

На правах рукописи



КУЗНЕЦОВА Виктория Александровна

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

03.02.08 – Экология

(биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Петропавловск-Камчатский – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Благовещенский государственный педагогический университет» (ФГБОУ ВО «БГПУ»)

Научный руководитель:

Голохваст Кирилл Сергеевич

доктор биологических наук, профессор РАН, член-корреспондент РАО, ФИЦ «Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова», заместитель директора по научно-организационной работе

Официальные оппоненты:

Ковкевдова Лидия Тихоновна

доктор биологических наук, Тихоокеанский филиал ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» (ТИНРО), аналитический научно-испытательный центр, ведущий научный сотрудник

Емельянов Алексей Николаевич

кандидат сельскохозяйственных наук, ФГБНУ «ФНИЦ Агробиотехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки», директор

Ведущая организация:

ФГБНУ Хабаровский ФИЦ ДВО РАН, Дальневосточный научно-исследовательский институт сельского хозяйства, г. Хабаровск

Защита состоится «22» сентября 2020 г. в 14.00 на заседании диссертационного совета Д 307.008.01 в ФГБОУ ВО «Камчатский государственный технический университет» по адресу: г. Петропавловск-Камчатский, ул. Виллойская, д. 56.

Отзывы на автореферат просим направлять по адресу: 683003, г. Петропавловск-Камчатский, ул. Ключевская, д. 35 (КамчатГТУ). Диссертационный совет Д 307.008.01. Тел./факс: 8(4152)42-05-01, e-mail: oni@kamchatgtu.ru.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО «КамчатГТУ» (<https://www.kamchatgtu.ru>).

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук Ключкова Татьяна Андреевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Соя (*Glycine max* (L.) Merrill) – ценнейшая белково-масличная культура. Получение высоких и стабильных урожаев сои ограничивается действием различных экологических факторов. Основным регионом ее возделывания в России является Амурская область, охватывающая северную часть ареала дикой сои. Результаты секвенирования генома сои (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 и др., 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 исследования. 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 является 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 способствует 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 работы – определить роль пероксидаз и изофлавонов в формировании адаптивных реакций сои и разработать способы снижения у нее окислительного стресса, вызванного высокими перепадами температур и воздействием тяжелых металлов. Для достижения поставленной цели было 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 ее 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.

Теоретическое и практическое 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.

Методология и методы диссертационного исследования, степень достоверности результатов. 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.

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 множественной формы пероксидаз П16 свидетельствует о загрязнении почв медью и/или цинком, формы П12 – медью, формы П4 – кадмием, П5 – свинцом. Форма пероксидаз П14 образуется при влиянии окислительного стресса, вызванного действием тяжелых металлов.

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 чем имеются ссылки на совместные публикации. Работа написана автором лично.

Апробация работы. **Апробация работы.** Материалы диссертации докладывались на 20 региональных, всероссийских и международных конференциях, в том числе на: XXIII Межд. зимней молодежной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2011); V Межд. симпозиуме «Химия и химическое образование» (Владивосток, 2011); III и IV Межд. 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 Межд. научно-практической конференции «Химия и химическое образование» (Благовещенск, 2015); IX Межд. симпозиуме «Фенольные соединения:

фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2015); Всероссийской научно-практической конференции «Экологические проблемы регионов» (Иркутск, 2017); на VI Всероссийской конференции с межд. участием «ЭкоБиотех-2019» (Уфа, 2019). Автор имеет дипломы победителя межд. 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 диссертационной работы. Диссертационная работа изложена на 133 страницах компьютерного текста, состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, библиографического списка, который включает 240 источников, в том числе 116 – иностранных. Работа иллюстрирована 34 рисунками, содержит 12 таблиц.

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, проф. РАН, д.б.н. 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».

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Приводится анализ литературных данных о влиянии на растения стрессоров и образовании под их влиянием активных форм кислорода. Дан обзор работ, касающихся антиоксидантной системы растений, в том числе фермента пероксидазы, и низкомолекулярных соединений изофлавонов. Обсуждается их роль в защите растений от температурного стресса и воздействия тяжелых металлов (ТМ). Показано, что при достаточном количестве данных по этому вопросу информация о роли пероксидазы и изофлавонов в формировании устойчивости сои к окислительному стрессу крайне ограничена.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования служила культурная (*Glycine max* (L.) Merrill) соя сорта Соната и дикая (*Glycine soja* Siebold et Zucc.) соя, форма КА-1344. Для анализа пероксидазной активности из их семян и растений получали растворимые белки. Для экстракции белков использовали ацетатный буфер с pH 4,7. Полученный экстракт центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость использовали для определения удельной активности пероксидаз колориметрическим методом на КФК-2 по методу Бояркина в модификации Мокроносова (1994). В качестве субстрата использовали бензидин солянокислый (Cas [92-87-5], содержание основного вещества не менее 99,5%). Анализ проводили в двух биологических и трех аналитических повторностях (всего 6 повторностей). Содержание белка определяли методом Лоури. Измерения проводили на фотоэлектроколориметре (КФК-3). Концентрацию (мкг/мл) растворимых белков рассчитывали по калибровочному графику с учетом разведения в экстракте. Для изучения множественных форм пероксидаз использовали метод электрофореза в полиакриламидном геле. Электрофоретическая подвижность множественных форм (МФ) пероксидаз обозначалась как Rf. Их выявление 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% раствор пероксида водорода, после проявления на гелевой трубке форм пероксидаз в виде синих полос, переходящих вскоре в бурые, рассчитывали Rf (Садвакасова, 1987).

Содержание изофлавонов сои определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в комбинации со спектроскопией в УФ-области спектра на хроматографе «Милихром А-02» в собственной модификации. Для элюирования использовали колонку с сорбентом ProntoSil C18, размером частиц 5 мкм (G. Grynkevich, 2005; Khodakov, 2013). Анализ проводили при длине волны 290 нм, градиентным способом. Обработку полученных хроматограмм осуществляли 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%).

Содержание ТМ (медь, цинк, кадмий, свинец) в почве и растениях анализировали на атомно-абсорбционном спектрофотометре AA-6800 «Shimadzu» (Япония). Для минерализации растительных тканей использовали смесь концентрированных азотной и хлорной кислот в соотношении 1:3.

Об уровне перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по накоплению продукта ПОЛ – малонового диальдегида (МДА). Его содержание определяли, используя тиобарбитуриевую кислоту (Сибгатуллина, 2011). Растительные ткани при этом гомогенизировали в растворе трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Затем гомогенат центрифугировали при 12 тыс. об./мин в течение 10 мин при -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°C, в течение 30 мин и сразу охлаждали во льду, затем вновь центрифугировали при тех же условиях (12 тыс. об./мин, 10 мин). Оптическую плотность супернатанта измеряли при 532 и 600 нм. Содержание МДА в нем рассчитывали с использованием коэффициента экстинкции, равным 155 мМ⁻¹см⁻¹.

Статистическую обработку материала проводили по Плохинскому (1971). Для статистической обработки данных использовали программу MS Excel. Ниже на графиках представлены средние арифметические значения и их относительные отклонения.

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

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

Анализ физико-химических свойств пероксидаз показал, что активность семян дикой и культурной сои достигает максимума при 0,3% концентрации субстрата. Оптимум рН для дикой сои составил 5,5, для культурной сои – 4,7. При низком содержании субстрата в системе наблюдается отчетливая зависимость между его концентрацией и скоростью реакции с участием пероксидаз. При больших концентрациях подобное влияние отсутствует.

3.2. Характеристика устойчивости семян культурной и дикой сои к воздействию температур в течение 5 часов с участием пероксидаз

Для Амурской области колебания температур является одним из ключевых факторов, влияющих на растения, т.к. климат области является резко континентальным. Летом часто наблюдаются низкие (до +4°C) и высокие (до +45°C) температуры. Такое резкое колебание температур вызывает окислительный стресс и оказывает повреждающее действие на растения. Нами исследовано влияние разных температур на пероксидазную активность и уровень МДА в семенах культурной и дикой сои в течение 5 часов (табл. 1, рис. 1).

Таблица 1. Уровень МДА в семенах дикой и культурной сои в различных температурных условиях, мкмоль/г сухого веса

Вид	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

При температурах +4 и +45°C в семенах дикой и культурной сои повышается содержание МДА в отличие от его содержания при воздействии

температуры +23°C, оптимальной для протекания ферментных реакций. Для дикой сои содержание МДА при +23°C составляет 2,12, для культурной – 1,8 мкмоль/г сухого веса. Для дикой – при +4°C количество МДА повышается до 4,86, при +45°C – до 5,96, для культурной – при +4°C возрастает до 3,4, при +45°C – до 4,12 мкмоль/г сухого веса, что характеризует наличие окислительного стресса в семенах сои, вызванным воздействием низких положительных и высоких температур (табл. 1).

Установлено, что пероксидаза высокоактивна в семенах дикой сои и наибольшую активность достигает при +10°C (рис. 1А). При 23°C для дикой и культурной сои обнаружены по 2 формы со средней Rf и по одной с низкой Rf.

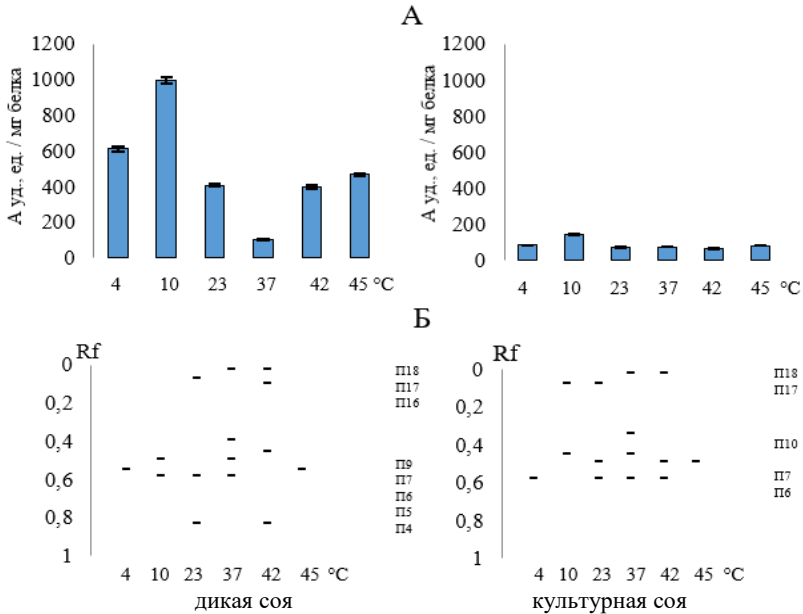


Рис. 1. Активность пероксидаз семян сои при действии температур. А – удельная активность (А уд.), Б – схемы энзимогамм пероксидаз. Справа на энзимогаммах здесь и далее указана нумерация выявленных форм фермента, согласно их Rf (Иваченко, 2012).

В условиях холодового (+4°C) и теплового (+45°C) стрессов в семенах сои выявлена только одна форма пероксидаз со средней Rf (П6) (рис. 1Б). Проращивание семян сои при +37 и +42°C приводит к возникновению новых форм пероксидаз. Установлены механизмы формирования устойчивости семян к окислительному стрессу, вызванному высокими и низкими положительными температурами в течение 5 ч с участием пероксидаз.

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

Определена совместная роль дигидрокверетина (ДГК), изофлавонов и пероксидаз в формировании устойчивости проростков сои к воздействию низкой +4°C и высокой +45°C температур в течение 5 ч 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 мкмоль/г сухого веса, а при влиянии +45°C повышается в 2,35 раз по сравнению с контрольными образцами, что характеризует наличие процессов окислительного стресса в проростках сои при влиянии температур (табл. 2). Добавление ДГК в среду для проращивания при этих температурах снижает уровень МДА, способствуя повышению устойчивости проростков сои к воздействию температурного стресса, что связано с антиоксидантным действием ДГК.

Таблица 2. Уровень МДА, мкмоль/г сухого веса в проростках культурной сои при влиянии температур +4 °С и +45 °С в течение 5 ч и дальнейшем проращивании при 23 °С в течение 5 суток (без добавления и с добавлением ДГК)

Температура, °С (+внесение ДГК)	23 (контроль)	4 + ДГК 3×10^{-5} М	4	45 + ДГК 3×10^{-5} М	45
Уровень МДА, мкмоль/г сух.веса	2,11±0,12	4,12±0,33	3,42±0,31	4,96±0,28	2,80±0,14

Проращивание семян сои при температуре +4°C в течение 5 ч стимулирует ростовые процессы сои по сравнению с проращиванием при +23°C, а проращивание семян в течение 5 ч при температуре +45°C затормаживает ростовую активность проростков (рис. 2). Добавление ДГК в среду для проращивания семян сои в концентрации 3×10^{-6} М улучшает показатели ростовых процессов.

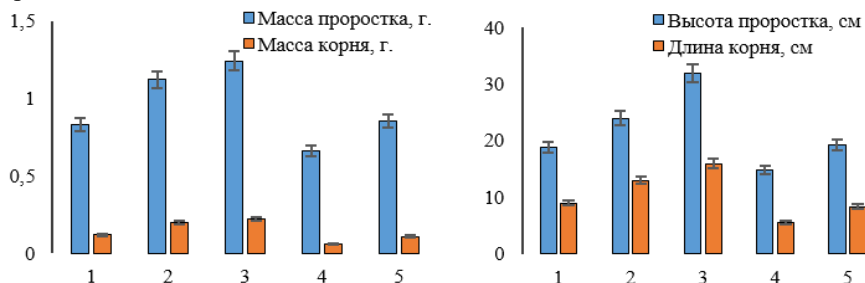


Рис. 2. Биометрические показатели проростков сои при влиянии температур +4°C и +45°C в течение 5 ч и дальнейшем проращивании при 23°C в течение 5 суток (без добавления и с добавлением ДГК). (1 – контроль, 2 – +4°C, 3 – +4°C + ДГК (3×10^{-6} М), 4 – +45°C, 5 – +45°C + ДГК (3×10^{-6} М))

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.

Проращивание семян сои при +4°C в течение 5 ч повышает удельную активность пероксидаз на 17% по сравнению с контрольным образцом, выращенным при +23°C. Добавление ДГК в эту среду увеличивает активность пероксидаз на 28%. Проращивание семян сои при +45°C в течение 5 ч снижает удельную активность пероксидаз на 30% по сравнению с контрольным образцом, а добавление ДГК в данные условия проращивания повышает активность практически до уровня контроля (рис. 3). Таким образом, добавление ДГК в среду для проращивания приводит к повышению пероксидазной активности.

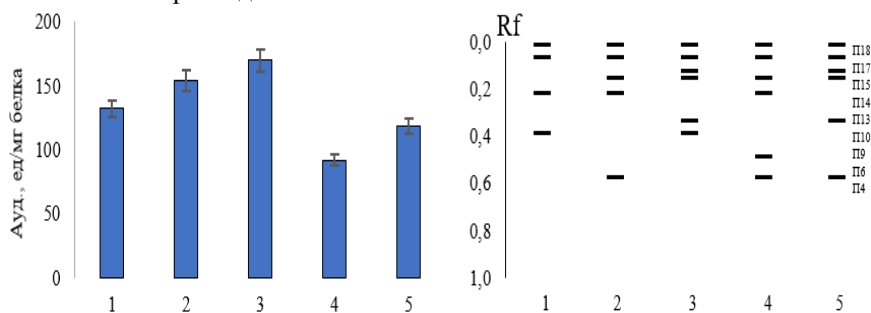


Рис. 3. Удельная активность и схемы энзимогрaмм пероксидаз проростков сои при влиянии +4 °C и +45 °C в течение 5 ч и дальнейшем проращивании при +23 °C в течение 5 суток (без добавления и с добавлением ДГК) (1 – контроль, 2 – +4 °C, 3 – +4°C + ДГК (3×10^{-6} M), 4 – +45 °C, 5 – +45°C + ДГК (3×10^{-6} M))

При анализе энзимогрaмм установлено, что во всех исследуемых образцах сои через 5 суток проращивания присутствует МФ П17 и П18 (рис. 3). В контрольном образце обнаружено 4 формы П9, П13, П17 и П18. При добавлении ДГК в среду для проращивания не обнаружены формы П6 и П13. При этом появляются формы П10 и П15, функционирующие в данных условиях, что способствует лучшей адаптации к окислительному стрессу. Это подтверждается снижением уровня МДА и приводит к улучшению биометрических показателей проростков сои до уровня контроля. Самыми адаптивными МФ к условиям среды являются П17 и П18. В 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.

Анализ содержания изофлавонов в проростках сои, выращенных при +23°C, выявил высокие концентрации глицитина и генистина и низкую –

даидзина (рис. 4). Проращивание семян сои при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 5 ч вызывает снижение количества даидзина на 12%, содержание глицитина и генистина при этом повышается, количество глицитеина практически 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.

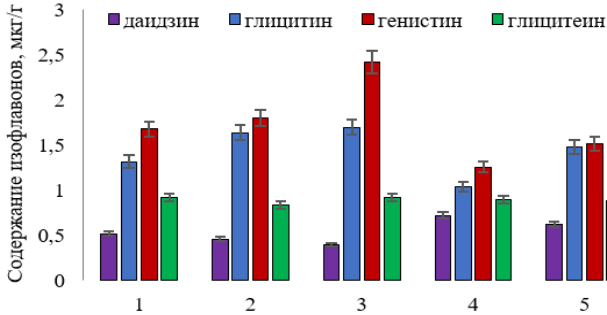


Рис. 4. Уровень изофлавонов в проростках сои, выращенных при влиянии $+4^{\circ}\text{C}$ и $+45^{\circ}\text{C}$ в течение 5 ч и дальнейшем проращивании при $+23^{\circ}\text{C}$ в течение 5 сут. (без добавления и с добавлением ДГК) (1 – контроль, 2 – $+4^{\circ}\text{C}$, 3 – $+4^{\circ}\text{C}$ + ДГК ($3 \times 10^{-6}\text{M}$), 4 – $+45^{\circ}\text{C}$, 5 – $+45^{\circ}\text{C}$ + ДГК ($3 \times 10^{-6}\text{M}$))

Проращивание семян сои при температуре $+45^{\circ}\text{C}$ в течение 5 ч и дальнейшем проращивании при $+23^{\circ}\text{C}$ в течение 5 суток приводит к увеличению содержания даидзина, снижению глицитина и генистина, содержание глицитеина при этом не изменяется, при добавлении ДГК содержание исследуемых изофлавонов становится близким к содержанию изофлавонов в контрольных проростках.

Таким образом, проращивание сои в течение 5 суток при влиянии температур $+4^{\circ}\text{C}$ и $+45^{\circ}\text{C}$ в течение 5 ч и дальнейшем проращивании при $+23^{\circ}\text{C}$ в течение 5 суток приводит к проявлению окислительного стресса в проростках, при этом уменьшается уровень МДА, изменяется активность пероксидаз, содержание изофлавонов и биометрические показатели в зависимости от условий проращивания. Внесение ДГК оказывает защитную функцию проростков сои от температурного стресса, вызванного температурами $+4^{\circ}\text{C}$ и $+45^{\circ}\text{C}$, значительно снижая при этом уровень МДА. Кратковременное влияние положительной низкой температуры $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 5 ч оказывает небольшое влияние на проростки, при этом происходит так называемое «закаливание» проростков. Кратковременное влияние высокой температуры $+45^{\circ}\text{C}$ в течение 5 ч приводит к снижению адаптивного потенциала проростков сои.

Увеличение каталитической активности пероксидазы является, по нашему мнению, одним из сопутствующих факторов, определяющих общие тенденции в эзиматическом 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 пероксидазы 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

Установлено участие пероксидаз в формировании защитного механизма культурной и дикой сои при влиянии солей ТМ на разных стадиях онтогенеза. Для влияния солей ТМ на сою был смоделирован экологический стресс для растения в агроценозах, исходя из содержания ТМ в почвах Амурской области. Для этого в почву вносили ТМ в двух концентрациях: в 2 раза превышающих ОДК (ориентировочно допустимую концентрацию) металлов в почвах с учетом фона (кларка) согласно ГН 2.1.7.2511-09 (валовое содержание) и в 10 раз превышающих содержание ТМ в почве Благовещенского района на опытном участке АО «Аметис», которое предварительно определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии.

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

Дигидрохверцетин относится к антиоксидантам. 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 $3 \times 10^{-3} \text{M}$ и $3 \times 10^{-4} \text{M}$ растворе ДГК, а $3 \times 10^{-2} \text{M}$ раствор ДГК оказывает наименьшее влияние на активность пероксидаз.

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

Выявлено, что удельная активность фермента в контрольных образцах на изученных фазах вегетации невысокая (рис. 5).

В образцах культурной сои после внесения ТМ выявлено 8 новых форм пероксидаз по сравнению с контролем, а дикой – 11, что свидетельствует о повышенном адаптивном потенциале дикой сои (рис. 6).

Внесение в почву солей ТМ приводит к увеличению удельной активности пероксидаз сои и количества их МФ по сравнению с контролем, особенно в фазу цветения (рис. 5, 6).

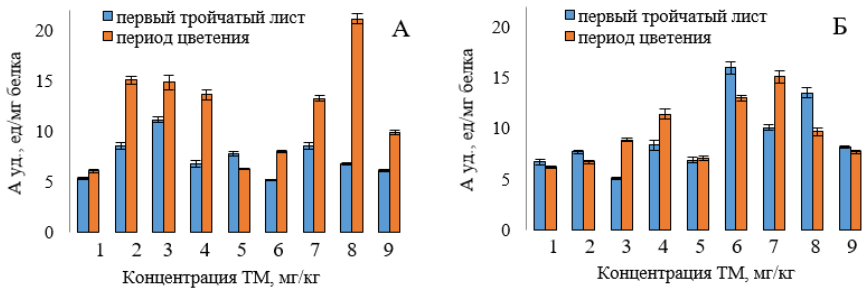


Рис. 5. Влияние солей ТМ на активность пероксидаз культурной (А) и дикой (Б) сои на разных стадиях онтогенеза: 1 – контроль, 2 – $ZnSO_4$ (15 мг/кг), 3 – $ZnSO_4$ (2 ОДК), 4 – $CdSO_4$ (0,2 мг/кг), 5 – $CdSO_4$ (2 ОДК), 6 – $CuSO_4$ (1,6 мг/кг), 7 – $CuSO_4$ (2 ОДК), 8 – $PbSO_4$ (2,75 мг/кг), 9 – $PbSO_4$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

Значительное повышение активности пероксидаз вызвало внесение в исследуемых концентрациях соли цинка – для культурной сои и соли меди – для дикой.

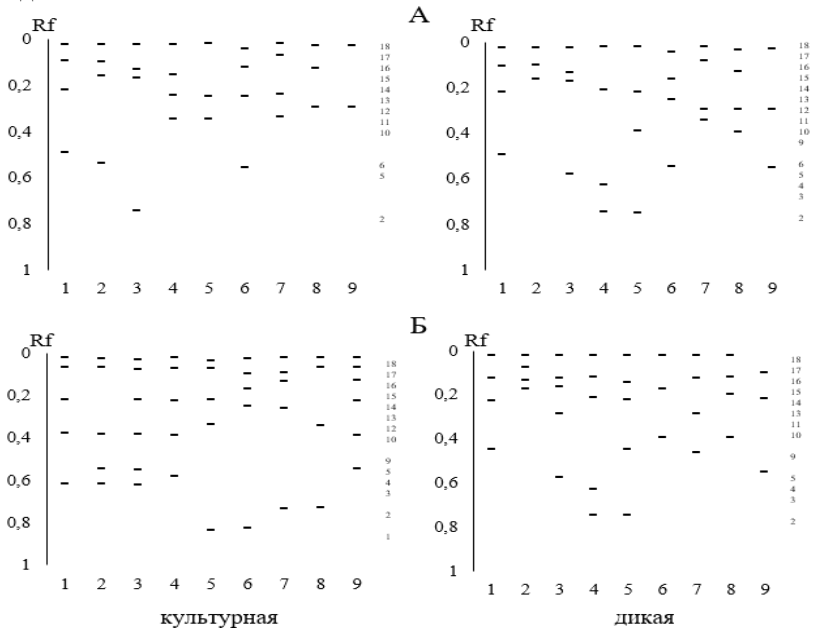


Рис. 6. Схемы энзимограмм пероксидаз культурной и дикой сои, выращенной в почве с внесением солей ТМ различной концентрации. А – стадия первого тройчатого листа, Б – стадия цветения. На оси абсциссы указаны концентрации солей: 1 – контроль (без внесения ТМ), 2 – $ZnSO_4$ (15 мг/кг), 3 – $ZnSO_4$ (2 ОДК), 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)

Из солей ТМ большее влияние на активность пероксидаз семян культурной сои в фазу цветения оказали сульфаты свинца и кадмия в низкой

концентрации. Анализ схем энзимограмм пероксидаз сои позволил установить, что проявление МФ зависят от катиона вносимого металла и его концентрации (рис. 6).

Следует отметить появление в образцах с ТМ новых форм пероксидаз с высокой и средней Rf и других минорных форм, что способствует адаптации сои к окислительному стрессу, вызванному данными солями 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 их проникновение в семена в количествах, соответствующих содержанию солей данных ТМ в используемых для обработки растворах (табл. 3). 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. Добавление ДГК в среду для проращивания снижает уровень МДА, способствуя формированию защитного механизма сои от стрессового воздействия солей ТМ.

Таблица 3. Количество ТМ и ДГК, мкг/г семян сои при проращивании в растворах в течение 5 ч, содержащих их сульфаты

ДГК, 3×10^{-6} М	Концентрация соли, М	Zn ²⁺	Cu ²⁺	Cd ²⁺
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

Показано, что внесение солей цинка и меди вызывает сходную зависимость: высокие концентрации солей данных металлов увеличивают удельную активность пероксидаз, невысокие – незначительно изменяют активность фермента по сравнению с контролем, что свидетельствует о незначительном окислительном стрессе (рис. 7).

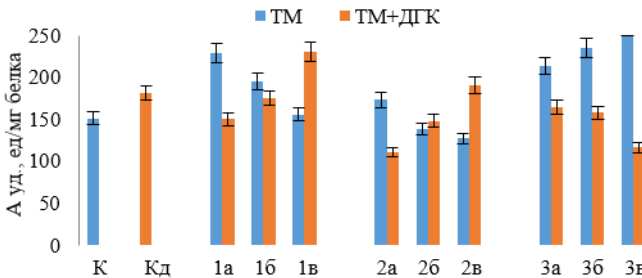


Рис. 7. Удельная активность пероксидаз сои, полученных в условиях проращивания семян с добавлением солей ТМ и ДГК. К – контроль; Кд – контроль с ДГК; 1 – ZnSO₄, 2 – CuSO₄, 3 – CdSO₄. Концентрация солей ТМ: а – 5×10^{-4} М, б – 5×10^{-5} М, в – 5×10^{-6} М. Концентрация ДГК 3×10^{-6} М

Данное заключение подтверждается также уровнем МДА (табл. 4).

Таблица 4. Уровень МДА, мкмоль/г сухого веса в семенах культурной сои при влиянии солей ТМ и ДГК

Ко нтр оль	ДГК*	Концен трация 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	5x10 ⁻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
		5x10 ⁻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
		5x10 ⁻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 3x10⁻⁶М

Показана зависимость между активностью пероксидаз сои и их МФ. Установлено, что повышение активности пероксидаз при стрессовом воздействии солей ТМ связано с появлением новых форм фермента относительно контроля (рис. 7, 8). При проращивании сои в присутствии ТМ относятся формы пероксидаз с высокой Rf, что свидетельствует об участии данных форм в устойчивости семян сои к окислительному стрессу.

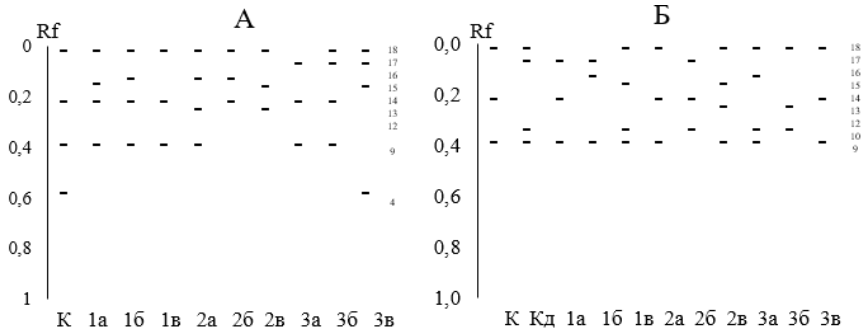


Рис. 8. Схемы энзимогрaмм пероксидаз сои, полученных при проращивании семян с добавлением ТМ (А) и ТМ+ДГК (Б). К – контроль, Кд – контроль с ДГК; 1 – ZnSO₄+ДГК, 2 – CuSO₄+ДГК, 3а – CdSO₄+ДГК. Концентрация солей металлов: а – 5x10⁻⁴М, б – 5x10⁻⁵М, в – 5x10⁻⁶М. Концентрация ДГК 3x10⁻⁶М

Выявлено, что защитный механизм при окислительном стрессе, вызванном действием ТМ, определяется особенностью ТМ и его концентрацией. Внесение ДГК низкой концентрации 3x10⁻⁶М в среду для проращивания, содержащую сульфаты цинка и меди, вызывает увеличение пероксидазной активности, а в среду, содержащую сульфаты кадмия, наоборот – снижение, что связано с высокой токсичностью данного ТМ. При этом появляются новые формы пероксидаз П10 и П17. Совместное антиоксидантное действие пероксидаз сои и ДГК играет огромную 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 сульфата кадмия в течение 5 суток, с участием пероксидаз, изофлавонов и ДГК

Получено, что содержание кадмия и ДГК в проростках сои после их проращивания в течение 5 суток соответствует концентрации данных веществ в используемых растворах (табл. 5).

Таблица 5. Содержание кадмия и ДГК, мкг/г в проростках сои при проращивании в растворах в течение 5 суток

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

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

Таблица 6. Уровень МДА, мкмоль/г сырого веса в проростках сои при влиянии сульфата кадмия и ДГК

Содержание ДГК в растворе, М	Уровень МДА нмоль/г сырого веса			
		Содержание Cd ²⁺ в растворе, М		
		5x10 ⁻⁴	5x10 ⁻⁵	5x10 ⁻⁶
—	1,35±0,14 (контроль)	7,88±0,66	7,24±0,60	6,12±0,44
3x10 ⁻⁵ М	1,12±0,02	3,96±0,24	5,22±0,26	2,12±0,04
3x10 ⁻⁶ М	1,02±0,06	2,86±0,08	4,12±0,18	0,96±0,02

Выявлены высокие концентрации глицитина и генистина и низкая – даидзина (рис. 9).

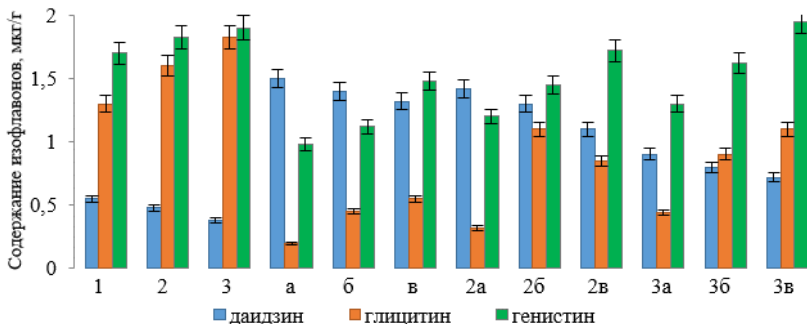


Рис. 9. Уровень изофлавонов в проростках сои, полученных в условиях проращивания с добавлением сульфата кадмия и ДГК. 1 – контроль; концентрации ДГК: 2 – 3x10⁻⁵М, 3 – 3x10⁻⁶М, концентрации ТМ: а – 5x10⁻⁴М, б – 5x10⁻⁵М, в – 5x10⁻⁶М

Внесение индуктора ДГК снижает уровень изофлавона даидзина, но повышает уровень остальных изофлавонов. Добавление в среду соли кадмия

увеличивает количество даидзина, а содержание других изофлавонов уменьшается, что свидетельствует об ответной реакции растения на окислительный стресс, вызванный действием ТМ.

При внесении ДГК невысоких концентраций увеличивается активность пероксидаз, а при добавлении сульфата кадмия активность снижается. Чем выше концентрация соли ТМ, тем ниже активность фермента. ДГК, добавленный к растворам, содержащим ТМ, приводит к изменению активности пероксидаз (рис 10А). Внесение ДГК в концентрации $3 \times 10^{-6} \text{M}$ увеличивает активность фермента в 1,5 раза по сравнению с его активностью проростков сои, выращенных в среде с ТМ. При невысокой концентрации соли ТМ внесение ДГК способствует увеличению активности фермента по сравнению с контролем, что свидетельствует о проявлении антиоксидантного действия ДГК.

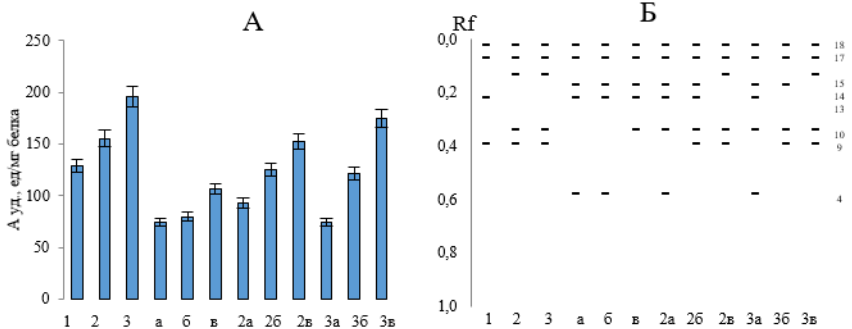


Рис. 10. Удельная активность (А) и схемы энзимогамм (Б) пероксидаз проростков сои, полученных в условиях проращивания с сульфатом кадмия и ДГК. 1 – контроль; концентрации ДГК: 2 – $3 \times 10^{-5} \text{M}$, 3 – $3 \times 10^{-6} \text{M}$, концентрации ТМ: а – $5 \cdot 10^{-4} \text{M}$, б – $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$, в – $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$

Внесение ДГК стимулирует ростовые процессы сои, а внесение соли ТМ затормаживает ростовую активность проростков, особенно, добавление ТМ в концентрации $5 \times 10^{-4} \text{M}$ уменьшает показатели в 1,5-2 раза. Стабильными формами к условиям среды являются П17 и П18 (рис. 10Б). Формы П4, П13 и П14 проявляются при окислительном стрессе, вызванном действием соли кадмия. Внесение ДГК вызывает появление форм П10 и П15. Внесение ДГК в среду, содержащую ТМ в меньших концентрациях, приводит к улучшению биометрических показателей до уровня контроля и выше, что показывает защитную функцию ДГК. Проращивание сои в течение 5 суток с добавлением сульфата кадмия приводит к увеличению уровня МДА, изменению активности пероксидаз, содержанию изофлавонов и биометрических показателей в зависимости от концентрации соли. Установлено, что внесение ДГК оказывает защитную функцию сои от окислительного стресса при невысоких концентрациях соли, значительно снижая при этом уровень МДА.

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

Внесение в среду для проращивания семян сои ДГК, арабиногалактана (АГ) и их комплексов вызывает появление новых форм пероксидаз, что соотносится с увеличением удельной активности фермента, повышает интенсивность обменных процессов на ранних этапах развития сои и приводит к увеличению ее адаптивного потенциала. Проращивание семян сои в течение 5 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 (рис. 11).

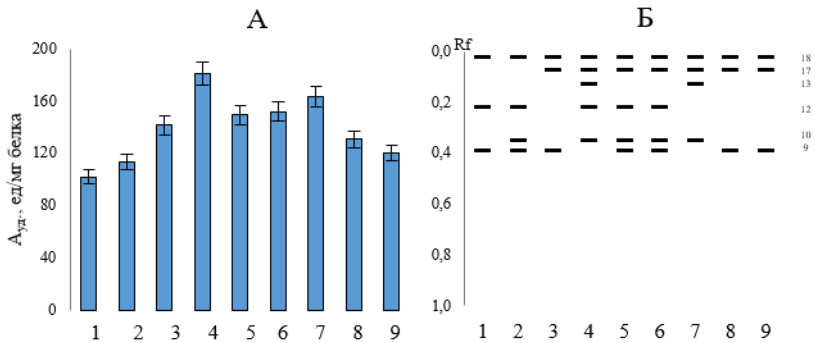


Рис. 11. Удельная активность (А) и схема энзимогрaмм (Б) пероксидаз семян сои, полученных в условиях проращивания семян с добавлением ДГК, АГ и их комплексов в соотношениях: 1 – контроль; 2 – ДГК ($6 \cdot 10^{-5}$ М); 3 – АГ ($6 \cdot 10^{-5}$ М); 4 – ДГК:АГ (1:3); 5 – ДГК:АГ (1:5); 6 – ДГК:АГ (1:10); 7 – ДГК:АГ (1:20); 8 – ДГК:АГ (1:50); 9 – ДГК:АГ (1:100)

Добавление ДГК в среду для проращивания незначительно увеличивает удельную активность пероксидаз по сравнению с контролем, что, видимо, связано с его низкой биодоступностью. Проращивание семян сои с добавлением АГ в среду вызывает увеличение активности пероксидаз на 40%, что стимулирует ростовые процессы в сое в начале её развития. Внесение в среду для проращивания комплекса ДГК+АГ привело к увеличению активности пероксидаз, что способствовало увеличению интенсивности обменных процессов. Наибольшую активность фермент проявил при внесении в среду для проращивания комплексов ДГК+АГ в соотношении 1:3 и 1:20, что показывает наиболее оптимально подобранные концентрации данных веществ в комплексе.

Установлена низкая гетерогенность пероксидаз в исследуемых образцах семян сои (от 3 до 5 форм) (рис. 11Б). Высокая удельная активность пероксидаз соотносится с повышением гетерогенности фермента в зависимости от вида комплекса ДГК и АГ. При обработке семян сои комплексом АГ:ДГК в соотношении 1:3 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 (индуктора устойчивости). Препарат представляет собой водорастворимый комплекс ДГК и АГ в соотношении 1:3, который приводит к увеличению биодоступности ДГК и повышает урожайность сои.

При обработке семян растворами ДГК, АГ и их совместного комплекса показано улучшение всхожести семян сои (рис. 12А).

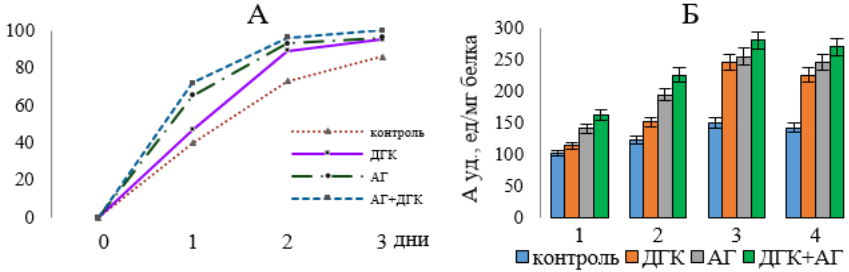


Рис. 12. Всхожесть семян (А) и активность пероксидаз (Б) при обработке семян сои растворами ДГК, АГ и их комплекса. Для варианта (Б): 1 – 5 часов, 2 – 5 дней, 3 – 14 дней, 4 – 21 день

Высокая всхожесть семян обнаружена при обработке комплексом АГ+ДГК, что объясняется увеличением биодоступности ДГК. Обработка растворами ДГК, АГ и их комплекса приводит к увеличению активности пероксидаз на ранних стадиях онтогенеза по сравнению с контролем (рис. 12Б), что характеризует положительное влияние препаратов на антиоксидантную систему растения и стимуляцию биохимических процессов, протекающих в сое. Выявлено, что активность пероксидаз увеличивается во всех вариантах опыта на стадиях раннего онтогенеза сои, что связано с активным участием фермента в процессах роста и развития растения.

На ранней стадии онтогенеза сои происходит накопление изофлавонов, что связано с их участием в процессах роста и развития растения (рис. 13).

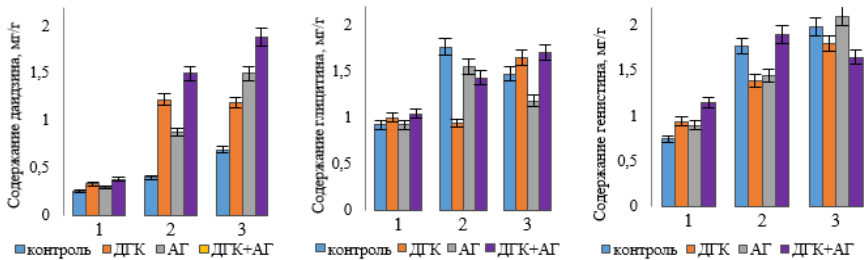


Рис.13. Динамика изменения количества изофлавонов на ранней стадии онтогенеза при обработке семян сои растворами ДГК, АГ и их комплекса через: 1 – 3 дня, 2 – 5 дней, 3 – 21 день

При проращивании сои в опытных растворах высота растения увеличивается, при этом наибольшую высоту и массу растение достигает при обработке комплексом (рис. 14), что связано с улучшением проницаемости ДГК в стенки растения за счет повышения его растворимости в воде.

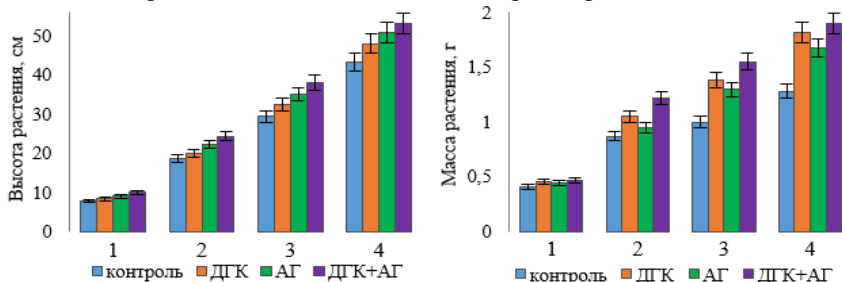


Рис. 14. Биометрические показатели растения сои на ранних стадиях онтогенеза при проращивании в растворах ДГК, АГ и их комплекса через: 1 – 3 дня, 2 – 5 дней, 3 – 14 дней, 4 – 21 день

Т.о., обработка комплексом АГ+ДГК (1:3) способствовала повышению всхожести семян, активности пероксидаз, количества изофлавонов и биометрических показателей, что объясняется повышением биодоступности ДГК. Анализ растений сои после обработки семян АГ, ДГК и их комплексом показал наличие данных веществ в растениях, что указывает на их проникновение через мембраны клеток вовнутрь и влиянии на процессы внутри клетки. Данные препараты вызывают усиление обменных процессов, что приводит к повышению содержания изофлавонов и увеличению пероксидазной активности, а также к увеличению высоты растений.

ГЛАВА 5. ВСТРЕЧАЕМОСТЬ И ХАРАКТЕРИСТИКА ФОРМ ПЕРОКСИДАЗ СОИ И ИХ РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ УСТОЙЧИВОСТИ СОИ К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ

Приведена встречаемость и характеристика МФ пероксидаз сои, полученных при различных условиях среды. В таблице 7 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 7. 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.

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 рН 4,7, что составляет 37,5 ед./мг белка, а для дикой – при рН 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 Си 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 Си 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 (мкмоль/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 холодного (4°C) и теплого (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 действии 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 действии на нее низких концентрациях солей ТМ. ДГК снижает уровень МДА, повышает удельную активность пероксидаз, приводит к появлению форм П10 и П15. При его действии 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 лиственницы 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, (СР 253-07-721-1 от 29 июля 2015 г.) и внедрен в практическое использование.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК и индексируемых в БД Scopus:

1. Кузнецова, В.А. Термостабильность пероксидаз семян сои / В.А. Кузнецова. // Масличные культуры: науч.-тех. бюллетень Всероссийского научно-исслед. института масличных культур. – 2012. – № 2 (151-152). – С. 179-183.
2. Иваченко, Л.Е. Активность каталаз, пероксидаз, амилаз, эстераз и рибонуклеаз сои в условиях температурного стресса / Л.Е. Иваченко, С.И. Лаврентьева, В.А. Кузнецова // Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки». – М.: МГОУ. – 2012. – №4. – С. 24-31.
3. Кузнецова, В.А. Влияние солей тяжелых металлов на активность пероксидаз дикорастущей сои на разных стадиях вегетации/ В.А. Кузнецова, Л.Е. Иваченко // Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки» – М.: МГОУ. – 2012. – №4. – С. 44-48.
4. Schauss, A.G. Toxicological and genotoxicity assessment of a dihydroquercetin-rich Dahurian Larch tree (*Larix gmelinii* rupestris) extract (Lavitol) / Schauss A.G., Tselyico S.S., Kuznetsova V.A., Yegorova I. // International Journal of Toxicology, 2015. Vol. 34. № 2. – P. 162-181.
5. Кузнецова, В.А. Участие дигидрокверцетина в формировании устойчивости семян сои к воздействию солей тяжелых металлов / В.А. Кузнецова, Л.Е. Иваченко, М.П. Михайлова // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2015. – Т. 157, кн. 1. – С. 69-74.
6. Ivachenko, L. E. Occurrence of multiple forms of enzymes of cultivated soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) and wild-growing soybean (*Glycine soja* Siebold&Zucc.) / L.E. Ivachenko, S.I. Lavrentieva, V.A. Kuznetsova, V.A. Razantsvei, K.S. Golokhvast, I.E. Pamirsky // Der Pharma Chemica, 2015, 7(10). – P. 415-426.
7. Кузнецова, В.А. Влияние арабиногалактана, дигидрокверцетина и их комплексов на активность пероксидаз семян сои / В.А. Кузнецова, Л.Е. Иваченко, М.П. Михайлова // Естественные и технические науки, Сер. Биолог. науки. – 2015. – № 12. – С. 24-27.

Публикации в сборниках материалов конференций

1. Кузнецова, В.А. Активность и множественные формы пероксидазы в семенах культурной сои в условиях температурного стресса / В.А. Кузнецова // ELPIT-2011. Сб. тр. III Междунар. эколог. конгресса «Экология и безопасность жизнедеятельности промышленно-транспортных комплексов», (Тольятти-Самара, 2011), Т.2., Изд-во: ТГУ, 2011. – С.122-125.

2. Кузнецова, В.А. Влияние солей тяжелых металлов на удельную активность пероксидаз культурной сои / Сб. науч. тр. Междунар. науч. конф. «Актуальные проблемы биологической и химической экологии» (Москва, 2012), М.: Изд-во МГОУ, 2012. – С. 101-103.
3. Кузнецова, В.А. Влияние дигидрокверцетина на активность пероксидаз, количество изофлавонов, биометрические показатели и урожайность сои / В.А. Кузнецова, В.С. Остронков, М.П. Михайлова, Л.Е. Иваченко // Сб. мат. 8-й конф. «Анапа-2014: Перспективы использования новых форм удобрений, средств защиты и регуляторов роста растений в агротехнологиях сельскохозяйственных культур». – М.: ВНИИА, 2014. – С. 163-165.
5. Кузнецова, В.А. Роль дигидрокверцетина в адаптации проростков сои к воздействию ацетата свинца / В.А. Кузнецова, В.С. Остронков, С.А. Лашин, Л.Е. Иваченко // Сб. мат. IX Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2015 г.) – М.: ИФР РАН, РУДН, 2015. – С. 324-329.
6. Кузнецова, В.А. Эколарикс - перспективный регулятор роста сои / В.А. Кузнецова [и др.] // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования: мат-лы XII международной конференции. – М.: РУДН, 2016. – С. 134-137.
7. Кузнецова, В.А. Роль пероксидаз и изофлавонов в адаптации сои к окислительному стрессу/ В.А. Кузнецова, М.П. Михайлова, Л.Е. Иваченко // Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений. Роль активных форм кислорода в жизни растений: материалы II Междунар. симпозиума и междунар. науч. школы. – 2017. – С. 145-146.
8. Кузнецова, В.А. Влияние лиственничных экстрактов на антиоксидантную систему и продуктивность сои / В.А. Кузнецова, М.П. Михайлова, Л.Е. Иваченко // Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты. Сб. мат-лов научной конференции. Отв. редактор В.В. Кузнецов. – 2017. – С. 208.
9. Кузнецова, В.А. Пероксидаза как биомаркер устойчивости сои в условиях окислительного стресса / В.А. Кузнецова, М.П. Михайлова, Л.Е. Иваченко// Современные аспекты структурно-функциональной биологии растений: от молекул до экосистем. Сб. всеросс. науч. конференции с междунар. участием. 2017. – С. 388-395.
10. Кузнецова, В.А. Применение регуляторов роста нового поколения на основе экстрактов из ливенницы для повышения урожайности сои, / В.А. Кузнецова, В.С. Остронков, М.П. Михайлова // Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего. Мат-лы Междунар. науч. конф., посвященной 85-летию Агрофизического НИИ. – 2017. – С. 81-83.
11. Иваченко Л.Е., Кузнецова, В.А. Оксидоредуктазы как маркеры окислительного стресса сои /Л.Е. Иваченко, В.А. Кузнецова // Научные труды II Объединенного научного форума, VI Съезда физиологов СНГ, VI Съезда биохимиков России, IX Российского Симпозиума «Белки и пептиды» (Сочи, Дагомыс, 2019). Т. 2. –М.: Изд-во «Перо», 2019. – С. 267-268.
12. Кузнецова, В.А. Роль молекулярных маркеров в формировании устойчивости сои к окислительному стрессу / В.А. Кузнецова // Сб. науч. тезисов. «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии»: 19-я Всероссийская конференция молодых учёных (Москва, 15-16 апреля 2019) М.: Изд-во ФГБНУ ВНИИСБ, 2019. – С. 93-94.

Кузнецова Виктория Александровна

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

*Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук*

В авторской редакции
Набор текста В.А. Кузнецова
Верстка, оригинал-макет В.А. Кузнецова

Подписано в печать 15.07.2020 г.
Формат 60*84/16. Печать цифровая. Гарнитура Times New Roman
Усл. печ. л. 1,63. Тираж 100 экз. Заказ № 2048.

Отпечатано в ООО «Типография», ИНН 2801145234
675000, г. Благовещенск, ул. Политехническая, 55
Тел.: (416-2)21-40-83, e-mail: amurtipograf@yandex.ru