

Таблица 2 Сохранность поросят в опыте

Группа	Пало к 60-му дню жизни		Сохранность, %
	всего	В том числе по причине незаразных болезней	
Первая	4	-	93,2
Вторая	2	-	96,5
Контрольная	15	11	75,4

## Литература :

1. Папуниди, К.Х. Патология обмена веществ и пути ее коррекции / К.Х. Папуниди, А.В. Иванов, М.Г. Зухрабов // Труды второго съезда ветеринарных врачей Республики Татарстан.-Казань, 2001.-С.192-198.
2. Рахманов, А. Д. Профилактика нарушений обмена веществ у телок и нетелей / А.Д. Рахманов // Ветеринарная патология.-2003. -№3. -С. 39-43.
3. Pond, W.G. Response of growing swine to dietary copper and clinoptilolite suplimentation / W.G. Pond, J. Yen, V. Varel // Nutur. Rep.- 2005.- V.37. - №4. – P. 795-80.

УДК 577.1; 632.938

**ПЕРОКСИДАЗЫ В ИНДУЦИРОВАННЫХ САЛИЦИЛОВОЙ  
И ЖАСМОНОВОЙ КИСЛОТАМИ ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЯХ  
КАРТОФЕЛЯ ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ФИТОФТОРОЗА  
PEROXIDASES IN SALYCYLATE- AND JASMONATE- INDUCED  
POTATO DEFENCE REACTIONS AGAINST LATE BLIGHT  
PATHOGEN**

**СОРОКАНЬ А.В., БУРХАНОВА Г.Ф., ЧЕРЕПАНОВА Е.А.  
SOROKAN A.V., BURCHANOVA G.F., CHEREPANOVA E.A.**

**ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ГЕНЕТИКИ УФИМСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РАН  
INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY AND GENETICS, UFA SCIENTIFIC CENTRE, RUSSIAN ACADEMY  
OF SCIENCE**

*The influence of sayicilic (SA) and jasmonic (JA) acids on potato resistance to *Phytophthora infestans* was investigated. It was found that this derivates increased the activity of anionic peroxidases, had an ability to bound with chitin. The maximal expression levels of chitin-speciphic peroxidases we observed in plants, cultivated on the medium with combination of SA and JA. It was correlated with decrease of disease symptoms on the infected leaves.*

Пероксидазы (ЕС 1.11.1.7) считаются одним из ключевых факторов, определяющих развитие устойчивости растений к патогенам [2] благодаря их участию в лигнификации и суберинизации клеточных стенок растений, а так же в образовании ряда соединений с антимикробной активностью [3]. Пероксидазы представлены широким спектром молекулярных форм, но функции отдельных изопероксидаз и механизмы регуляции их действия до конца не понятны [4]. Поэтому в своем исследовании мы поставили целью изучить влияние стрессовых сигнальных молекул – салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислот на экспрессию, активность и изоферментный спектр пероксидаз картофеля при инфицировании оомицетом *Phytophthora infestans* и сопоставить полученные данные с развитием в растениях устойчивости к патогену.

В исследованиях использовались пробирочные растения картофеля (*Solanum tuberosum L.*), восприимчивого к фитофторозу сорта Ранняя роза, культивируемые в течение 30-и суток на агаризованной среде Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением СК в концентрации  $5 \times 10^{-5}$  М и ЖК в концентрации  $1 \times 10^{-7}$  М, а так же их смеси. Затем, часть материала инокулировали суспензией зооспор высоковирулентного штамма *P. infestans* ( $1 \times 10^5$  спор/мл) в количестве 5 мкл на каждый лист растения. Контролем служили неинфицированные растения, культивируемые на среде МС без добавления сигнальных молекул.

Растительный экстракт получали путем растирания в 0.25 М фосфатном буфере рН 6.2 (ФБ) в соотношении 1:5. После экстракции в течение 30 мин при  $+4^{\circ}$  С центрифугировали, в супернатанте микрометодом определяли активность пероксидаз, для чего в лунки плоскдонных планшетов для иммуноанализа (Nunc, США) добавляли по 0.075 мл образца, разбавленного в ФБ в 30 раз, 0.025 мл 0.5 мг/мл раствора *o*-фенилендиамина и 0.025 мл 0.016%  $H_2O_2$ . Развитие окраски останавливали через 2 минуты, добавляя 0.05 мл 4 N  $H_2SO_4$ . Интенсивность хроматофорного ответа определяли при 490 нм на спектрофотометре для иммуноферментного анализа **Benchmark Microplate Reader (BioRad, США)**. С использованием хитина (ЗАО «Сонат», Россия) из свободно-растворимой фракции белков были выделены с помощью 1 М NaCl в ФБ ионообменно-связывающиеся с хитином белки. После хроматографии белки подвергали изоэлектрофокусированию (ИЭФ) с использованием 7%-ого полиакриламидного геля (ПААГ) и 2.5% амфолитов (BioRad) с диапазоном рI белков от 3.0 до 10.0. ПААГ проявляли на пероксидазную активность в растворе 0.01% 3,3-диаминобензидина и 0.016%  $H_2O_2$  в 0.1 М ФБ.

Тотальную РНК выделяли с помощью тризола согласно протоколу фирмы-поставщика (**Molecular Research Center, Inc**). Синтез кДНК проводили с использованием праймеров и фермента M-MLV обратной транскриптазы по протоколу фирмы-поставщика (Fermentas, США). Одноцепочечную кДНК использовали в реакции амплификации с праймерами: F (5'-TTTCGACAACAAGTACTACTTCGA-3') и R (5'-CGGATCTCTCCCGCTGC-3'). Электрофорез полученных ампликонов проводили на 1.5% агарозном геле на приборе S-2 N (Helicon, Россия). Гели после окрашивания в 0.5% растворе бромид этидия фотодокументировали на системе Gel Camera System и данные обрабатывали с помощью программы LabWorks 4.6 (UMP, Inc., США).

Из рис. 1 видно, что под воздействием СК активность пероксидазы в неин-

фицированных растениях была снижена, в то время как при использовании ЖК в отдельности и в смеси с СК этот показатель был близок к контрольному. При инфицировании возбудителем фитофтороза растений, культивировавшихся без СК и ЖК, активность свободно-растворимой пероксидазы в первые сутки не изменилась, а затем снизилась. Воздействие же этих соединений примерно в равной степени способствовало увеличению активности фермента уже через 6 часов после инфицирования, что соответствует представлению о пероксидазе как о ферменте «быстрого ответа».

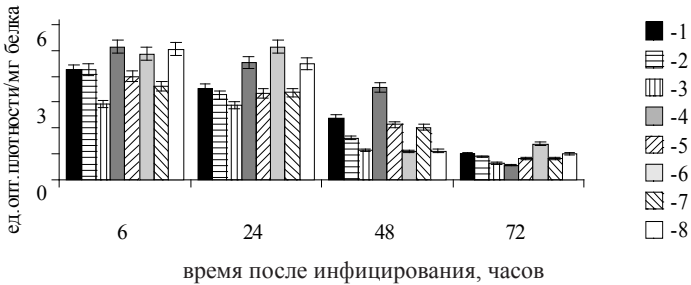


Рис. 1. Активность свободно-растворимых пероксидаз в растениях картофеля под воздействием СК, ЖК и их смеси в норме и при инфицировании *P. infestans*. 1 - контроль; 2 - контроль + *P. infestans*; 3 - СК; 4 - СК + *P. infestans*; 5 - ЖК; 6 - ЖК + *P. infestans*; 7 - СК/ЖК; 8 - СК/ЖК + *P. infestans*.

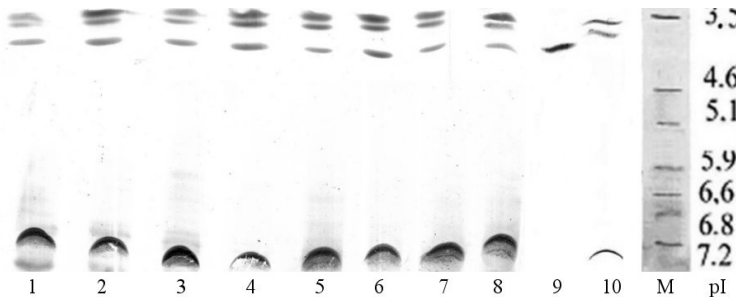


Рис. 2. Анионные пероксидазы картофеля под воздействием СК, ЖК и их смеси в норме и при инфицировании возбудителем фитофтороза. 1 - контроль; 2 - контроль + *P. infestans*; 3 - СК; 4 - СК + *P. infestans*; 5 - ЖК; 6 - ЖК + *P. infestans*; 7 - СК/ЖК; 8 - СК/ЖК + *P. infestans*; 9 - пероксидазы, не обладающие средством к хитину, 10 - пероксидазы, элюированные с хитина 1 М NaCl; М - маркер.

Инфицирование растений во всех вариантах стимулировало активность трех конститутивно присутствующих анионных пероксидаз с  $pI \sim 4.2 - 3.5$  (рис. 2). Причем под воздействием ЖК как в отдельности, так и в смеси с СК их активность проявилась наибольшей степенью. Ранее нами показано, что анионные изо-пероксидазы растений характеризуется свойством ионообменно связываться с

хитином клеточных стенок патогенных грибов [1]. В нашем исследовании из трех анионных изопероксидаз две с  $pI \sim 3.7$  и  $\sim 3.5$  сорбировались на полисахариды клеточной стенки грибов (ацетилованный хитин).

На основе проанализированных известных аминокислотных последовательностей полисахарид-связывающих сайтов пероксидаз арабидопсиса (ATg08770), цуккини (DQ518906), кукурузы (ZM004710) и картофеля (M21334) (Максимов и др., 2010) был выявлен наиболее гомологичный участок и подобраны праймеры к гену анионной пероксидазы картофеля. С помощью метода RT-PCR определена экспрессионная активность этого гена в условиях воздействия на растения сигнальных молекул и инфицирования (рис. 3).

Транскрипционная активность гена анионной пероксидазы в растениях, растущих на среде МС без СК и ЖК при инфицировании значительно возрастала только в первые часы и снижалась к 24 ч. Интересно отметить, что ЖК в неинфицированных растениях, особенно в сочетании с СК, значительно усиливала экспрессию анионной изопероксидазы. Причем эта экспрессия коррелировала как с активностью его белкового продукта, так и с развитием устойчивости растений картофеля к возбудителю фитофтороза (таблица).

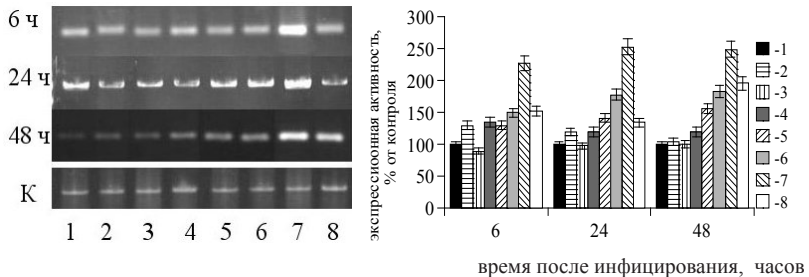


Рис. 3. Экспрессионная активность анионных пероксидаз картофеля. Обозначения те же, что и на рис. 1; К- экспрессионная активность гена «домашнего хозяйства» тубулина.

**Таблица.** Влияние СК и ЖК, а так же их композиции, на процент некротизированных участков на листьях картофеля, инфицированных *P. infestans* (12 сут после инокуляции).

	контроль	СК	ЖК	СК+ЖК
% некротизированных участков на листе	2,9±0,85	1,16±0,38	0,93±0,41	0,85±0,27

Таким образом, обработка растений смесью СК и ЖК приводила к максимальному увеличению экспрессии гена анионной пероксидазы, белковый продукт которого содержит в своей структуре связывающийся с полисахаридами домен, что, возможно, позволяет этим пероксидазам осуществлять свои функции непосредственной близости от инфекционных структур патогенов. При этом у восприимчивых к *P. infestans* растений картофеля формировался защит-

ный ответ.

Работа выполнена при поддержке госконтракта Министерства образования и науки Российской Федерации № П-339.

Литература:

1. Максимов И.В., Черепанова Е.А., Кузьмина О.И., Ярулина Л.Г., Ахунов А.А. Молекулярные особенности пероксидаз растений, связывающихся с хитином // Биоорганическая химия. 2010. Т. 36. № 3. С. 319 - 326.

2. Almagro L., Gomes Ros L.V., Belchi-Navarro S., Bru R., Ros Barcelo A., Pedreno M.A. Class III peroxidases in plant defence reactions // Journal of Experimental Botany. 2009. Vol. 60. No.2. P. 377-390.

3. Bolwell G.P., Daudi A. Reactive Oxygen Species in Plant-Pathogen Interactions // in Signaling and Communication in Plants: Book 2. Reactive Oxygen Species in Plant Signaling, Eds. del Rio L.A., Puppo A., Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2009. P. 113 - 133.

4. Cosio C., Dunand C. Specific functions of individual class III peroxidase genes // Journal of Experimental Botany. 2009. V. 60. No.2. P. 391-408.

УДК 591.525:597.553

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ УПИТАННОСТИ *CARASSIUS  
AURATUS GIBELIO* BLOCH. В БИОИНДИКАЦИОННЫХ  
ИССЛЕДОВАНИЯХ  
USE OF FATNESS *CARASSIUS AURATUS GIBELIO* BLOCH.  
IN BIOINDICATOR RESEARCHES**

*СПИРИНА Е.В., РОМАНОВА Е.В.*  
*SPIRINA E.V., ROMANOVA E.V.*

*УЛЬЯНОВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ*  
*THE ULYANOVSK STATE AGRICULTURAL ACADEMY*

*The increase in weight of an internal allows the individual to maintain intense power balance. The individuals, capable to maintain additional power expenses for a detoxication of weak doses of poisons getting into an organism, get advantages to survival in the conditions of the antropogenno-transformed reservoirs.*

В соответствии с концепцией С.С. Шварца [1], любое изменение условий жизни животных прямо или косвенно связано с изменением энергетического баланса, что неизбежно приводит к соответствующим морфофункциональным сдвигам (увеличению относительных размеров сердца и почек, повышению концентрации гемоглобина в крови и др.). При изменениях в образе жизни или в любых экстремальных условиях, животные несут большие энергетические затраты. Закономерности подобного характера выражены столь отчетливо, что они возводятся в ранг «законов». Способность повышать энергетический обмен для выживания в стрессовой ситуации выработана у животных в процессе эволюционного развития и является важнейшей их преадаптацией к изменению условий среды [1].

Основной целью исследования являлось - оценить возможность использо-