностью (Рогожин, 2004). Такая возможность позволяет разграничить количественные и качественные изменения пероксидазы, индуцированные экологическими факторами. Проведен полный анализ всех форм, выявленных при проведении запланированных экспериментов, что позволило оценить вклад изменения молекулярной активности пероксидазы при адаптации сои к условиям среды.

За основу нами принята классификация форм пероксидаз сои в соответствии с их электрофоретической подвижностью согласно работам Иваченко Л.Е. (2010, 2011). Всего в сое согласно многочисленным проведенным исследованиям Иваченко Л.Е. (1995, 2006, 2010, 2011) обнаружено следующих 18 форм пероксидаз, функционирующих в разных агроклиматических условиях. В результате проведенных нами исследований также обнаружено 18 форм пероксидаз сои, что подтверждает литературные данные.

Для пероксидаз формы, выявленные Иваченко Л.Е., обозначены:

с Rf=0,83 – П1 (0,8-0,86); с Rf=0,75 – П2 (0,72-0,78); с Rf=0,62 – П3 (0,56-0,65); с Rf=0,58 – П4 (); с Rf=0,55 – П5; с Rf=0,49 – П6; с Rf=0,45 – П7; с Rf=0,42 – П8; с Rf=0,39 – П9; с Rf=0,34 – П10; с Rf=0,29 – П11; с Rf=0,25 – П12; с Rf=0,22 – П13; с Rf=0,16 – П14; с Rf=0,13 – П15; с Rf=0,10 – П16; с Rf=0,07 – П17; с Rf=0,02 – П18.

В таблице 12 приведена характеристика множественных форм пероксидаз сои, полученных при различных условиях среды, в том числе функционирующих при нормальных условиях и при влиянии окислительного стресса, вызванного высокими и низкими положительными температурами, действием тяжелых металлов (Pb, Cd, Cu, Zn).

Встречаемость, общая характеристика и свойства множественных форм пероксидаз сои, выявленных в различных условиях среды

Форма пероксидаз	Встречаемость, характеристика и свойства множественных форм пероксидаз
П1	Единичная встречаемость данной формы возможно связана с самой большой молекулярной массой пероксидазы сои. Обнаружена в растениях культурной сои в период цветения при влиянии кадмия в концентрации 2 ОДК и меди в концентрации 1,6 мг/кг. Установлена в семенах дикой сои через 5 часов проращивания при нормальных условиях (+23°C) и при повышенной температуре +42°C.
П2	Специфичность данной формы пероксидаз обусловлена выявлением в растениях дикой и культурной сои только в процессе периода вегетации на стадиях первого тройчатого листа и в период цветения при влиянии всех исследуемых ТМ (Pb, Cd, Cu, Zn), в других условиях не функционирует. Не устойчива к температурному стрессу.
П3	Встречается крайне редко. Обнаружена в процессе вегетации сои в период цветения для культурной сои при влиянии цинка, для дикой сои при влиянии кадмия. Не обнаружена в семенах и проростках, не функционирует в нормальных условиях, не устойчива к температурному стрессу.
П4	Небольшая встречаемость формы. Установлена в растениях дикой сои в период первого тройчатого листа при влиянии цинка в концентрации 2 ОДК и в период цветения при влиянии кадмия и цинка. Обнаружена в семенах культурной и дикой сои после выращивания в течение 5 часов при нормальных условиях (+23°C), устойчива к положительным низким (+4 и +10°C) и высоким температурам (+37 и +42°C). Форма проявляется также в семенах сои при влиянии Zn, Pb и Cd в течение 5 часов. Форма также обнаружена при влиянии кадмия в течение 5 суток и проявляется после внесения в среду для проращивания ДГК к кадмию. Участвует в процессе формирования устойчивости к окислительному стрессу.

П5	Редкая встречаемость данной формы. Выявлена в период первого тройчатого листа и в период цветения при влиянии Рb, Cu, Zn на культурную и дикую сою. Не проявляется при влиянии кадмия. Обнаружена в семенах дикой сои при влиянии +4, +37 и +45°C, участвует в быстрой адаптации к стрессовым температурам. Не обнаружена в проростках, не функционирует в нормальных условиях (+23°C). Образуется при влиянии низкой положительной температуры +4°C.
П6	Специфична только для культурной сои. Функционирует в нормальных условиях. Выявлена в период первого тройчатого листа в контрольных образцах. Обнаружена через 5 часов проращивания в семенах культурной сои при нормальных условиях (+23°C). Также форма проявилась через 5 часов влияния температуры +42 °C. Не устойчива к действию ТМ.
П7	Встречается очень редко. Обнаружена для дикой сои в период цветения при влиянии кадмия и меди в концентрациях 2 ОДК. Также обнаружена в семенах дикой и культурной сои через 5 часов выдерживания при температуре +10°C. Не специфична при протекании окислительных процессов, вызванных воздействием высоких концентраций ТМ и высокими температурами.
П8	Обладает очень редкой встречаемостью. Обнаружена при влиянии в течение 5 часов температуры +45°C Форма не функционирует в нормальных условиях и не устойчива к воздействию ТМ. Не обнаружена также в разные вегетационные периоды.
П9	Обнаружена в образцах сои при влиянии всех исследуемых ТМ на разных стадиях в период вегетации. Для дикой сои в период 1-го тройчатого листа при влиянии Cd и Рb. В период цветения для культурной сои при влиянии Рb, Cd, Zn и для дикой при влиянии Рb и Cu. Форма функционирует также в семенах сои при влиянии всех исследуемых ТМ и при добавлении к ТМ в среду для проращивания ДГК. Также форма обнаружена в семенах (через 5 часов) и проростках сои при влиянии всех исследуемых ТМ после 5 суток проращивания и при совместном внесении в среду для проращивания ТМ и ДГК, и при внесении ДГК в чистом виде. Обнаружена при влиянии низких положительных и высоких температур. Также при внесении ДГК, при этом происходит

	<p>снижение уровня МДА. Форма не устойчива к воздействию высоких температур. Участвует в процессах адаптации к окислительному стрессу, вызванному солями ТМ.</p>
П10	<p>Форма отсутствует при нормальных условиях. Обнаружена в проростках сои после 5 суток проращивания при совместном внесении в среду для проращивания ТМ и эндогенного полифенольного антиоксиданта ДГК, и при внесении ДГК в чистом виде. Обнаружена при влиянии низких положительных и высоких температур, когда также внесен ДГК, при этом происходит снижение уровня МДА, улучшение биометрических показателей.</p> <p>Не обнаружена в период длительной вегетации сои в нормальных условиях и при влиянии ТМ. Является маркером защитного действия антиоксиданта ДГК при влиянии окислительного стресса, вызванного ТМ и температурами.</p>
П11	<p>Форма обнаружена в период вегетации культурной и дикой сои на стадии тройчатого листа при воздействии свинца и меди, в период цветения только для дикой сои при воздействии цинка и меди в концентрации 2ОДК. Не обнаружена в семенах и проростках сои при воздействии ТМ, не функционирует в нормальных условиях. Участвует в длительной адаптации сои к окислительному стрессу, вызванному солями ТМ.</p>
П12	<p>Обладает редкой встречаемостью, функционирует в процессе вегетации сои при влиянии только кадмия и меди в период тройчатого листа, и одной только меди в период цветения. В семенах сои форма также обнаружена при влиянии меди через 5 часов. Можно использовать как маркер устойчивости сои к влиянию меди. Форма проявляется в основном только в тех случаях, если в среде для проращивания присутствует медь.</p>

П13	<p>Функционирует при нормальных (+23°C) условиях. Форма устойчива к воздействию ТМ. Проявляется на разных стадиях в период вегетации в основном при влиянии кадмия и свинца как для культурной, так и для дикой сои. В семенах форма обнаружена при влиянии всех исследуемых ТМ (Pb, Cd, Cu, Zn) в течение 5 часов, также функционирует и при добавлении к ТМ в среду для проращивания ДГК (участвует в процессе защиты от окислительного стресса).</p> <p>Форма проявилась в проростках через 5 суток при совместном воздействии кадмия и ДГК, соответственно для проростков форма также оказала участие в защиты от окислительного стресса. Интресным является факт проявления формы в проростках при воздействии ДГК и его комплекса с АГ.</p>
П14	<p>Обнаружена в растениях сои при влиянии различных ТМ на разных стадиях в период вегетации. На стадии тройчатого листа и в период цветения обнаружена при влиянии цинка, кадмия, меди. К воздействию свинца в период вегетации форма не устойчива.</p> <p>Проявляется в семенах культурной сои при влиянии меди, кадмия и свинца в небольших дозировках (5×10^{-6}) в течение 5 часов. Проявляется также в проростках сои при влиянии свинца и меди всех изученных концентраций, а также при добавлении ДГК в среду, содержащую соли ТМ. Участвует в процессе адаптации к окислительному стрессу, вызванному солями ТМ и функционирует в процессе защиты проростков сои от окислительного стресса с участием антиоксиданта ДГК.</p>
П15	<p>Функционирует при нормальных условиях (20°C), остается стабильной при температурном стрессе, участвует в процессе адаптации к нему.</p> <p>Обнаружена также в образцах сои при влиянии ТМ на разных стадиях в период вегетации. Для культурной сои в период тройчатого листа при влиянии Zn в концентрации 2 ОДК, меди в концентрации 1,6 мг/кг, свинца в концентрации 2,75 мг/кг, в период цветения при влиянии меди и свинца в концентрации 2 ОДК. Для дикой сои в период тройчатого листа и цветения при влиянии всех исследуемых ТМ (Pb, Cd, Cu, Zn).</p>

	<p>Форма функционирует также в семенах сои при влиянии всех исследуемых ТМ (Pb, Cd, Cu, Zn) и при добавлении к ТМ в среду для проращивания ДГК.</p> <p>Участвует в процессах адаптации к окислительному стрессу.</p>
П16	<p>Особенностью данной формы является редкая встречаемость в исследованных образцах сои. Форма активно функционирует при влиянии ТМ в процессе периода вегетации культурной и дикой сои. Обнаружена на стадии тройчатого листа сои в контроле и при влиянии цинка в концентрации 15 мг/кг. В период цветения форма обнаружена при влиянии меди в разных концентрациях, а также при влиянии свинца (2 ОДК).</p> <p>Форма также проявляется в семенах культурной сои и при влиянии ТМ (Cu, Zn) в течение 5 часов. В основном, форма специфична при влиянии таких биогенных ТМ, как Cu и Zn. Ко всем остальным влияниям форма не устойчива (в том числе при температурном стрессе). В нормальных условиях без влияния стрессовых факторов не функционирует. Можно использовать как маркер адаптации к окружающей среде при влиянии Cu и Zn.</p>
П17	<p>Форма проявляется практически во всех контрольных и опытных образцах в период вегетации на стадии первого тройчатого листа и в период цветения для культурной и дикой сои при влиянии солей исследуемых ТМ (Pb, Cd, Cu, Zn), независимо от вида металла и его концентрации, значит форма весьма устойчива к воздействию ТМ.</p> <p>Также форма обнаружена во всех образцах при влиянии супрамолекулярного комплекса ДГК+АГ в течение 5 часов, и при влиянии ДГК различных концентраций в течение 5 суток. Форма проявляется в период защиты ДГК от окислительного стресса, вызванного солями ТМ различных концентраций (Pb, Cd, Cu, Zn).</p>

П18	<p>Данная форма является самой устойчивой к различным условиям среды, обнаружена при влиянии всех исследуемых тяжелых металлов и в большом диапазоне влияния температур от +10 до +37 °С.</p> <p>Также данная форма функционирует в нормальных условиях (контроль (+23 °С).</p> <p>Форма проявилась во всех контрольных и опытных образцах в период вегетации на стадии первого тройчатого листа и в период цветения для культурной и дикой сои при влиянии солей исследуемых ТМ (Pb, Cd, Cu, Zn), независимо от вида металла и его концентрации, значит форма высоко устойчива к воздействию ТМ.</p> <p>Также форма обнаружена при влиянии супрамолекулярного комплекса ДГК+АГ в течение 5 часов, и при влиянии ДГК различных концентраций в течение 5 суток. Форма проявляется в период защиты ДГК от окислительного стресса, вызванного солями ТМ различных концентраций (Pb, Cd, Cu, Zn). Данная форма имеет наибольшую встречаемость и работает в различных условиях среды.</p>
-----	--

Таким образом, проанализированы и охарактеризованы МФ пероксидаз сои. Установлено функционирование МФ пероксидаз при действии окислительного стресса и в нормальных условиях. Форма П16 устойчива при влиянии солей Cu и Zn, при влиянии высоких температур форма не проявляется. В нормальных условиях без влияния стрессовых факторов не функционирует. Можно использовать как маркер адаптации при влиянии Cu и Zn. Форма П12 обнаружена при влиянии меди на всех стадиях периода вегетации сои, форму можно использовать как маркер устойчивости сои при влиянии меди.

Выявлено, что низкомолекулярные формы пероксидаз проявляются в процессе действия стресса и в период последствия стресса, высокомолекулярные формы обладают крайне редкой встречаемостью.

У Андреевой (1988) и Сарсенбаева (1986) указано, что пероксидаза достаточно устойчива к кратковременному воздействию высоких температур.

По данным, взятых из работ Луцкого (2019) выявлено, что большинство ключевых ферментов растений термолабильны, включая пероксидазу, каталазу и СОД. Наши эксперименты данные факты подтвердили, при этом были выявлены наиболее устойчивые формы пероксидаз к кратковременному воздействию высокой температуры П5 и П6.

У многих авторов (Гуральчук, 1994; Дмитриева, 2002; Perfus-Barbeoch, 2002; Егорова, 2007; Verbruggen, 2009; Загоскина, 2010; Бабкина, 2018) описано воздействие ТМ на растения. В основном показано, что ТМ снижают ростовую активность, нарушают эколого-биохимические процессы. Полученные нами данные по влиянию ТМ на семена, проростки и растения сои в разные вегетационные периоды подтверждают предыдущие исследования. Так свинец и кадмий угнетают проростки сои, попадая в растение и вызывая при этом процессы окислительного стресса в клетках, при этом повышается уровень малонового диальдегида, ухудшаются ростовые процессы, изменяется активность пероксидаз и количество изофлавонов.

В экспериментах, проведенных Гансом Селье исследовано, что адаптивная реакция организма на различные неблагоприятные факторы развивается в одинаковом порядке (Селье, 1979). В результате проведенных исследований показано, что при влиянии ТМ, низкой положительной и высокой температурах на сою вызывают стресс, увеличивая уровень МДА в отличие от контрольных образцов. Нами в основном изучена стадия адаптации к стрессу с участием изофлавонов и пероксидаз. Установлено, что в процессе стадии адаптации происходит накопление изофлавонов, изменяется активность и количество МФ пероксидаз. Причем на каждый стрессор появляется новая своя специфичная форма пероксидаз. Так, например, нами установлено, что форма пероксидаз П16 устойчива при влиянии солей Cu и Zn, поэтому ее можно использовать как маркер адаптации к влиянию Cu и Zn. Форма П12 обнаружена при влиянии меди на всех стадиях периода вегетации сои, форму можно использовать как маркер устойчивости сои к влиянию меди. При этом повышается устойчивость к воздействию стресса, улучшаются

биометрические характеристики сои, увеличивается масса и высота проростков, что подтверждает исследования Г. Селье.

Рядом авторов (Zhang, 2006; Yaya Hasanah, 2018) показано, что для повышения антиоксидантного статуса растений, если эндогенная антиоксидантная система не справляется, принято включать в механизмы защиты эндогенные антиоксиданты. Нами для этих целей использован природный экзогенный для сои полифенольный антиоксидант ДГК, помогающий справиться растению сои с окислительным стрессом, являющийся аналогом эндогенных антиоксидантов сои изофлавонов. Данный флавоноид проявил высокое защитное действие от окислительного стресса, вызванного ТМ и различными температурами, в результате появились новые МФ пероксидаз П10 и П15, функционирующие в данных условиях.

У Иваченко (2012) приведены обобщенные характеристики форм пероксидаз сои при различных условиях выращивания, в основном описываются климатические условия разных лет. Однако отсутствует информация по множественным формам пероксидаз сои, выявленных в условиях воздействия окислительного стресса.

Нами проанализирована встречаемость МФ пероксидаз сои, полученных при различных условиях среды. В таблице 13 указаны МФ, функционирующие в нормальных условиях и в условиях окислительного стресса под воздействием неблагоприятных факторов среды, вызванных высокими и низкими положительными температурами, действием ТМ (Pb, Cd, Cu, Zn).

Следует отметить, что форма П6 функционирует только в нормальных условиях среды, к любым факторам, отличающимся от нормальных форма не устойчива. Форма П16 устойчива при влиянии солей Cu и Zn, при влиянии высоких температур форма не проявляется. В нормальных условиях не функционирует, поэтому форму П16 можно использовать как маркер адаптации при влиянии Cu и Zn. Форма П12 обнаружена при влиянии меди на всех стадиях периода вегетации сои, форму можно использовать как маркер устойчивости сои при влиянии меди. МФ П5 проявляется при влиянии

сульфата свинца, поэтому её можно использовать как маркер устойчивости к данному металлу. Форма П4 обнаружена только при влиянии сульфата кадмия, является маркером устойчивости к кадмию.

Таблица 13.

Встречаемость МФ пероксидаз сои, выявленных в различных условиях среды

№	Условия встречаемости МФ	МФ, встречаемой в данных условиях
1	влияние сульфата свинца	П2, П3, П5, П9, П11, П13, П14, П15
2	влияние сульфата кадмия	П1, П2, П4, П7, П9, П13, П14, П15
3	влияние сульфата меди	П1, П2, П7, П9, П11, П12, П13, П14, П15, П16
4	влияние сульфата цинка	П2, П3, П9, П11, П13, П14, П15, П16
5	низкая температура +4°C	П4, П5, П15
6	высокая температура +45°C	П5, П8, П15
7	нормальная температура +23°C	П1, П6
8	влияние ДГК (формирование устойчивости к окислительному стрессу)	П4, П9, П10, П13, П14, П15
9	Контрольные формы, проявляющиеся только в нормальных условиях среды	П6
10	Устойчивые формы, встречающиеся при любых условиях среды	П13, П15, П17, П18

МФ П14 проявляется в условиях окислительного стресса, вызванного действием исследуемых солей ТМ, также функционирует и формировании устойчивости сои к действию окислительного стресса с участием ДГК. МФ П5 и П15 устойчивы к действию окислительного стресса, вызванного действием температур +4°C и +45°C.

Нами установлено, что самыми адаптивными формами пероксидаз к условиям среды являются П17 и П18. Формы П4, П13 и П14 проявляются при окислительном стрессе, вызванном действием солей кадмия и свинца исследованных концентраций. Форма П16 устойчива при влиянии солей Cu и Zn. Форма П12 обнаружена при влиянии только Cu на всех стадиях периода вегетации сои.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время интенсивно изучаются эколого-биохимические основы устойчивости растений к воздействию различных стрессоров (влияние тяжелых металлов, засухи, засоления, температуры и т.д.). В постоянно меняющихся условиях среды нет абсолютно совершенной устойчивости, как нет и абсолютно полной адаптации организма к условиям внешней среды. В этом проявляются ограниченность, незавершенность устойчивости организмов к неблагоприятным факторам среды, поэтому возникает необходимость ее постоянного совершенствования. Этот вопрос стал особенно актуальным в связи с глобальным изменением климата, который приводит к резким перепадам температур, и интенсивным загрязнением окружающей среды, что вызывает у растений окислительный стресс, который в свою очередь значительно снижает урожайность сельскохозяйственных культур.

Соя является важной культурой Мирового значения (Singh, 2010; Ng, 2011). Устойчивость сои к влиянию окружающей среды определяется функционированием защитных систем, в том числе антиоксидантного комплекса, в который входит низкомолекулярные вещества – изофлавоны и высокомолекулярные вещества – ферменты.

Пероксидаза является отзывчивым ферментом, активно участвующим в защите сои от окислительного стресса (Андреева, 1988; Рогожин, 2010). Нами установлено, что удельная активность пероксидаз семян сои значительно различается в зависимости от вида ткани семени. Минимальная удельная активность пероксидаз выявлена в семядолях, составляет 3,8 ед/мг белка, а максимальная – в семенной оболочке, значение ее составляет 6099,2 ед/мг белка. Наличие высокой удельной активности пероксидаз в семенной оболочке культурной сои доказывает, что пероксидаза входит в состав антиоксидантной системы и определяет уровень устойчивости растений к различным воздействующим факторам.

Изучены физико-химические свойства пероксидазы сои. Наши результаты показывают, что пероксидаза культурной сои активно работает в кислой среде при рН 4,7, а это достаточно важно для кислых сельскохозяйственных почв Амурской области, при этом пероксидаза семян дикой сои активна при рН 5,4. Согласно литературным данным (Андреева, 1988; Рогожин, 2010) пероксидаза может работать в широком интервале рН, и полученные данные этому не противоречат.

В работах Рогожина (2004) и Андреевой (1988) также отмечено, что пероксидаза принимает участие в росте и развитии растений. В результате проведенных нами исследований также подтверждено данное утверждение, что данный фермент принимает активное участие в процессах роста и развития сои. Так, анализ динамики пероксидазной активности в проростках сои в процессе роста и развития показал увеличение удельной активности пероксидаз через 5 часов, 5 суток, 14 суток и 21 день.

В работах Крежовой (Krezhova, 2011) подтверждено антиоксидантное действие изофлавонов сои в доклинических исследованиях на мышцах. Для растений подобных исследований мало проводилось, так в работах Загоскиной (2005, 2010, 2016) и Shalata (2001) указано, что при воздействии стрессовых факторов, в том числе ТМ и температур происходит изменение количества фенольных веществ, в основном показано накопление полифенолов для растений. Для сои такие исследования не проведены. Полученные нами данные по увеличению общего содержания изофлавонов в семенах, проростках и растениях сои при влиянии ТМ, низкой положительной и высокой температурах подтверждают литературные данные о накоплении полифенолов в стрессовых ситуациях, в том числе при воздействии окислительного стресса.

В работе TonyJ. приводятся данные о накоплении изофлавонов в соевых бобах при действии удобрений, содержащих калий (Tony, 2002). В работах Zhang B. (2006) и Yaya Hasanah (2018) приводятся данные об увеличении концентрации изофлавонов при влиянии элиситоров, Zhang F. (2000) вел

анализ взаимосвязи наличия азота и накопления изофлавонов в корневых системах сои. В проведенных нами экспериментах также обнаружено, что при влиянии ДГК (элиситор) способствует увеличению изофлавонов в сое, таких как глицитин и генистин, что способствовало лучшей адаптации к действию тяжелых металлов (Cd, Pb, Zn, Cu).

В работе Тараховского (2013) отмечено, что в *Glycine max* содержится большое количество изофлавонов, где присутствуют генистеин, даидзеин и, в меньших количествах, глицитеин. В проведенных исследованиях получено очень низкое содержание всех трех изофлавонов, но в семенах сои обнаружены гликозидные формы данных изофлавоноидов: генистина 0,9-0,95 мг/кг, даидзина 0,22-0,31 мг/кг, генистина 0,75-0,83 мг/кг. При влиянии различных факторов данное содержание изменяется.

Растения, в силу прикрепленного образа жизни, выработали различные системы защиты, к числу которых относится и биосинтез фенольных соединений, в том числе изофлавонов – веществ с высокой биологической и антиоксидантной активностью, которые не только препятствуют развитию окислительного стресса в растениях при действии поллютантов, но и участвуют в комплексообразовании с ионами ТМ, тем самым препятствуя их поступлению и снижая последствия техногенных воздействий (Al-Tawaha, 2005, 2006).

В результате всего комплекса проведенных экспериментов, нами обобщены и охарактеризованы формы пероксидаз, функционирующие в нормальных условиях и при воздействии окислительного стресса.

ВЫВОДЫ

1. Активность пероксидаз культурной и дикой сои при воздействии разной кислотности, добавлении разного количества комплементарных белков и субстрата – пероксида водорода – колеблется в широком диапазоне от 22,1 и до 37,5 ед./мг белка для культурной сои, и от 494,4 и до 656,7 ед./мг белка для дикой сои. Оптимум протекания ферментной реакции и максимальная удельная активность пероксидаз для семян культурной сои достигается при pH 4,7, что составляет 37,5 ед./мг белка, а для дикой – при pH 5,5, что составляет 656,7 ед./мг белка. При концентрации субстрата (пероксида водорода) 0,3% удельная активность пероксидаз для культурной сои составляет 55,5 ед./мг белка, для дикой – 282,2 ед./мг белка, дальнейшее увеличение концентрации субстрата не приводит к увеличению активности. Показано, что скорость энзиматической реакции в семенах сои пропорциональна концентрации фермента в пробе и увеличивается по мере увеличения белка.

2. Установлено, что для оценки уровня загрязнения почв ТМ в качестве индикатора можно использовать МФ пероксидаз П16, устойчивую к солям Cu и Zn, поскольку она появляется только при внесении в почву и при обработке семян растворами этих солей. С той же целью можно использовать форму пероксидаз П12, которая обнаруживается под воздействием на сою Cu на всех стадиях ее вегетации, форму можно использовать как маркер устойчивости сои при влиянии меди. Форма П5 проявляется при действии свинца, форма П4 – кадмия. Таким образом, МФ пероксидаз можно использовать для оценки уровня загрязнения почв медью, цинком, кадмием и свинцом.

3. Стрессовое воздействие низких и высоких положительных температур приводит к увеличению в семенах дикой сои уровня МДА (нмоль/г). Если в норме при температуре +23°C его содержание составляет 2,12, то при +4°C уровень повышается до 4,86, а при +45°C – до 5,96. Для семян культурной сои при +23°C МДА составляет 1,80 при температуре +4°C достигает 3,4 и при +45°C – 4,12. Изменение у сои МДА, таким образом, является надежным показателем температурного стресса. Температурный

фактор приводит также к увеличению активности пероксидаз. Наибольшая она при +10°C – 143,9 ед./мг белка для культурной и 995,5 ед./мг белка – для дикой сои. В ходе проращивания семян при +23°C у дикой и культурной сои обнаружены по 3 МФ с разной Rf: средней (П4, П6) и низкой (П17). В условиях холодого (+4°C) и теплового (+45°C) стрессов в семенах сои выявлена только одна форма пероксидаз (П6), что является показателем адаптивных изменений ферментной системы к температурному стрессу.

4. Охарактеризованы и описаны МФ пероксидаз культурной и дикой сои. Выявлена их активность в процессах их адаптации к окислительному стрессу. Установлено, что МФ пероксидаз сои подвергаются изменению в условиях окислительного стресса. При воздействии солей ТМ появляются новые формы пероксидаз с высокой и средней Rf П2, П5, П9, П10, П11, П14 и это является показателем процессов адаптации сои к окислительному стрессу, вызванному действием ТМ. В контрольных образцах культурной сои было 4 МФ, после внесения ТМ у культурной сои их становится 8, а у дикой – 11. Это свидетельствует о повышенном адаптивном потенциале дикой сои. Формы П17 и П18 проявляются при всех стрессовых воздействиях. Формы П4, П13 и П14 проявляются при окислительном стрессе, вызванном действием разных концентраций соли кадмия, что позволяет использовать указанные формы пероксидазы в качестве индикаторов загрязнения почв, используемых для культивирования сои.

5. Разработан хроматографический метод определения состава изофлавонов и их содержания в разных органах растений сои на хроматографе «Милихром А-02». Подобраны оптимальные условия элюирования изофлавонов для их эффективного разделения. Данный метод позволяет эффективно разделить на хроматограмме исследуемые изофлавоны: даидзин, глицитин, генистин, глицитеин, получить пики и обнаружить количества изофлавонов с высокой точностью при весьма низких их содержаниях в семенах, проростках и растениях сои.

6. Экзогенный полифенольный антиоксидант ДГК повышает устойчивость сои к воздействию солей ТМ. Его внесение способствует формированию защитного механизма сои от окислительного стресса при воздействии на нее низких концентрациях солей ТМ. ДГК снижает уровень МДА, повышает удельную активность пероксидаз, приводит к появлению форм П10 и П15. При его воздействии снижается уровень изофлавона даидзина, и повышается уровень остальных изофлавонов. Обработка семян солями кадмия увеличивает количество даидзина и уменьшает содержание изофлавонов генистина и глицитина. Это позволяет говорить об их участии в формировании у сои защитного механизма к окислительному стрессу, вызванному действием ТМ. Внесение ДГК улучшает адаптивные способности проростков сои к температурному стрессу, вызванному высокой (+45°C) и низкой положительной (+4°C) температурами и заметно снижает при этом уровень МДА.

7. На основе природного полифенольного антиоксиданта ДГК, выделенного из листовницы Даурской, разработан стимулятор роста растений, значительно повышающий устойчивость сои к неблагоприятным факторам среды и способствующий повышению ее урожайности в сложных агроклиматических условиях Амурской области на 20%.

Рекомендации к практическому применению

Установлено, что ДГК, АГ и их водорастворимый комплекс обладают ростостимулирующей активностью. На их основе компанией «Аметис» разработан и зарегистрирован регулятор роста сои под названием «ЭкоЛарикс» и разрешен к применению в сельском хозяйстве в России, (СГР 253-07-721-1 от 29 июля 2015 г.) и внедрен в практическое использование.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ала А.Я. Соя: Генетические методы селекции *G. Max (L.) Merr. x G. soja.* / А.Я. Ала, В.А. Тильба // Благовещенск, Изд-во «Зея», 2005. – 126 с.
2. Алексеев В.Г. Устойчивость растений в условиях Севера: эколого-биохимические аспекты / В.Г. Алексеев.– Новосибирск: ВО «Наука». Сибирская издательская фирма, 1994.– 152 с.
3. Алёхина Н.Д. Физиология растений: Учебник для вузов / Н.Д. Алёхина Ю. В. Балнокин, В. Ф. Гавриленко и др., под ред. Е.П. Ермакова. – М.: Изд. центр «Академия», 2005. – 640 с.
4. Андреева В.А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений / В.А. Андреева – М.: Наука, 1988. – 302 с.
5. Афанасьева Н.Б. Введение в экологию растений: учебное пособие / Н.Б. Афанасьева, Н.А. Березина – М.: Изд-во Московского университета. – 2011. – 800 с.
6. Бабкина Л.А. Особенности аккумуляции тяжелых металлов листьями подорожника большого (*Plantago major* L.) в условиях урбанизированных территорий / Л.А. Бабкина, Д.С. Лукьянчиков, О.В. Лукьянчикова // Самарский научный вестник. – 2018. – Т.7. – № 1 (22). – С. 19-24.
7. Барабой В.А. Изофлавоны сои: биологическая активность и применение / В.А. Барабой // Биотехнология. – 2009 – Т.2 (3). – С. 44-54.
8. Бирюк Е.Н. Изменения в пероксидазном составе листьев яблок под воздействием низких температур / Е.Н. Бирюк // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия аграрных наук.– 2003. – №2. – С. 62-65.
9. Большаков В.А. Микроэлементы и тяжелые металлы в почвах / В.А. Большаков // Почвоведение. – 2002. – №7. – С. 844-849.
10. Бородина Н. А. Эколого-химическая характеристика урбанизированных территорий Амурской области: автореферат дис. ... канд. биол. наук 03.02.08 / Бородина Н.А.; Дальневост. федер. ун-т. - Владивосток, 2016. – 20 с.
11. Васильева Г.Г. Активные формы кислорода и антиоксидантные ферменты на начальных стадиях взаимодействия гороха с клубеньковыми бактериями

- (*Rhizobiumleguminosarum*) / Г.Г. Васильева // Автореф. дис...к.б.н. – Иркутск. – 2004. – 23 с.
12. Волынец А. Фенольные соединения в жизнедеятельности растений. – Минск, 2014. – 283 с.
13. Гуральчук Ж.З. Механизмы устойчивости растений к тяжелым металлам // Физиология и биохимия культ. растений. – 1994. – Т. 26, № 2. – С. 107-117.
14. Граскова И.А. Изменение активности внеклеточной пероксидазы суспензионных клеток картофеля при стрессе/ И.А. Граскова, Г.Б. Боровский, А.В. Колесниченко, В.К. Войников// Стрессовые белки растений: Мат-лы Всероссийской научной конференции, 6-10 сентября 2004 г., Иркутск, Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН. – Иркутск: Изд-во института географии СО РАН. – 2004. – С. 39-43.
15. Дмитриева А.Г., Физиология растительных организмов и роль металлов / А.Г. Дмитриева, О.А.Кожанова, Н.Л. Дронина – М.: Изд-во МГУ, 2002. – 160 с.
16. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) /Б.А. Доспехов. – М.: АГРО Промиздат, 1985 – 351 с.
17. Дьякова Н.А. Особенности накопления водорастворимых полисахаридов корнями одуванчика лекарственного / Н.А. Дьякова, А.А. Мындра, А.И. Сливкин, С.П. Гапонов// Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2018. – № 2. – С. 292-297.
18. Егорова Е.А. Поведение тяжелых металлов в серой лесной почве при орошении многолетних трав / Е.А. Егорова, А.В. Нефедова // Сборник материалов II Международной научной конференции «Современные проблемы загрязнения почв». – Москва, МГУ им. М.В. Ломоносова. – 2007. – т. 1. – С. 87-90.
19. Еремченко О.З. Повышение редокс-активности растений как тест-реакция на загрязнение почв / О.З. Еремченко, И.Е. Шестаков, Я.А. Паршакова // Вестн. Тамбов. ун-та. Сер. Естеств. и техн. науки. – 2014. – Т. 19. – С. 1285-1288.

20. Жаврид А.В. Оценка качества биологически активной добавки к пище, содержащей экстракт сои / А.В. Жаврид, В.И. Фадеев, М.Л. Пивовар // Вестник фармации. 2019. – №2(84). – С. 50-56.
21. Загоскина Н.В. Полифенолы высших растений: структура, биосинтез, экологическая роль / Н.В. Загоскина // Сборник материалов V международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологической и химической экологии». – М.: МГУ, 2016. – С. 228–230.
22. Загоскина Н.В. Изменения в СО₂-газообмене и образовании фенольных соединений у растений озимой пшеницы как следствие холодового закаливания / Н.В. Загоскина, Н.А. Олениченко, С.В. Климов, Н.В. Астахова, Е.А. Живухина, Т.И. Трунова // Физиология растений. – 2005. – Т. 52. – С.366-371.
23. Загоскина Н.В. О влиянии тяжелых металлов (Cd, Pb) на образование фенольных соединений в клетках чайного растения / Н.В. Загоскина, П.В. Лапшин, А.К. Алявина, Т.Н. Нечаева, Е.А. Гончарук, Т.Н. Николаева // Журнал «Нетрадиционные сельскохозяйственные, лекарственные и декоративные растения». – М.: Изд-во РУДН. – 2010. – № 1(5). – С.45-51.
24. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растения / М.Н. Запрометов // 56-е Тимирязевское чтение. – М.: Наука, 1996. – 272 с.
25. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: Распространение, метаболизм и функции в растениях / М.Н. Запрометов. – М.: Наука, 1993. – 272 с.
26. Зенков Н.К. Фенольные биоантиоксиданты / Н.К. Зенков, Н.В. Кандалинцева, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова, А.Е. Просенко – Новосибирск, 2003. – 328 с.
27. Зыкова В.В. Участие активных форм кислорода в реакции митохондрий растений на низкотемпературный стресс / В.В. Зыкова, А.В. Колесниченко, В.К. Войников // Физиология растений. – 2002. – № 2. – С.302-310.
28. Иваченко, Л.Е. Активность и множественные формы ферментов в семенах сои, полученных в разных агроклиматических условиях Амурской области. Ч.1. Пероксидазы / Л.Е. Иваченко, Г.П. Ефимова // Проблемы экологии Верх.

Приамурья: сб. научн. тр. – Вып.2. – Благовещенск: Изд-во БГПИ. – 1995. – С. 5-15.

29. Иваченко Л.Е. Введение в эндоэкологию. Ч.1 Молекулярные механизмы адаптации: учебное пособие /Л.Е. Иваченко // Благовещенск: Изд-во БГПУ, 2006. – 145 с.

30. Иваченко Л.Е. Использование физико-химических методов исследования для маркирования генома сои / Л.Е. Иваченко, С.И. Лаврентьева, В.А. Кузнецова, А.В. Казакова, Н.Ю. Зазимко, М.В. Якименко, М.С. Гинс // Нетрадиционные сельскохозяйственные, лекарственные и декоративные растения. – 2011. – №1 (6). – С. 83-84.

31. Иваченко Л.Е. Ферменты сои: монография / Л.Е. Иваченко // Благовещенск: Изд-во БГПУ, 2010. – 214 с.

32. Ильин В.Б. Тяжелые металлы и неметаллы в системе почва-растение / В.Б. Ильин. – Новосибирск, 2012. – 218 с.

33. Кабашникова Л.Ф. Фотосинтетический аппарат и стресс у растений / Л.Ф. Кабашникова. – Минск: Беларуская наука, 2014. – 267 с.

34. Казаков А.Л. Хиля В.П., Межеричкий В.В., Литке Ю. Природные и модифицированные изофлавоноиды /А.Л. Казаков, В.П. Хиля, В.В. Межеричкий, Ю. Литке // Изд-во Ростовского университета, 1985 – 184 с.

35. Казнина Н.М. Влияние кадмия на некоторые физиологические показатели растений ячменя в зависимости от их возраста / М.Н. Казнина, А.Ф. Титов, Г.Ф. Лайдинен, Ю.В. Батова // Тр. Карельск. научн. центра РАН. – 2010. – № 2. – С. 27-31.

36. Казнина Н.М. Содержание непротеиновых тиолов в клетках корня дикорастущих многолетних злаков при действии кадмия и свинца / Н.М. Казнина, А.Ф. Титов, Ю.В. Батова // Труды Карельского научного центра РАН. – 2014. – № 5. – С. 182-187.

37. Каюмов М.К. Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений: учебное пособие / М.К. Каюмов. – ФГОУ ВПО Росс. гос. аграр. заоч. университет. – М., 2004. – 190 с.

38. Квеститатдзе Г.И. Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях / Г.И. Квеститатдзе, Г.А. Хатисашвили, Т.А. Садунишвили, З.Г.Евстигнеева– М.,2005. – 199 с.
39. Козак М.Ф. Результаты исследований гибридов культурной и дикорастущей сои / М.Ф. Козак // Естественные науки. –2018. – № 1 (62). – С. 7-27.
40. Колупаев Ю.Е. Антиоксидантная система растений: участие в клеточной сигнализации и адаптации к действию стрессоров /Ю.Е. Колупаев, Ю.В. Карпец, А.И. Обозный // Вестник Харьковского национального университета. Серия Биология. – 2011. – Вып. 1 (22). – С. 6-34.
41. Корсун А.А. Изофлавоны в соцветиях *Trifolium Pretensei* Lathyrus Tuberosus, произрастающих на территории Донбасса / А.А. Корсун, М.И. Бойко// Мат-лы I Международной научной конференции «Донецкие чтения 2016. Образование, наука и вызовы современности». Под общей ред. С.В. Беспаловой. – 2016. – С. 219-221.
42. Корулькин Д.Ю. Природные флавоноиды / Д.Ю. Корулькин [и др.] – Новосибирск: Тео, 2007. – 232 с.
43. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии: [Для биол. спец. ун-тов] / Под общ. ред. С.Е. Северина.– М.: ВШ, 1980. – 272 с.
44. Кравченко Л.В. Оценка антиоксидантной и антитоксической эффективности природного флавоноида дигидрокверцетина / Л.В. Кравченко С.В. Морозов, Л.И. Авреньева, В.А. Бабкин, В.А.Тутельян // Токсикологический вестник. – М.: ФБУЗ Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ. 2005. – № 01– 56 с.
45. Креславский В.Д. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений /В.Д. Креславский, Д.А. Лось, С.И. Аллахвердиев, Вл.В. Кузнецов // Физиология растений. – 2012. – Т. 59. – С. 1-16.
46. Кретович В.Л. Биохимия растений /В.Л. Кретович. – М.: ВШ, 1986. – 456 с.

47. Кретович В.Л. Введение в энзимологию / В.Л. Кретович. – М.: Наука, 1988. – 332 с.
48. Кузнецова Е.В. Изучение полиморфизма слабосвязанной с клеточной стенкой пероксидазы в разных по росту формах яблони сибирской / Е.В. Кузнецова, [и др.] // Устойчивость растений к неблагоприятным факторам внешней среды: материалы Всероссийской научной конференции 16-19 сентября 2007 г. / Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН. – Иркутск: РИОНЦ РВХ ВСНЦ СО РАМН. – 2007. – С. 143-145.
49. Курбатова, Н.В. Анатомо-морфологические и фито-химические исследования *Peganumharmala*L. / N.V. Kurbatova [etall.] // Вестник КазНУ. Сер. биологическая. – 2016. – Т. 67 (2). – С. 4-14.
50. Лаврентьева С.И. Рибонуклеазная активность проростков сои в условиях окислительного стресса / С.И. Лаврентьева, О.А. Терехова, Л.Е. Иваченко, К.С. Голохваст, А.С. Коничев // Вестник КамчатГТУ, 2019. – №47. – С. 79-85.
51. Лапина Г.П. Пероксидазы растений и гидролазы: структурные и регуляторные свойства: монография / Г.П. Лапина // Тверь: Твер. гос.ун-т, 2009. – 116 с.
52. Лисник С.С. Содержание пролина и активность пероксидазы в листьях сахарной свёклы (*Beta Vulgaris L.*) при избытке цинка в среде / С.С. Лисник, Ю.Л. Корецкая // Сборник материалов V Международной научно-методологической конференции: «Роль физиологии и биохимии в интродукции и селекции сельскохозяйственных растений» в 2 томах. – Российский университет дружбы народов. – 2019. – С. 68-71.
53. Лукаткин А.С. Вклад окислительного стресса в развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. Активность антиоксидантных ферментов в динамике охлаждения / А.С. Лукаткин // Физиология растений. – 2002. – №6. – С. 878-885.
54. Лукаткин А.С. Вклад окислительного стресса в развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. Образование

активированных форм кислорода при охлаждении растений / А.С. Лукаткин // Физиология растений. – 2002. – №5. – С. 697-702.

55. Лукаткин А.С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс / А.С. Лукаткин // Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2002. – 208 с.

56. Лукаткин А.С. Влияние регулятора роста эпин-экстра на растения пшеницы при действии тяжелых металлов / А.С. Лукаткин, К.А. Грузнова, Д.И. Башмаков, А.А. Лукаткин // Агрехимия. 2019. – № 2. – С. 81-88.

57. Луцкий Е.О. Влияние водного и температурного стресса на активность антиоксидантных ферментов винограда /Е.О. Луцкий, М.А. Сундырева, В.В. Хаблюк // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2019. – № 56 (02). – С. 110-121.

58. Макарова М.Н. Молекулярная биология флавоноидов (химия, биохимия, фармакология): Руководство для врачей /М.Н. Макарова, В.Г. Макаров. – Спб.: изд-во Лема, 2010. – 428 с.

59. Мазей Н.Г. Влияние тяжелых металлов и пониженных температур на морфофизиологические процессы прорастания гречихи и пшеницы /Н.Г. Мазей, А.Е. Медная // Изв. Пензенск. гос. ун-та. – 2011. – № 25. – С. 624-631.

60. Малый практикум по физиологии растений: Учеб. пособие / Под ред. А.Т. Мокроносова. – М.: Изд-во МГУ, 1994. – 184 с.

61. Мартынов В.В., Дорохов Д.Б. Изучение взаимодействия дикой сои (*Glycine soja sieb. & zuss.*) с генетически модифицированной соей (*Glycine max (l.) merr.*) в центре происхождения видов на Дальнем востоке Российской Федерации // Сборник материалов V международной научно-практической конференции Актуальные проблемы биологической и химической экологии. 2016. – С. 115-120.

62. Масленников П.В. Роль низкомолекулярных антиоксидантов в адаптации озимой ржи (*Secale cereale L.*) к токсическому действию $CdCl_2$ / П.В. Масленников, Э.Т. Велиева, Ю.Р. Галямова // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2013. – № 12. – С. 48-51.

63. Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты /Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков, И.А. Бондарь, Н.Ф. Круговых, В.А. Труфакин – М.: Изд-во «Слово», 2006. – 556 с.
64. Мерзляк М.Н. Активированный кислород и жизнедеятельность растений / М.Н. Мерзляк // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – №9. – С. 20-26.
65. Методы биохимического исследования растений /под ред. А.И. Ермакова –Л.: Агропромиздат, Ленинградское отделение, 1987.–169 с.
66. Микроэлементы в окружающей среде: биогеохимия, биотехнология и биоремедиация / Под ред. М.Н.В. Прасада, К.С. Саджавана, Р. Найду. – М.: Физматлит, 2009. – 816 с.
67. Минибаева Ф.В. Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе /Ф.В. Минибаева, Л.Х. Гордон // Физиология растений. –2003. – Т.50. – №3 – С. 459-463.
68. Минибаева Ф.В. Роль активных форм кислорода и экстраклеточных пероксидаз в раневом стрессе растительных клеток / Ф.В. Минибаева // Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН – 2000. – С. 77-81.
69. Михайлова Е.В. Значение каталазной и пероксидазной активности в повышении болезнеустойчивости персика к курчавости / Е.В. Михайлова, Э.Б. Янушевская, Н.Н. Карпун // Известия сельскохозяйственной науки Тавриды. – 2019. – № 17 (180). – С. 48-57.
70. Муравьев А.А. Урожай и качество семян сортов сои в лесостепи цзр на разноудобренных фонах / А.А. Муравьев, А.Г. Демидова // Земледелие. – 2018. – № 3. – С. 22-25.
71. Науменко В.Д. Растительные изофлавоны: биосинтез, детектирование и биологические свойства / В. Д. Науменко, Б. В. Сорочинская, В. И. Колычев // Biotechnologia acta. – 2013. – V.6. – No 5. – P. 62-78.
72. Никерова К.М. Ферменты антиоксидантной системы – индикаторы разных сценариев ксилогенеза: в раннем онтогенезе и во взрослом состоянии (на примере *Betula pendula Roth*) / К.М. Никерова, Н.А. Галибина, Ю. Л.

Мощенская, Л.Л. Новицкая, М.Н. Подгорная, И.Н. Софронова // Труды Карельского научного центра Российской академии наук. – 2018. – № 6. – С. 68-80.

73. Ознобихина А.О. Границы всхожести семян фитомелиорантов в присутствии токсичных концентраций тяжелых металлов // Самарский научный вестник. – 2019. – Т. 8. – № 1 (26). – С. 82-86.

74. Овчаренко М.М. Тяжелые металлы в системе почва-растение-удобрение // Химия в сельском хозяйстве. – 1995. – № 4. – С. 8-16.

75. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование / Л.А. Остерман. – М.: Наука, 1981. – 323 с.

76. Остронков В.С. Супрамолекулярный комплекс, обладающий противовоспалительной и ангиопротекторной активностью и способ его получения. / В.С. Остронков, С.А. Лашин // Патент № 2533231, Бюл. № 32. 2014.

77. Плакунов В.К. Основы энзимологии: [Учеб. пособие для вузов] / В.К. Плакунов. – М.: Логос, 2001. – 126 с.

78. Платонова Н.Б. Динамика активности фермента пероксидаза как элемента антиоксидантной защиты чая *Camellia Sinensis (L.) Kuntze* / Н.Б. Платонова, О.Г. Белоус // Субтропическое и декоративное садоводство. – 2019. – № 68. – С. 197-201.

79. Плешков Б.П. Изоферменты растений / Б.П. Плешков. – М.: ВШ, 1975. – 76 с.

80. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений / Б.П. Плешков. – М.: Колос, 1985. – 175 с.

81. Плохинский Н.А. Биометрия. / Н.А. Плохинский. – М.: Изд-во МГУ, 1970. – 367 с.

82. Покровская С.Ф. Регулирование поведения свинца и кадмия в системе почва-растение. – М., 1995. – 52 с.

83. Половникова М.Г. Оценка влияния солей тяжелых металлов на всхожесть и скорость прорастания семян некоторых видов растений семейств Fabaceae и Roaseae / М.Г. Половникова, О.Л. Воскресенская // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2018. – № 70. – С. 86-90.
84. Прасад М.Н.В. Растения, аккумулирующие и/или исключают токсичные микроэлементы, и их роль в фиторемедиации // Микроэлементы в окружающей среде: биогеохимия, биотехнология и биоремедиация / Под ред. М.Н.В. Прасада К.С. Саджвана, Р. Найду. – М., 2009. – С. 592-620.
85. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода: учебное пособие / О.Г. Полесская; Под ред. И.П. Ермакова. – Москва: КДУ, 2007. – 140 с.
86. Полесская О.Г. Влияние солевого стресса на антиоксидантную систему растений в зависимости от условий азотного питания / О.Г. Полесская, Е.К. Каширина, Н.Д. Алехина // Физиология растений. – М., 2006. – Т. 53 (2). – С. 207-214.
87. Попов А.А. Изучение пероксидазной активности у различных культур при длительном воздействии низких положительных температур / А.А. Попов, В.А. Чепалов, Т.П. Говорова // Роль сельскохозяйственной науки в стабилизации и развитии агропромышленного производства Крайнего Севера / Сборник материалов научно-практической конференции, посвященной 45-летию Якутского НИИСХ СО РАСХНи 85-летию со дня рождения М.Г. Сафронова (Якутск, 26-27 декабря 2001 г.) / РАСХН. Сибирское отделение Якутского НИИСХ. – Новосибирск. – 2003. – С. 140-142.
88. Попова А.А. Влияние минеральных и органических удобрений на состояние тяжелых металлов в почвах / А.А. Попова // Агробиология. – 1991. – № 3. – С. 62-67.
89. Прадедова Е.В. Классификация системы антиоксидантной защиты как основа рациональной организации экспериментального исследования окислительного стресса у растений / Е.В. Прадедова, О.Д. Ишеева, Р.К. Салаев // Физиология растений. – 2011. – Т. 58. – С. 177-185.

90. Прохорова Н.В. Аккумуляция тяжелых металлов дикорастущими и культурными растениями в лесостепном и степном Поволжье / Н.В. Прохорова, Н.М. Матвеев, В.А. Павловский // Самара: Самарский университет, 1998. – 131с.
91. Рогожин В.В. Пероксидаза: строение и механизм действия / В.В. Рогожин, В.В. Верхотуров, Т.В. Рогожина. – Иркутск: Из-во ИГТУ, 2004. – 200 с.
92. Рогожин В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов / В.В. Рогожин. – СПб.: ГИОРД, 2004. – 240 с.
93. Рогожин В.В. Пероксидаза растений / В.В. Рогожин. – Berlin: LambertAcademicPublishing, 2010. – 205 с.
94. Рогожина Т.В. Исследование активного центра и механизма действия пероксидазы с помощью функционально активных веществ / Т.В. Рогожина // Дис...к.б.н.. – Якутск, 2005. – 164 с.
95. Рогожина Т.В. Роль компонентов антиоксидантной системы в механизмах прорастания зерен пшеницы / Т.В. Рогожина, В.В. Рогожин // Вестник АГАУ. – 2010. – № 11(73). – С. 31-38.
96. Савич И.М. Пероксидазы - стрессовые белки растений / И.М. Савич // Успехи современной биологии. – 1989. – Т.107. – №3 – С. 406-417.
97. Садвакасова Г.Г. Некоторые физико-химические и биологические свойства пероксидазы растений / Г.Г. Садвакасова, Р.М. Кунаева // Физиология и биохимия культурных растений. – 1987. – Т. 19. – №2 – С. 107-119.
98. Сарсенбаев К. Н. Роль ферментов в устойчивости растений / К. Н. Сарсенбаев, Ф. А. Полимбетова. – АН КазССР, Гл. ботан. сад. - Алма-Ата : Наука, 1986. – 180 с.
99. Сафонов В.И. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле / В.И. Сафонов, М.П. Сафонова // Биохимические методы в физиологии. – М. – 1971. – С. 113-136.
100. Селье Г. Стресс без дистресса / Г. Селье. – М.: Прогресс, 1979. – 123 с.

101. Семендяева Н.В. Инструментальные методы исследования почв и растений: учеб.-метод. пособие / Новосиб. гос. аграр. ун-т. Агротом. фак. – СибНИИЗиХ Россельхозакадемии // Н.В. Семендяева, Л.П. Галеева, А.Н. Мармулев. – Новосибирск: Изд-во НГАУ, 2013. – 116 с.
102. Серегин И.В. Роль тканей корня и побега в транспорте и накоплении кадмия, свинца, никеля и стронция / И.В. Серегин, А.Д. Кожевникова // Физиология растений. – 2008. – Т. 55. – С. 3-26.
103. Сибгатуллина Г.В. Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений: учебнометодическое пособие / Г.В. Сибгатуллина Л.Р. Хаертдинова, Е.А. Гумерова, А.Н. Акулов, Ю.А. Костюкова, Н.А. Никонорова, Н.И. Румянцева. – Казань: Казанский (Приволжский) Федеральный университет, 2011. – 61 с.
104. Скрипников А.Ю. Физиологическая и биохимическая роль пероксидазы / А.Ю. Скрипников // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. – Мичуринск – 2009. – №1 – С. 123-130.
105. Скугорева С.Г. Химические основы токсического действия тяжёлых металлов / С.Г. Скугорева, Т.Я. Ашихмина, А.И. Фокина, Е.И. Лялина // Теор. и прикл. экология. – 2016. – № 1. – С. 4-13.
106. Соколик А.И. Особенности реакции корневой системы растений на тяжёлые металлы // Труды Белорусского госуд. университета. – 2009. – Т. 4 (часть 1). – С. 1-11.
107. Стаценко А.П. Изменчивость обменных процессов в растениях пшеницы при стрессовых воздействиях / А.П. Стаценко, А.А. Блинохватов // Инновационная техника и технология. – 2019. – № 2 (19). – С. 30-33.
108. Степанок В.Б. Влияние сочетания соединений тяжёлых металлов на урожай сельскохозяйственных культур и поступление тяжёлых металлов в растениях / В.Б. Степанок // Агротехника. – 2000. – № 1. – С. 74-80.
109. Суворов В.И. Изменение активности пероксидазной системы при действии гипертермии и засоления NaCl / В.И. Суворов, Л.А. Чудинова // Вестник Пермского университета – 2004. – №2. – С. 151-153.

110. Тамахина А.Я., Ахкубекова А.А., Иттиев А.Б. Динамика накопления аллантаина в подземной фитомассе видов семейства *Boraginaceae* и его роль в адаптации растений к неблагоприятным экологическим факторам // Юг России: экология, развитие. – 2019. – Т. 14. – №1(50). – С. 126-136.
111. Тараховский Ю.С. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю.С. Тараховский, Ю.А. Ким, Б.С. Абдрасилов, Е.Н. Музафаров – М., 2013. – 308 с.
112. Титов А.Ф. Тяжелые металлы и растения / А.Ф. Титов, Н.М. Казнина, В.В. Таланова. – Петрозаводск, 2014. – 194 с.
113. Титов А.Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам / А.Ф. Титов, В.В. Таланова, Н.М. Казнина, Г.Ф. Лайдинен – Петрозаводск, 2007. – 170 с.
114. Тупик Н.Д. Изоферментный спектр пероксидазы Chlorophyta / Н.Д. Тупик, Е.К. Золотарёва // Международный научно-технический журнал «Альгология» – 2008. – Т. 18 – № 2. – С. 123-134.
115. Тюкавкина Н.А. Органическая химия. Книга 1. Основной курс / Н.А. Тюкавкина. – 2-е изд., стереотипное. – М.: Дрофа, 2003. – 640 с.
116. Узаков З.З. Тяжелые металлы и их влияние на растения / З.З. Узаков // Символ науки. – 2018. – № 1-2. – С. 52-54.
117. Усманов И.Ю. Экологическая физиология растений / И.Ю. Усманов, З.Ф. Рахманкулова, А.Ю. Кулагин – М.: Логос, 2001. – 224 с.
118. Филиппович Ю.Б. Практикум по общей биохимии: Учебное пособие для студентов хим. спец. пед. ин-тов / Ю.Б. Филиппович, Т. А. Егорова, Г. А. Севастьянова. – 2-е изд., перераб. – М.: Просвещение, 1982. – 311 с.
119. Фирсова Д.М. Дигидрокверцетин - общее понятие, назначение и применение / Д.М. Фирсова, Н.В. Кенийз // Colloquium-journal. 2019. – №6-2(30). – С. 51-52.
120. Хуршкайнен, Т.В. Химический состав отходов переработки хвойного сырья / Т.В. Хуршкайнен, В.И. Терентьев, Н.Н. Скрипова, А.А. Королева, А.В. Кучин // Химия растительного сырья. 2019. – № 1. – С. 233-239.
121. Чмелёва С.И. Исследование устойчивости *Cucumis sativus* L. к осмотическому стрессу под действием синтетического регулятора роста

Циркон / С.И. Чмелёва, О.А. Павлюченкова // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. – 2018. – Т. 4 (70). – № 1. – С. 137-147.

122. Шерепитко В.В. Адаптивная селекция растений сои / В.В. Шерепитко // Международная научно-практ. конференция: Приоритетные направления в селекции и семеноводстве сельскохозяйственных растений в XXI веке (15-18 декабря 2003 г.). – М.: ГНУ ВНИИССОК. – 2003. – С. 184-188.

123. Шibaева Т.Г. Влияние ежесуточных кратковременных понижений температуры на теплолюбивые и холодостойкие растения / Т.Г. Шibaева, Е.Н. Икконен, Е.Г. Шерудило, А.Ф. Титов // Физиология растений. 2019. – Т. 66. – № 4. – С. 266-276.

124. Шibaева Т.Г. Влияние кратковременных ежесуточных понижений температуры на соотношение дыхания и фотосинтеза у теплолюбивых растений / Е.Н. Икконен, Т.Г. Шibaева, А.Ф. Титов // Физиология растений. – 2018. – Т. 65. – № 1. – С. 45-51.

125. Шукурова М.Х. Активность антиоксидантных систем растений картофеля в условиях солевого стресса в зависимости от форм азота в среде *in vitro* / М.Х. Шукурова, Н.Н. Назарова, З.Б. Давлятназарова, М.Л. Азимов, К. Карло, К. Алиев // Известия академии наук республики Таджикистан. – № 2 (171), – 2010 – С. 37-48.

126. Afanas'eva I.B. Enhancement of antioxidant and antiinflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals / I.B. Afanas'eva, E.A. Ostrakhovitch, E.V. Mikhailchik, G.A. Ibragimova, L.G. Korkina // Biochem. Pharmacol. – 2001. – V. 61. – P. 677-684.

127. Al-Tawaha A.M. Biotic elicitors as a means of increasing isoflavone content of soybean seeds / A.M. Al-Tawaha, P. Seguin, D. L. Smith, C. Beaulieu // Annals of Applied Biology. – 2005. – 146(3): P. 303-310.

128. Al-Tawaha A.M. Foliar application of elicitors alters isoflavone concentrations and other seed characteristics of field-grown soybean / A.M. Al-Tawaha, P. Seguin, D.L. Smith, C. Beaulieu // Can. J. Plant Sci. – 2006. – V. 86, P. 677-684.

129. Alonso R. Interactive effects of ozone and drought stress on pigments and activities of antioxidative enzymes in *Pinus halepensis* / R. Alonso [et all.] // *Plant, Cell and Environment*. – 2001. – V. 24. – P. 905-916.
130. Alscher R. G. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants / R.G. Alscher, N. Erturk, L.S. Heath // *Journal of Experimental Botany*. – 2002. – V. 53. – P. 1331-1341.
131. Anjum N.A. Modulation of glutathione and its related enzymes in plants responses to toxic metal and metalloids / N.A. Anjum // *Environ. Exp. Bot.* – 2012. – V. 75. – P. 307-324.
132. Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2004. – V. 55. – P. 373-399.
133. Arao T. Genotypic differences in cadmium uptake and distribution in soybeans / T. Arao, N. Ae, M. Sugiyama, M. Takahashi // *Plant Soil*. – 2003. – V. 251. – P. 247-253.
134. Aroca R. Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against oxidative stress during chilling and subsequent recovery in two maize varieties differing in chilling sensitivity / R. Aroca, J.J. Irigoyen, M. Sanchez-Diaz // *Plant Science*. – 2001. – V. 161. – P. 719-726.
135. Bethke P. C. Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species / P.C. Bethke, R.L. Jones // *The Plant Journal*. – 2001. – V. 25 (1). – P. 19-29.
136. Blokhina O. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review / O. Blokhina, E. Virolainen, K.V. Fagerstedt // *Ann. Bot.* – 2003. – V. 91. – P. 179-194.
137. Bothe H. Plants in heavy metal soils // *Detoxification of heavy metals* / Eds. I. Sheramei, A. Varma. – Berlin, Heidelberg, 2011. – P. 43-57.
138. Burkey K. O., Factors that affect leaf extracellular ascorbic acid content and redox status / K.O. Burkey, G. Eason, E.L. Fiscus // *Physiologia Plantarum*. – 2003. – V. 117. – P. 51-57.

139. Carol R.J. The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs / R.J. Carol, L. Dolan // *J. Exp. Bot.* – 2006. – V. 57. – P. 1829-1834.
140. Chaffei C. Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safe-guard through an amino acid storage strategy / C. Chaffei [et al.] // *Plant Cell Physiol.* – 2004. – V. 45. – P. 1681-1693.
141. Chalker-Scott L. Do anthocyanins function as osmoregulators in leaf tissues? // *Adv. Bot. Res.* – 2002. – V. 37. – P. 103-127.
142. Cheynier V. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology / V. Cheynier, G. Comte, Kevin M. Davies, V. Lattanzio, S. Martens // *Plant Physiol. Biochem.* – 2013. – V. 72. – P. 1–20.
143. Cle C. Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance / C. Cle, L.M. Hill, R. Niggeweg, C.R. Martin, Y. Guisez, E. Prinsen, M.A. Jansen // *Phytochem.* – 2008. – V. 69. – P. 2149-2156.
144. Cronk Q.C.B. *Plant Adaptation: Molecular Genetics and Ecology: Proceedings of an International Workshop sponsored by the UBC Botanical Garden and Centre for Plant Research held December 11–13, 2002 in Vancouver, British Columbia, Canada* / Q.C.B. Cronk, J. Whitton, R.H. Ree, I.E.P. Taylor. – NRC Research Press, Ottawa, Ontario, Canada, 2004. – 166 pp.
145. Cobbett, C.S. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification // *Plant Physiol.* – 2000. – V. 123. – P. 825-832.
146. Drazkiewicz M., Skorzynska-Polit E., Krupa Z. Response of the ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L.) // *Plant Sci.* – 2003. – V. 164. – P. 195-202.
147. Edreva A. Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms / A. Edreva, V. Velikova, T. Tsonev, S. Dagnon, A. Grel, L. Akta, E. Gesheva, // *Gen. Appl. Plant Physiol.* – 2008. – V. 34. – P. 67–78.

148. Egley G.H. Peroxidase involvement in lignification in water-impermeable seed coats of weedy leguminous and malvaceous species / G.H. Egley // *Plant Cell Environ.* – 1985. – V. 8. – P. 253-260.
149. Elguera J.C.T. Effect of cadmium (Cd(II)), selenium (Se(IV)) and their mixtures on phenolic compounds and antioxidant capacity in *Lepidium sativum* / J.C.T. Elguera, E.Y. Barrientos, K. Wrobel, K. Wrobel // *Acta Physiol. Plant.* – 2013. – V. 35. – P. 431-441.
150. Ernst W.H.O. Metal tolerance in plants / W.H.O. Ernst, J.A.C. Verkleij, H. Schat // *Acta Bot. Neerl.* – 1992. – V. 41. – P. 229-248.
151. Filipe P. Repair of amino acid radicals of apolipoprotein B100 of low-density lipoproteins by flavonoids. A pulse radiolysis study with quercetin and rutin / P. Filipe, L. K. Patterson, D. M. Bartels [et al.] // *Biochemistry.* – 2002. – V. 41. – P. 11057-11064.
152. Damasceno N. Antioxidant activity of soy isoflavones compared to phenolic acids / N. Damasceno // *Res. Simp. «100 anos ensino farmaceut. Estado Sao Paulo», Rev. farm. bioquim. Univ. Sao Paulo.* – 1998. – V. 34. – № 2. – P. 49.
153. Dat J. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses / J. Dat, S. Vandenberghe, E. Vranova, Van Montagu M., D. Inze, Van Breusegem F. // *Cellular and Molecular Life Sciences.* – 2000. – V. 57. – P. 779-795.
154. Debroas D. Study of enzyme activities and physicochemical parameters during hydrolysis of soy peptides by *Prevotella ruminicola* / D. Debroas, N. Depardon, G. Blanchart // *J. Sc. Food Agr.* – 1998. – V. 78. – № 4. – P. 453-460.
155. Devis B.J. Disc electrophoresis. II. Method and Application to Human Serum Proteinase / B.J. Devis // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1964. – V. 121. – № 1. – P. 404-427.
156. Diyendu T. Allozyme variations in leaf esterase and root peroxidase isozymes and linkage with dwarfing genes in induced dwarf mutants of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) / T. Diyendu // *International Journal of Genetics and Molecular Biology.* – 2010. – V. 2. – № 6. – P. 112-120.

157. Dunleavy J.M. Effects of air temperature on disease severity and peroxidase activity of soybean leaves infected by *Peronospora manshurica* / J.M. Dunleavy // *Crop Sci.* – 1982. – V. 22. – P. 623-625.
158. Fang W.-C. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc / W.-C. Fang, C.H. Kao // *Plant Science.* – 2000. – V. 158. – P. 71-76.
159. Fante C.A. Isoflavone and protein content in soybeans grains submitted to flooding at different stages of development / C.A. Fante // *Ciencia Rural.* – 2011 – V.41, N.12, P. 2224-2229.
160. Filkowski J. Genome stability of *vtc1*, *tt4*, and *tt5* *Arabidopsis thaliana* mutants impaired in protection against oxidative stress / J.Filkowski, O.Kovalchuk, I. Kovalchuk // *Plant J.* – 2004. – V. 38. – P. 60-69.
161. Foyer C.H. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context / C.H. Foyer, G. Noctor // *Plant, Cell and Environment.* – 2005. – V. 28. – P. 1056-1071.
162. Fujisawa S., Kadoma Y. Comparative study of the alkyl and peroxy radical scavenging activities of polyphenols // *Chemosphere.* – 2006. – V. 62. – P. 71-79.
163. Ghasemzadeh A., Ghasemzadeh N. Flavonoids and phenolic acids: role and biochemical activity in plants and human // *J. Med. Plants Res.* – 2011. – V. 5. – P. 6697–6703.
164. Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // *Plant Physiol. Biochem.* – 2010. – V.48. – P. 909–930.
165. Gould K.S., Lister C. Flavonoid functions in plants // *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications* / Eds. Q.M. Andersen, K.R. Markham. – USA, 2006. – P. 397-442.
166. Grynkevich G. Chromatographic quantification of isoflavones (why and how) / G. Grynkevich, H. Ksycinska, J. Ramza, J. Zagrodzka // *Acta chromatographica.* – 2005. – V. 15. – P. 31-65.

167. Hasanah Y. Role of Elicitors Foliar Application in Increasing Isoflavone Content of Two Soybean Cultivars / Y. Hasanah, L. A.M. Siregar and L. Mawarni // *Journal of Agronomy*. – 2018. – P. 106-111.
168. Hazubska-Przybyl T. Growth regulators and guaiacol peroxidase activity during the induction phase of somatic embryogenesis in *Picea* species / T. Hazubska-Przybyl // *Dendrobiology*. – 2013 – V. 69, P. 77-86.
169. Ivanova S.Z. Phenolic compounds of Siberian and Dahurian larch phloem / S.Z. Ivanova, T.E. Fedorova, S.V. Fedorov, V.A. Babkin // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 2012. – V. 38, I. 7, –P 769-774.
170. Khan T.H. Antioxidant and Hepatoprotective Potential of Soy Isoflavones Against CCl_4 Induced Oxidative Stress and Early Tumor Events / T.H. Khan, S. Sultana // *Indo-Global Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2011. – V.1. – I.1 – P. 39-56.
171. Khodakov I.V. The HPLC method of identification of polyphenols in plant extracts by example of determination of isoflavone composition in soy seeds. // *Methods and objects of chemical analysis*. V. 8.–№3.–2013.–c. 132-142
172. Kliebenstein D.J. Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization / D.J. Kliebenstein, R.-A. Monde, R. L. Last // *Plant Physiology*. – 1998. – V. 118. – P. 637-650.
173. Kondo N. Enhancement of the tolerance to oxidative stress in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by UV-B irradiation: possible involvement of phenolic compounds and antioxidative Enzymes / N. Kondo, M. Kawashima // *J. Plant Res.* – 2000. – V. 113. – P. 311-317.
174. Kostyuk V.A. Influence of metal ions on flavonoid protection against asbestos-induced cell injury / V.A. Kostyuk, A.I. Potapovich, E.N. Vladykovskaya, M. Hiramatsu // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2001. – V. 385. – P. 129-137.
175. Krantev A. Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants / A. Krantev, R. Yordanova, T. Janda [et al.] // *J. Plant Physiol.* – 2008. – V. 165. – P. 920-931.

- 176.Krezhova D. Recent trends for enhancing the diversity and quality of soybean products / D. Krezhova. – Intechweb Org. – 2011. – 536 p.
- 177.Lam E. Controlled cell death, plant survival and development / E. Lam // Plant Cell Biology. – 2004. – V. 5. – P. 305-315.
- 178.Larskaya I. A. Plant Oligosaccharides – Outsiders among Elicitors? / I.A. Larskaya, T.A. Gorshkova // Published in Russian in Biokhimiya, 2015, V. 80, N 7, P. 1049-1071.
- 179.Lee M.W. Plant elicitor peptides promote plant defences against nematodes in soybean / M.W. Lee // Molecular plant pathology. – 2018. – V. 19(4), – P. 858-869.
- 180.Lavrent`yeva S. Ribonuclease Activity of Glycine max and Glycine soja Sprouts as a Marker Adaptation to Copper Sulphate and Zinc Sulphate / S. Lavrent`yeva, L. Ivachenko, M.A. Nawaz, K. Golokhvast // Biochemical Systematics and Ecology, 2019. Vol. 83. 66–70.
- 181.LeipnerJ. Effect of growing season on the photosynthetic apparatus and leaf antioxidative defenses in two maize genotypes of different chilling tolerance / J. Leipner, Y. Fracheboud, P. Stamp // Environmen and Experimen. Botany. – 1999. – V. 42. – P. 129-139.
- 182.Liszkay A. Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth / A. Liszkay, B. Kenk, P. Schopfer //Planta. – 2003. – V. 217. – P. 658-667.
- 183.Llamas A. Cd²⁺ effect on trans-membrane electrical potential difference, respiration and membrane permeability of rice (*Oryza sativa L.*) roots / A. Llamas, C.I. Ullrich, A. Sanz // Plant Soil. – 2000. – V. 219. – P. 21-28.
- 184.Lovdal T., Olsen K.M., Slimestad R., Verheul M., Lil-lo C. Synergetic effects of nitrogen depletion, tem-perature, and light on the content of phenolic com-pounds and gene expression in leaves of tomato // Phytochemistry. – 2010. – V. 71. – P. 605-613.
- 185.Lowry O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry,N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R. J.Randall // J.Biol.Chem. – 1951. – V. 193. – № 1. – P. 265-275.

186. Mackerness S. A-H. Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct role for different reactive oxygen species and nitric oxide / S.A-H. Mackerness, C.F. John, B. Jordan, B. Early Thomas // FEES Lett. – 2001. – V. 489. – P. 237-242.
187. Malesev D., Kuntic V. Investigation of metal–flavonoid chelates and determination of flavonoids via metal – flavonoid complexing reactions / D. Malesev, V. Kuntic // J. Serb. Chem. Soc. – 2007. – V. 72. – P. 921-939.
188. Mallik S. Response of antioxidant enzymes to high NaCl concentration in different salt-tolerant plants / S. Mallik, M. Nayak, B.B. Sahu, A.K. Panigrahi, B.P. Shaw // Biologia plantarum. – 2011. – V. 55. – № 1. – P. 191-195.
189. Manquian-Cerda K. Effect of cadmium on phenolic compounds, antioxidant enzyme activity and oxidative stress in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plantlets grown in vitro / K. Manquian-Cerda // Ecotoxicol. Environ. Safety. – 2016. – V. 133. – P. 316-326.
190. Mao F. The metal distribution and the change of physiological and biochemical process in soybean and mung bean plants under heavy metal stress / F. Mao, G. Nan, M. Cao, Y. Gao, L. Guo, X. Meng, G. Yang // International Journal of Phytoremediation. – 2018 – V.6. 20(11). – P. 1113-1120.
191. Meloni D.A. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress / D.A. Meloni // Environmen. and Experimen. Botany. – 2003. – V. 49. – P. 69-76.
192. Meychik N.R., Yermakov I.P. Ion exchange properties of plant root cell walls // Plant Soil. – 2001. – V. 234. – P. 181-193.
193. Michalak A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress // Polish J. Environ. Studies. – 2006. – V. 15. – P. 523-530.
194. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance / R. Mittler // Trends in Plant Science. – 2002. – V. 7 (9). – P. 405-410.
195. Mittova V. Co-ordinate induction of glutathione biosynthesis and glutathione-metabolising enzymes is correlated with salt tolerance in tomato / V. Mittova F.L.

Theodoulou, G. Kiddle, L. Gomez, M. Volokita, M. Tal, C.H. Foyer, M. Guy // FEES Letters. – 2003. – V. 554. – P. 417-421.

196. Molina A. Involvement of endogenous salicylic acid content, lipoxygenase and antioxidant enzyme activities in the response of tomato cell suspension cultures to NaCl / A. Molina, P. Bueno, M.C. Marlin, M.P. Rodriguez-Rosales, A. Belver, K. Venema, J.P. Danaire // New Phytologist. – 2002. – V. 156. – P. 409-415.

197. Minkov I. Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes / I. Minkov // CMLS, Cell. Mol. Life Sci. – 2002. – V. 59. – P. 708-714.

198. Ng T.B. Soybean biochemistry, chemistry and physiology Printed in India / Tzi Bun Ng – 2011. – P. 642.

199. Olmos E. Modulation of plant morphology, root architecture, and cell structure by low vitamin C in Arabidopsis thaliana / E. Olmos, G. Kiddle, Tk. Pellny, S. Kumar, Ch. Foyer // J. Exp. Bot. – 2006. – V. 57. – P. 1645-1655.

200. Orozco-Cardenas M. L. Hydrogen peroxide acts as second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate / M.L. Orozco-Cardenas, J. Narvaez-Vignar, C.A. Ryan // Plant Cell. – 2001. – V. 13. – P. 179-191.

201. Pan J. Cadmium levels in Europe: implications for human health / J. Pan, J.A. Plant, N. Voulvoulis [et al.] // Environ. Geochem. Health. – 2010. – V. 32. – P. 1-12.

202. Pazos M. Efficiency of natural phenolic compounds re-generating alpha-tocopherol from alpha-tocopheroxyl radical / M. Pazos M. L. Andersen, I. E. Medina, L. H. Skibsted // J. Agric. Food Chem. – 2007. – V. 55 – P. 3661-3666.

203. Perfus-Barbeoch L., Leonhardt N., Vavasseur A., Forestier C. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status // Plant J. – 2002. – V. 32. – P. 539-548.

204. Pitzschke A. Mitogen-activated protein kinase and reactive oxygen species signaling in plants / A. Pitzschke, H. Hirt // Plant Physiology. – 2006. – V. 141. – P. 351-356.

205. Pomponi M. Overexpression of Arabidopsis phytochelatin synthase in tobacco plants enhances Cd²⁺ tolerance and accumulation but not translocation to the shoot / M. Pomponi, V. Censi, V. Di Girolamo, A. De Paolis, L.S. Di Toppi, R. Aromolo, M. Cardarelli // *Planta*. – 2006. – V. 223. – P. 180-190.
206. Pourcel L. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions / J.M. Routaboul, V. Cheynier, L. Lepiniec, I. Debeaujon // *Trends Plant. Sci.* – 2007. – V. 12. – P. 29-36.
207. Pulido R. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing antioxidant power assay / R. Pulido, L. Bravo, F. Saura-Calixto // *J. Agric. Food Chem.* – 2000. – V. 48. – P. 3396-3402.
208. Ranieri A. Redox state and peroxidase system in sunflower plants exposed to ozone / A. Ranieri, F. Petacco, A. Castagna, G.F. Soldatini // *Plant Science*. – 2000. – V. 159. – P. 159-167.
209. Reyhaneh S. Peroxidase activity in leaves of plane tree as a marker of air pollution in Rasht / S. Reyhaneh, N. Fazel and J. Vahab // *Regional and Global Scales. Istanbul – Turkey*, 2005. – P. 946-953.
210. Rio L.A.D. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling / Luis A. del Rio, Luisa M. Sandalio, Francisco J. Corpas, Jose M. Palma, Juan B. Barroso // *Plant Physiology*. – 2006. – V. 141. – P. 330-335.
211. Rios-Gonzalez K. The activity of antioxidant enzymes in maize and sunflower seedlings as affected by salinity and different nitrogen sources / K. Rios-Gonzalez, L. Erdei, S.H. Lips // *Plant Science*. – 2002. – V. 162. – P. 923-930.
212. Robards K. Cadmium: toxicology and analysis / K. Robards, P. Worsfold // *Analyst*. – 1991. – V. 116. – P. 549-568.
213. Ruciriska-Sobkowiak R. Oxidative stress in plants exposed to heavy metals // *Postepy biochemii. PubMed*. – 2010. – 56(2) – P. 191-200.
214. Shah K. Cadmium metal detoxification and hyperaccumulators // *Detoxification of heavy metals* / Eds. I. Sheramei, A. Varma. – Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. – P. 181-203.

- 215.Sairam R.K. Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress / R.K. Sairam,P.S. Deshmukh, D.C. Saxena // *Biologia Plantarum*. –1998. – V. 41(3). – P. 387-394.
- 216.Sairam R.K. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration / R.K. Sairam, K.V. Rao, G.C. Srivastava // *Plant Science*. – 2002. –V. 163. – P. 1037-1046.
- 217.Shalata A. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: the root antioxidative system / A. Shalata,V. Mittova, M. Volokita, M. Guy and M. Tal // *Physiol. Plantarum*. – 2001. – V. 112. – P. 487-494.
- 218.Sharma R.K. Angrawal M. Biological effects of heavy metals: An overview // *J. Environ. Biol.* – 2005. – V. 26 (3/4). – P. 1-13.
- 219.Shumilina J.S. Drought as a Form of Abiotic Stress and Physiological Markers of Drought Stress / J.S. Shumilina, A.V. Kuznetsova, A.A. Frolov, T.V. Grishina // *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, V. 14, N. 4, 2018, P. 05-15.
- 220.Singh B.K, Foley R.C, Onate-Sanchez L. Transcription factors in plant defense and stress responses // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2002. – V. 5. – P. 430-436.
- 221.Singh G. *The Soybean: Botany, Production and Uses*, USA, 2010. – P. 494.
- 222.Singh S., Kumar M. Heavy metal load of soil, water and vegetables in peri-urban Delhi // *Environ. Mon. As-sess.* – 2006. – V. 120. – P. 79-91.
- 223.Souza J.F., Rauser W.E. Maize and radish sequester excess cadmium and zinc in different ways // *Plant Sci.* – 2003. – V. 165. – P. 1009-1022.
- 224.Takahama U. Flavonoids and some other phenolics as substrates of peroxidase: physiological significance of the redox reactions / U. Takahama, T. Oniki // *J. Plant Res.* – 2000. – V. 113. – P. 301-309.
- 225.Tony J. Vyn Potassium Fertilization Effects on Isoflavone Concentrations in Soybean [*Glycine max (L.) Merr.*] /J. Tony // *Journal Agric. and Food Chem.* 2002. – V.50. –P. 3501-3506.

226. Tubek S. The content of elements in rainwater and its relation to the frequency of hospitalization for arterial hypertension, chronic obstructive pulmonary disease and psoriasis in Opole Voivodship Poland during 2000–2002 // *J. Biol. Trace Elem. Res.* – 2008. – V. 123. – P. 270-276.
227. Uchiyama M., Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test // *Anal. Biochem.* – 1978. – V. 86. – P. 287-297.
228. Vacca R.A. Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright-Yellow 2 cells / R.A. Vacca M.C. de Pinto, D. Valenti, S. Passarella, E. Marra, L. De Gara // *Plant Physiol.* – 2004. – V. 134 (3). – P. 1100-1112.
229. Verbruggen N. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants / N. Verbruggen, C. Hermans, H. Schat // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2009. – V. 12. – P. 364-372.
230. Wang B. Synthesis, characterization, cytotoxic activity and DNA binding Ni (II) complex with the 6-hydroxy chromone-3-carbaldehyde thiosemicarbazone / B. Wang Z.Y. Yang, P. Crewdson, D.Q. Wang // *J. Organometallic Chem.* – 2009. – V. 694. – P. 4069-4075.
231. Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2002. – V. 5. – P. 218-223.
232. Wojcik M., Tukiendorf A. Cadmium uptake, localization and detoxification in *Zea mays* // *Biol. Plant.* – 2005. – V. 49. – P. 237-245.
233. Xie M. A reference-grade wild soybean genome / M. Xie, C.Y.L. Chung, M.W. Li, F.L. Wong [et all.] // *Nature Communications*, 2019. – V. 10, –I. 1. –P. 1216.
234. Yoshimura K. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses / K. Yoshimura, Y. Yabuta, T. Ishikawa, S. Shigeoka // *Plant Physiol.* – 2000. – V. 123. – P. 223-233.
235. Yoshimura K. Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plant overexpressing *Chlamydomonas* glutathione peroxidase in chloroplasts or cytosol /

- K. Yoshimura K. Miyao, A. Gaber, T. Takeda, H. Kanaboshi, H. Miyasaka, and S. Shigeoka//The Plant Journal. – 2004. –V. 37. – P. 21-33.
- 236.Zeno E.B. The effects of temperature on longevity and vitality of soybean seeds / E.B. Zeno // Soybean Genet. Newsletter. – 1982. – V. 9. – P. 109-111.
- 237.Zhang B. Influence of the Application of Three Different Elicitors on Soybean Plants on the Concentrations of Several Isoflavones in Soybean Seeds / B. Zhang,N. Hettiarachchy, P. Chen, R. Horax, B. Cornelious, D. Zhu // Agricultural and Food Chemistry. – 2006 – V. 54 (15), P. 5548-5554.
- 238.Zhang F. Mineral nitrogen availability and isoflavonoid accumulation in the root systems of soybean (*Glicine max (L.) Merr.*) / F. Zhang, F. Mace, D.L. Smith // J. Agron. and Crop Sci. – 2000. – 184. - № 3. – P. 193–204.
- 239.Zhang X. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in Viciafaba / X. Zhang, L. Hang, F.C. Dong, J.F. Gao, D.W. Galbraith, C.P.Song // Plant Physiol. –2001. – V. 126. – P. 1438-1448.
- 240.Zhu J.K. Salt and drought stress signal transduction in plants / J.K. Zhu // Ann. Rev. Plant Biol. – 2002. – V. 53. – P. 247-273.

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АГ – арабиногалактан

АОС – антиоксидантная система

АФК – активные формы кислорода

БТШ – белки теплового шока

ДГК – дигидрокверцетин

МДА – малоновый диальдегид

ММФФ – молекулярные множественные формы ферментов

МФ – множественные формы

П – пероксидаза

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ТМ – тяжелые металлы

ТХУ – трихлоруксусная кислота

Rf – электрофоретическая подвижность