

*На правах рукописи*



**БАКУЛИНА Екатерина Андреевна**

**ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ РОЛИ ПРОЛИНА У ГАЛОФИТОВ И  
УЧАСТИЯ АФК В РЕГУЛЯЦИИ ЕГО БИОСИНТЕЗА**

03.01.05 – Физиология и биохимия растений

**Автореферат**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2010

Работа выполнена в лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор

**Шевякова Нина Ивановна**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор

**Балнокин Юрий Владимирович**

кандидат биологических наук, доцент

**Пильщикова Наталия Владимировна**

**Ведущая организация:** Учреждение Российской академии наук Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН

Защита состоится «08» июня 2010 г. в 13<sup>00</sup> часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.

Факс: (495) 977 8018, e-mail: ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан «5» мая 2010 г.

Учёный секретарь совета по защите докторских и кандидатских диссертаций, кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Накопление в растительных клетках избыточного количества активных форм кислорода (АФК) в последнее время приобретает универсальный характер, поскольку индуцируемый ими окислительный стресс является одним из ранних повреждающих факторов стрессовых воздействий на растения (Hernandes et al., 2001). Показано, что АФК повреждают мембраны; окисляют аминокислотные остатки в белках (тирозина, триптофана, фенилаланина, метионина, цистеина), что приводит к их инактивации; повреждают ДНК и другие важнейшие компоненты клетки (Asada, 1994; Mittler, 2002). При усилении в стрессовых условиях одноэлектронного восстановления кислорода при фотосинтезе в хлоропластах и транспорта электронов при дыхании в митохондриях, прежде всего, образуется синглетный кислород ( $^1\text{O}_2$ ), супероксид-радикал ( $\text{O}_2^{\circ-}$ ), затем продукт его дисмутации –  $\text{H}_2\text{O}_2$  и, наконец, самый токсичный гидроксильный радикал ( $\text{OH}^\circ$ ).

Известно, что обезвреживание АФК у растений в стрессовых условиях эффективно обеспечивается многоступенчатой системой защиты, в которой участвуют антиоксидантные ферменты, среди которых важнейшими являются супероксиддисмутазы (Cu/Zn-СОД, Fe-СОД, Mn-СОД). Однако при окислительном стрессе антиоксидантные ферменты могут инактивироваться АФК и для восстановления их синтеза требуется определенное время. В этом случае, на первый план выходят низкомолекулярные метаболиты-антиоксиданты (Mittler, 2002).

К низкомолекулярным соединениям с антиоксидантными свойствами, участвующими в “тушении“ оксирадикалов, относят ряд нетоксичных (совместимых) метаболитов, накапливающихся в растениях при действии абиотических стрессов: сорбит, мио-инозит, пролин (Smirnoff, 1993; Alia et al., 1993), маннит (Shen et al., 1997), сахара (Синькевич и др., 2009).

Среди них пролин привлекает наибольшее внимание, поскольку его аккумуляция возникает в растительных клетках при действии практически любых стрессовых факторов: холод (Трунова, 2008; Синькевич и др., 2009), засуха (Tyagi et al., 1999), тяжелые металлы (Шевякова и др., 2003; Холодова и др., 2005), ультрафиолет (Радюкина и др., 2008). Однако в течение почти 50 лет физиологи растений изучали аккумуляцию пролина в основном в связи с его осморегуляторной ролью (Aspinall, Paleq, 1981), хотя известно, что стресс-индуцированное накопление пролина в

растительных клетках обладает мультифункциональным действием на клеточный метаболизм, помогая растениям адаптироваться к неблагоприятным условиям, защищая от инактивации белки, ДНК, ряд ферментов и другие важнейшие клеточные компоненты (Кузнецов, Шевякова, 1999).

Одним из химических свойств пролина, входящих в современную концепцию о противодействии накоплению в клетках АФК, значительно опережающих повреждающее действие многих абиотических факторов, является его способность «тушить» синглетный кислород ( $^1\text{O}_2$ ) и гидроксил радикал ( $\text{OH}^\circ$ ) (Smirnoff, Cumbes, 1989; Smirnoff, 1993; Alia et al., 1997; Matysik et al., 2002). Среди совместимых метаболитов, аккумулирующихся в растениях при стрессах, только для пролина показан эффект «тушения» синглетного кислорода, образующегося в первые часы действия стрессора (Alia et al., 1997). В работе Hong (Hong et al., 2000) на основании снижения в клетках продукции малонового диальдегида (МДА) – индикатора перекисного окисления липидов, также была показана антиоксидантная роль пролина в условиях NaCl-индуцированного окислительного стресса. Экзогенный пролин, добавленный в среду культивирования растений, снижал негативный эффект окислительного стресса, индуцированного паракватом (метилвиологеном), у растений шалфея (*Salvia officinalis* L.) (Радюкина и др., 2008).

Вместе с тем, до сих пор отсутствуют систематические исследования проявления антиоксидантных свойств пролина и роли пролина в поддержании редокс-гомеостаза клеток при накоплении АФК у растений-галофитов, адаптированных к стрессам и аккумулирующих пролин в высоких концентрациях (вплоть до 500 мкм/г сырой массы у экстремального галофита *Thellungiella halophila*) (Kant et al., 2006).

В последнее время продукция АФК в растительных клетках при стрессах стала рассматриваться не только как повреждающий фактор (Apel, Hirt, 2004), но и как первичный сигнал для включения экспрессии генов, участвующих в стресс-адаптации (Foer, Noctor, 2005; Cheeseman, 2007; Radukina et al., 2010). Супероксид-радикал ( $\text{O}_2^{\circ-}$ ), перекись водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), гидроксил-радикал ( $\text{OH}^\circ$ ) являются частью сложного и разветвлённого процесса передачи стресс-сигналов. Они могут инициировать не только биосинтез ферментов-антиоксидантов, но и индукцию синтеза пролина через МАПК-сигнальный каскад подобно абсцизовой кислоте (Chinnusamy, Zhu, 2003). Однако,

регуляция экспрессии генов биосинтеза и деградации пролина (*P5CS1* и *PDH*) в связи с проявлением пролином антиоксидантной роли практически не изучалась.

Цель и задачи исследования. Цель данной работы: сравнительное исследование роли пролина как возможной “ловушки“ АФК и участия АФК в регуляции биосинтеза и деградации пролина. В качестве модельных объектов использовали растения-галофиты *Mesembryanthemum crystallinum* L. и *Thellungiella halophila* Mey.

Задачи исследования:

1. Исследовать взаимосвязь между конститутивным и стресс-индуцированным уровнем пролина и состоянием окислительного стресса у двух возрастных групп факультативного галофита *M. crystallinum*. В качестве параметров развития окислительного стресса использовать изменение активности СОД, гваяколовой ПО, каталазы, интенсивности ПОЛ, содержания АФК ( $O_2^{\circ-}$  и  $H_2O_2$ ).

2. Исследовать проявление антиоксидантных свойств пролина по ряду косвенных критериев: активности СОД, содержанию  $O_2^{\circ-}$ , хлорофилла, МДА и др., ответной реакции растений *M. crystallinum* на обработку паракватом (PQ), экзогенным пролином и совместным действием PQ и экзогенного пролина.

3. Получить каллусную культуру клеток из листьев экстремального галофита *Th. halophila*, чтобы исключить регуляцию накопления пролина и его межорганый транспорт на уровне целого растения и исследовать характер аккумуляции пролина и проявление его антиоксидантных свойств на клеточном уровне.

4. Провести сравнительный анализ конститутивного и NaCl-индуцированного уровня пролина, а также проявления пролином антиоксидантных свойств на организменном и клеточном уровне у *Th. halophila*.

5. Исследовать антиоксидантную роль пролина у нативных растений и клеточной линии *Th. halophila* в условиях моделирования PQ-усиленного образования  $O_2^{\circ-}$  и  $H_2O_2$ .

6. Исследовать влияние PQ на экспрессию ключевых генов биосинтеза (*P5CS1*) и деградации пролина (*PDH*) в каллусной культуре и у растений *Th. halophila*, произрастающих в контрольных условиях и предварительно адаптированных к засолению.

Научная новизна. Впервые изучали возможность проявления пролином антиоксидантных свойств у двух галофитов *Mesembryanthemum crystallinum* L. и *Thellungiella halophila* Mey., подвергавшихся действию засоления, про-оксиданта

параквата (PQ) и их совместному действию. Для выявления антиоксидантных свойств пролина использовали ряд специфических критериев: активность СОД, ПО, содержание АФК, интенсивность ПОЛ и др.

Впервые показан антиоксидантный эффект экзогенного пролина у растений *M. crystallinum* с низким конститутивным и NaCl-индуцированным уровнем эндогенного пролина, который состоял в снижении активности СОД, ПО, интенсивности ПОЛ и повышении содержания хлорофиллов ( $a+b$ ), что могло свидетельствовать о “тушении” экзогенным пролином, прежде всего, супероксидного радикала ( $O_2^{\circ-}$ ). Экзогенный пролин подавлял PQ-индуцируемую стимуляцию активности СОД и снижал содержание супероксид-радикала в листьях. Установлено, что у растений с пониженным уровнем накопления пролина преимущественную роль в защите от окислительного стресса выполняла СОД, на что указывал высокий уровень как конститутивной, так и индуцируемой засолением и PQ активности фермента и содержания  $H_2O_2$  в листьях. Впервые получена каллусная культура из листьев *Th. halophila*, которая отличалась от нативного растения более низкой солеустойчивостью и NaCl-зависимой аккумуляцией пролина, но превосходила более высокой активностью СОД и ПО.

Впервые показано, что в ответ на увеличение в листьях *Th. halophila* NaCl-индуцированного пула пролина в них в 5 и более раз падала активность СОД, что косвенно указывало на способность эндогенного пролина вступать в реакцию с  $O_2^{\circ-}$ . Показано также, что при обработке PQ листьев нативного растения и каллусов *Th. halophila*, культивируемых в контрольных условиях или в присутствии NaCl (100 и 200 мМ) эндогенный пролин выступал как “тушитель” супероксид-радикала ( $O_2^{\circ-}$ ) и гидроксил-радикала ( $OH^{\circ}$ ). Использование пролина на “тушение” АФК восполнялось последующей активацией экспрессии мРНК ключевого гена биосинтеза пролина (*P5CSI*), а соответствующее повышение экспрессии мРНК *PDH* могло быть связано с поддержанием в этих условиях пула глутамата.

Практическая значимость работы. Каллусная культура, полученная из листьев экстремального галофита *Th. halophila*, может использоваться для получения суспензионной культуры и изучения молекулярных механизмов адаптации к засолению. Выявленные в процессе выполнения работы критерии, косвенно свидетельствующие об антиоксидантной роли пролина, могут использоваться в экспериментальных

исследованиях и при прочтении курса лекций по механизмам адаптации растений к абиотическим стрессам.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на 11 международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука 21 века» г. Пущино, (2007 г); годовом собрании общества физиологов растений России, Международной конференции «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений», г. Екатеринбург (2008 г); годовом собрании общества физиологов растений России, Международной конференции «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях крайнего Севера», г. Апатиты, Мурманская область (2009 г).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ, из которых 1 – статья в журнале «Физиология растений». Одна работа подготовлена для печати.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Материалы диссертации изложены на 120 страницах машинописного текста и содержат 3 таблицы, 8 формул и 32 рисунка. Список цитируемой литературы включает 170 наименований, в т.ч. 151 иностранных.

## **ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В работе в качестве объектов исследования использовали два галофита: *Mesembryanthemum cristallinum* L. (хрустальная травка) и *Thellungiella halophila* Mey.

*M. cristallinum* - факультативный галофит, относящийся к семейству *Aizoaceae*. В основе выживания хрустальной травки лежит формирование адаптивных систем водосберегающего типа, сопровождающихся аккумуляцией различных совместимых метаболитов, в т.ч. пролина и переключение С3-типа фотосинтеза на САМ тип. Усиление окислительного стресса у галофита хрустальной травки в условиях засоления описано как в течение С3-типа фотосинтеза, так и при переходе на САМ-тип (Miszalski et al. 1998; Hurst et al. 2004), что также определило выбор этого объекта для наших исследований. Более того, у хрустальной травки описаны резкие флуктуации в накоплении пролина при действии NaCl (Кузнецов, Шевякова, 1999; Холодова и др. 2000, 2005; Волков, 2006).

Семена хрустальной травки из коллекции лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации ИФР РАН проращивали на влажном перлите, а затем выращивали в условиях водной культуры в камере фитотрона в следующих условиях: 14-часовой фотопериод с искусственным освещением натриевыми лампами высокого давления Reflux H220, мощностью 220 Вт (по две лампы на 1,5 м<sup>2</sup>). Уровень освещенности составлял 350 ± 50 мкмоль/м<sup>2</sup>\*сек. Температура и влажность днем и ночью составляли 24<sup>0</sup>С/16<sup>0</sup>С и 55%/70% относительной влажности воздуха, соответственно.

*Th. halophila* – экстремальный галофит семейства Капустные (*Brassicaceae*), в последнее время активно используется как новая модель в физиологических и молекулярных исследованиях (Bressan et al., 2001; Zhu 2001, Amtmann, 2009). Большое внимание привлекает то, что стресс-индуцированная аккумуляция пролина у этого вида может достигать более чем 300 мкмоль/г свежей массы (Kant, 2006). Преимущество *Th. halophila* перед *M. cristallinum* состоит в том, что этот галофит является близким родственником арабидопсиса, у которого функциональные гены биосинтеза и деградации пролина клонированы (Taji et al., 2004; Kant et al., 2006).

Использовались семена из коллекции Лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации ИФР, которые ранее были получены из Университета Глазго, Великобритания. Проращивание семян проводили в перлите в течение 2-х недель после предварительной стратификации. В условиях водной культуры растения выращивали в камере фитотрона при 12-часовом световом периоде и мощности освещения 37,6 Вт/м<sup>2</sup> люминесцентных ламп Philips (F36W/54). Температура воздуха – 23±1<sup>0</sup>С/15±1<sup>0</sup>С, относительная влажность воздуха – 55/70% день/ночь.

Каллусы *Th. halophila* получали из листьев растения в фазе розетки в асептических условиях на среде Мурасиге-Скуга с добавлением общепринятых гормонов (бензиламинопурина (БАП) 0,2 мг/л и нафтилуксусной кислоты (НУК) 0,8 мг/л.). Каллусы культивировали в условиях фитотрона при 16-часовом освещении люминесцентными лампами белого света (освещенность 4 клк). Температура воздуха – 22±1<sup>0</sup>С. Раз в месяц каллусы пассировались на свежую питательную среду.

В опытах с хрустальной травкой использовали 2 группы растений: молодые (3-4 нед) и взрослые (7-8 нед). Растения подвергали засолению, обработке паракватом (PQ) по следующей схеме: контроль (без NaCl и PQ), PQ (листья обрабатывали 1 мл раствора,

содержащего 100 мкмоль параквата в 0.05% Твин-80), засоление питательной среды (100 мМ NaCl), паракват + NaCl (100 мкмоль PQ на листья +100 мМ NaCl в среде), паракват + экзогенный пролин (100 мкмоль PQ на листья +5 мМ пролина в среде), NaCl + пролин (100 мМ NaCl и 5 мМ пролина в среде). Во всех опытах с засолением до проведения обработки PQ растения в течение 3 дней произрастали на среде с NaCl. Сразу после завершения всех вариантов обработки листьев PQ сосуды с растениями переносили в темноту на 20 ч для более полного поступления параквата в листья, а затем – на свет (4 ч) для инициации образования супероксид-радикала.

Для опытов с *Th. halophila* использовали растения в возрасте 8 недель. Засоление среды (100 и 200 мМ NaCl) и обработку листьев паракватом (PQ, 100 мкмоль) проводили по той же схеме, что и для хрустальной травки, за исключением вариантов с обработкой экзогенным пролином.

В опытах с каллусной культурой использовалась та же схема засоления (от 25 до 300 мМ NaCl, 3 сут) и обработки PQ, что и для целых растений *Th. halophila*.

Образцы листьев *M. crystallinum*, *Th. halophila* и каллусов в различных вариантах опыта отбирали после 2-24 ч экспозиции растений на свету и фиксировали жидким азотом. Замороженный материал листьев хранили при – 70°C до проведения биохимических анализов.

Проведение биохимических анализов. Содержание **пролина** определяли по методу Бейтса с соавт. (Bates et al., 1973). Определение содержания **перекиси водорода** проводилось по Brennan и Frenkel (1977), **супероксид-радикала** - по Beckett et al. (2003). Определение активности **каталазы** проводилось по методу Maehly и Chance (1954), активности общей **супероксиддисмутазы (СОД)** - по Beauchamp и Fridovich (1971), активности **гваяколовой пероксидазы (ПО)** проводили по методу, предложенному Ridge и Osborne.(1971). **Концентрацию белка** в ферментных препаратах измеряли по методу Esen (1978). Экстракцию **свободных аминокислот** из растительного материала и определение их содержания проводили на аминокислотном анализаторе согласно прописи Калининой и др. (1990). Содержание **малонового диальдегида (МДА)** определяли по методу Heath и Packer (1968). Определение **доли мертвых клеток** в каллусах проводили с использованием нитросинего тетразолия по методу Tanou et al. (2008).

Проведение молекулярных анализов. Общую РНК выделяли из растительного материала с использованием RNaseasy Plant Mini Kit («Qiagen», Германия) согласно протоколу производителя. Для синтеза кДНК методом обратной транскрипции использовали 200 ед. M-MuLV обратной транскриптазы («Fermentas», Латвия) согласно протоколу производителя.

Ранее в лаборатории были сконструированы специфические праймеры с использованием кДНК последовательностей соответствующих генов *A. thaliana* базы данных Национального Центра биотехнологической информации США, Национальной медицинской библиотеки (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) в среде Vector NTI 9.0.0, InforMax. Проверка продуктов ПЦР на соответствие количеству пар оснований амплифицируемого участка последовательности гена проводили при помощи агарозного гель-электрофореза. В качестве внутреннего контроля уровня транскриптов генов использовали экспрессию гена *ACT2*. Секвенирование кДНК последовательностей было проведено в ЦКП «Геном» института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта. Анализ секвенированных последовательностей ПЦР продуктов показал высокий процент сходства (более 65%) с предполагаемыми последовательностями генов синтеза и деградации пролина.

Результаты получены в трех биологических и трех аналитических повторностях. Обработку данных проводили общепринятыми методами математической статистики. Бары на рисунках обозначают стандартные отклонения от среднего.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### Исследование антиоксидантной роли пролина у молодых растений *M. crystallinum*.

В листьях молодых растений хрустальной травки, произраставших в контрольных условиях (без засоления) и обработанных паракватом (PQ), резко повышалась активность СОД (рис. 1а) и содержание  $H_2O_2$  (рис. 1б), что свидетельствовало об усилении всего каскада свободнорадикальных реакций. При этом активность каталазы понижалась, что не препятствовало накоплению перекиси водорода (рис. 1б). При совместном действии PQ и NaCl (100 мМ) активация СОД была менее значима, но резко возрастала активность каталазы (рис. 1а, в). В ответ на активацию PQ окислительных реакций в листьях почти в 5 раз возрастало содержание свободного пролина (рис. 1г). Наиболее высокое накопление пролина найдено у растений, произраставших в условиях засоления. Тенденцию к снижению накопления пролина при

совместном действии PQ и NaCl можно объяснить использованием его для “тушения” АФК (рис. 1г). Внесение экзогенного пролина (5 мМ) в питательную среду препятствовало снижению хлорофилла в листьях, вызванное обработкой PQ (рис. 2а). В этих же условиях образование МДА как индикатора окислительного повреждения мембран, показало лишь тенденцию к снижению (рис. 2б).

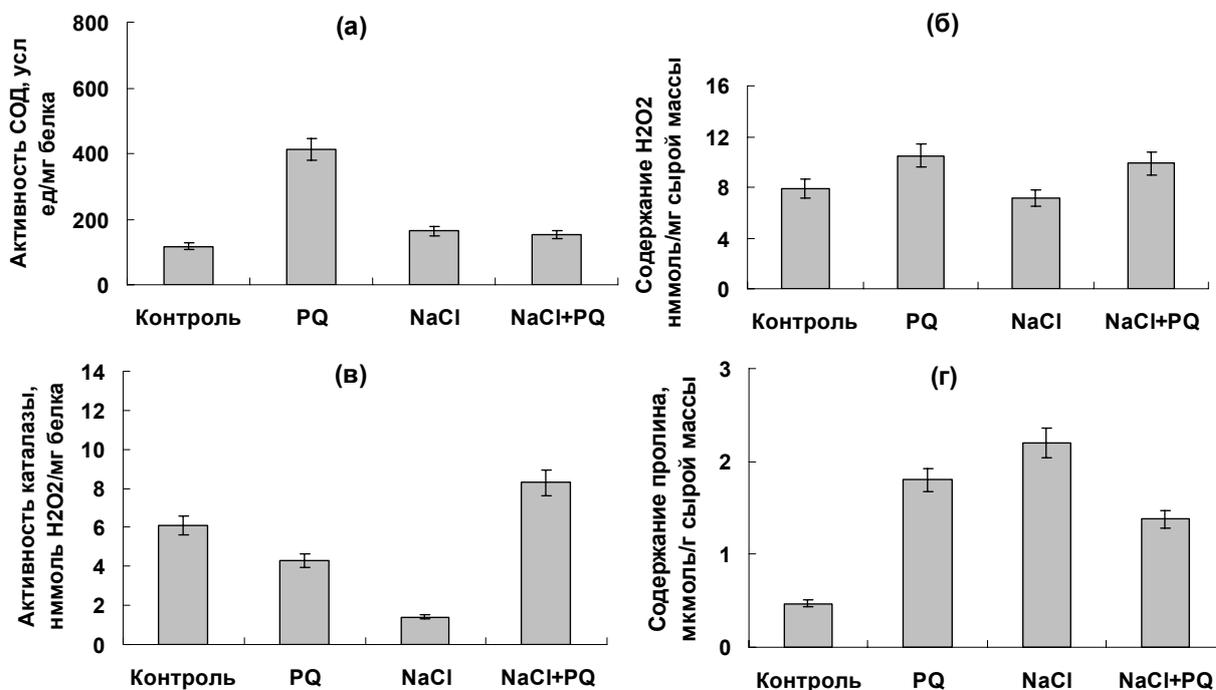


Рис. 1. Влияние параквата (PQ), NaCl и их совместное действие на активность антиоксидантных ферментов, содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в листьях молодых растений хрустальной травки.

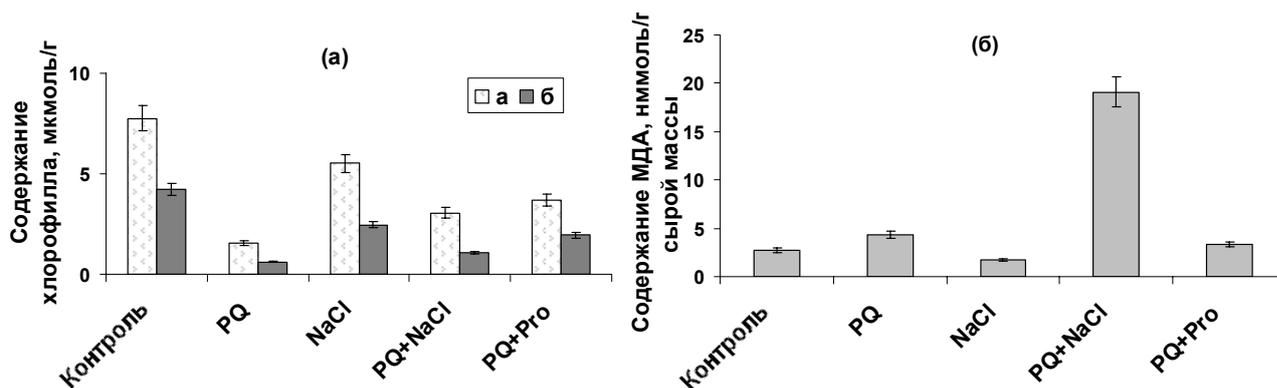


Рис. 2. Влияние параквата (PQ), NaCl, экзогенного пролина (Pro) и их совместное действие на содержание хлорофилла (a+b) и МДА в листьях молодых растений хрустальной травки.

Таким образом, у молодых растений (рис. 1г) как конститутивный, так и NaCl-индуцируемый уровень пролина в листьях был достаточно высоким для проявления им антиоксидантных свойств. По этой причине повышение эндогенного уровня внесением

в среду экзогенного пролина слабо снижало ПОЛ в условиях действия PQ, содержание хлорофилла возросло почти в 2 раза (рис. 2а, б).

Исследование антиоксидантной роли пролина у взрослых растений *M. crystallinum*. В листьях растений, обработанных PQ, активность СОД возросла по сравнению с контролем, что сопровождалось и повышением активности каталазы и, соответственно, незначительным увеличением содержания  $H_2O_2$  (рис. 3 а, б, в).

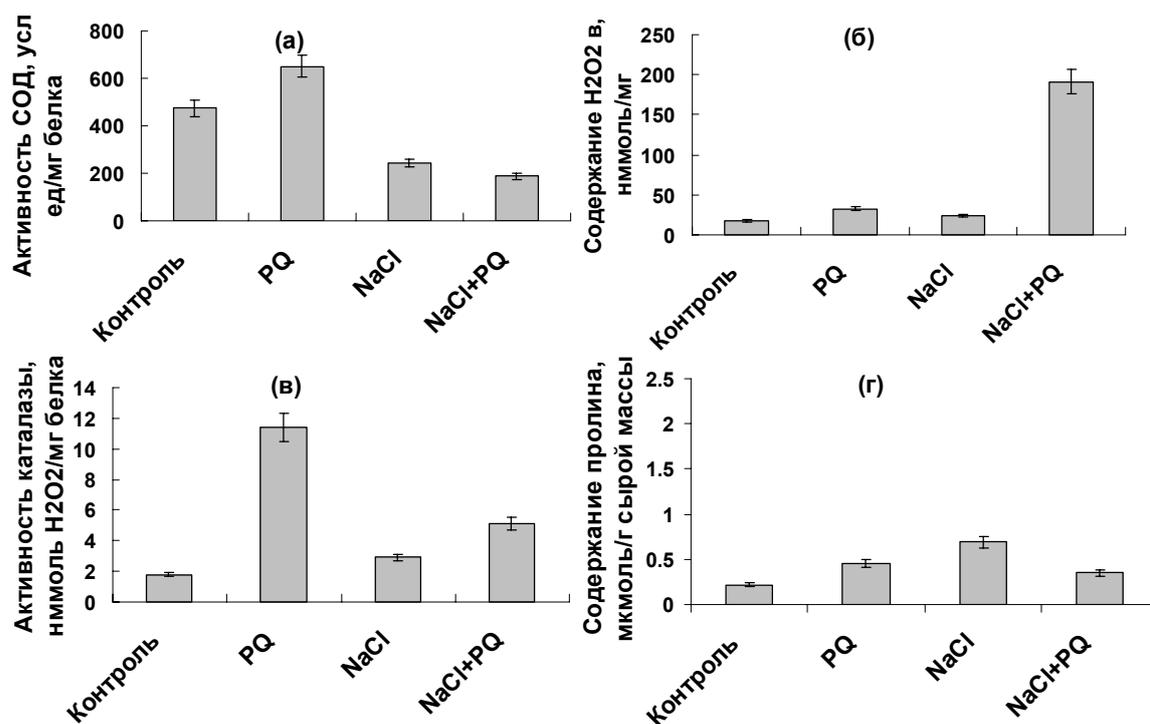


Рис. 3. Влияние PQ, NaCl и их совместное действие на активность антиоксидантных ферментов, содержание  $H_2O_2$  в листьях взрослых растений хрустальной травки.

Подобно молодым растениям (рис. 1г), ответная реакция взрослых растений на действие NaCl состояла в повышении содержания пролина в листьях, но оно было в 3 раза ниже (рис. 1г и 3г). Конститутивный уровень пролина в листьях взрослых растений был также ниже, а активность СОД, напротив, в 3 раза выше. Более того, у взрослых растений, экспонированных на среде с NaCl активность СОД и каталазы были понижены (рис. 3а, в). При экспозиции растений в присутствии PQ содержание пролина в листьях также слабо возросло по сравнению с его контрольным уровнем (рис. 3г), т.е. PQ индуцировал аккумуляцию пролина, но в гораздо меньшей степени, чем у молодых растений (рис. 1г). Действие всех изученных стресс-факторов (PQ, NaCl и совместное действие PQ и NaCl) снижало в листьях взрослых растений содержание хлорофилла (рис. 4а). Повышенный уровень МДА во всех вариантах (рис. 4б) явно свидетельствовал

о повреждении мембран.

Более выраженный положительный эффект на физиологическое состояние листьев взрослых растений оказало внесение в корневую среду экзогенного пролина (рис. 4, 5).

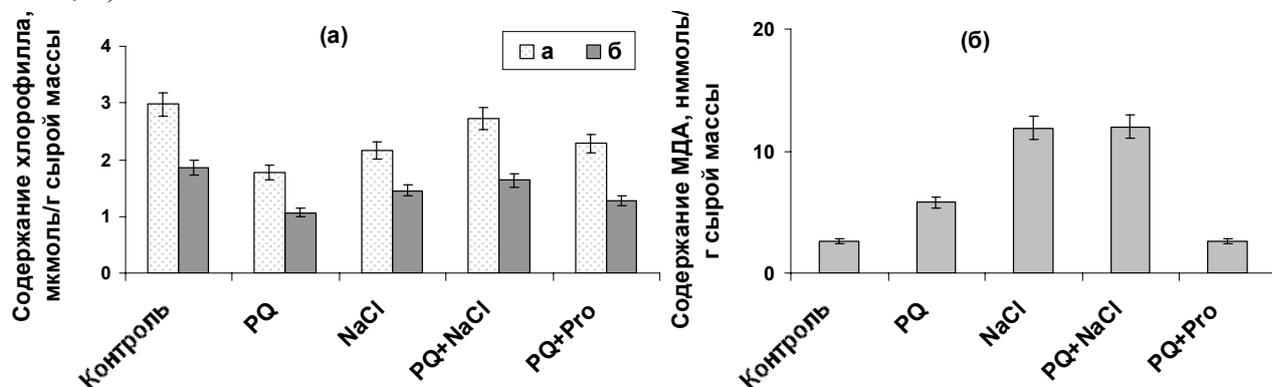


Рис. 4. Влияние PQ, NaCl, экзогенного пролина (Pro) и их совместного действия на содержание хлорофиллов и МДА в листьях взрослых растений хрустальной травки.

Так защитный эффект экзогенного пролина проявился в отношении ПОЛ и содержания хлорофилла в листьях взрослых растений (рис. 4а, б, 5б). Экзогенный пролин у растений, обработанных паракватом, подавлял паракват-индуцируемую стимуляцию активности СОД, что также сопровождалось падением содержания в листьях супероксид радикала (рис. 5а, в).

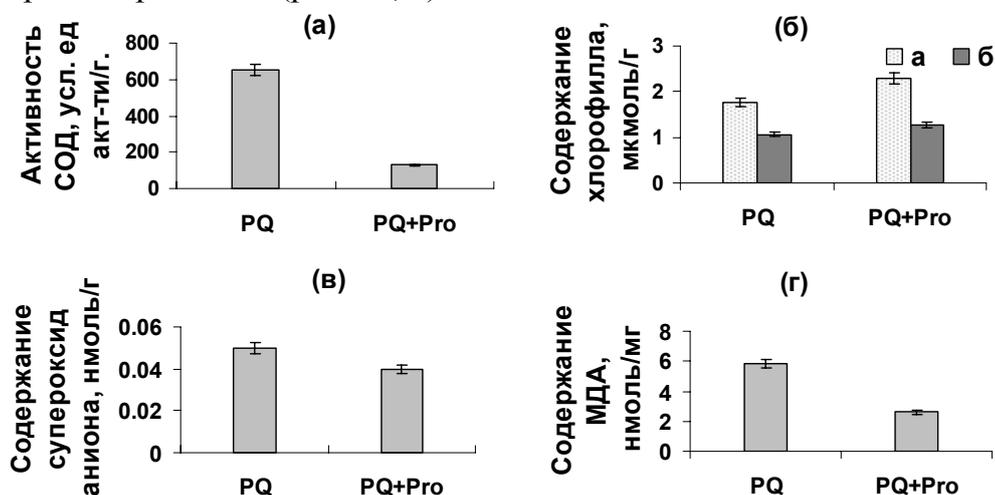


Рис. 5. Защитная роль экзогенного пролина (Pro, 5 мМ в среде) при действии PQ (100 мкмоль) на листья взрослых растений хрустальной травки.

Таким образом, растения двух возрастных групп *M. crystallinum* различались конститутивным уровнем пролина и степенью проявления NaCl-зависимой аккумуляции пролина в листьях, что нашло отражение в характере и интенсивности проявления антиоксидантной реакции экзогенного пролина. Было выяснено, что у молодых растений с высокой способностью к NaCl-зависимой аккумуляции пролина

функционирование СОД как первой линии защиты от окислительного стресса не играло существенной роли, поскольку эндогенный пролин мог выступать как “тушитель” образующихся в результате действия стрессорных факторов АФК. Обратная коррелятивная связь между активностью СОД и эндогенным уровнем пролина ранее отмечалась в исследованиях с другими представителями галофитов (Радюкина и др. 2008).

Исследование антиоксидантной роли пролина у галофита *Th. halophila*. Для того чтобы выяснить, выполняет ли пролин антиоксидантную функцию у галофита с высокой не только устойчивостью, но и аккумуляцией пролина (*Th. halophila*) проводили сравнительный анализ действия NaCl и параквата на состояние окислительного стресса, степень аккумуляции пролина у целых растений и каллусной культуры, у которой исключалось влияние организменных систем регуляции, прежде всего межорганного транспорта пролина.

Сравнительный анализ действия NaCl на содержание пролина и состояние окислительного стресса у растений и каллусной ткани. Для этой цели была получена каллусная культура из листьев галофита, которая была охарактеризована по уровню солеустойчивости, аккумуляции пролина и функционированию антиоксидантных ферментов. Сравнительный анализ проводили у нативных растений (листья в фазе розетки) и каллусах, культивируемых в течение 2-х нед в присутствии различных концентраций NaCl (25-300 мМ).

Содержание пролина в листьях *Th. halophila* постепенно возрастало с увеличением уровня засоления (рис. 6), а в присутствии 100 мМ NaCl превышало уровень пролина, который наблюдался в аналогичных условиях в листьях хрустальной травки. Причем конститутивный уровень пролина в листьях этого галофита изначально был намного выше, чем у *M. crystallinum*. Корни *Th. halophila* практически не изменяли содержание пролина в условиях засоления вплоть до 150 мМ NaCl (рис. 6).

В каллусах накопление пролина в клетках, начиналось уже при концентрации в среде культивирования 25 мМ соли (рис. 7). В целом каллусы накапливали в клетках пролин в 5 раз меньше, чем листья. Жизнеспособность каллусов, о которой судили по числу мертвых клеток (рис. 8), значительно уступала жизнеспособности нативных растений в условиях засоления.

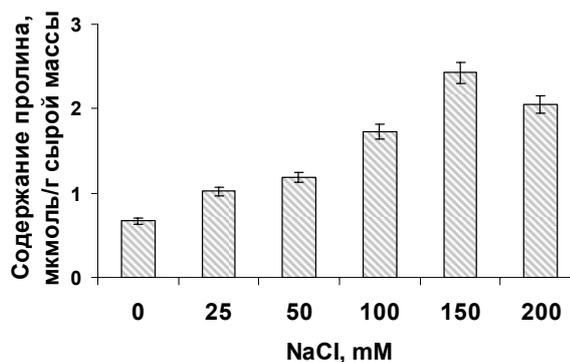
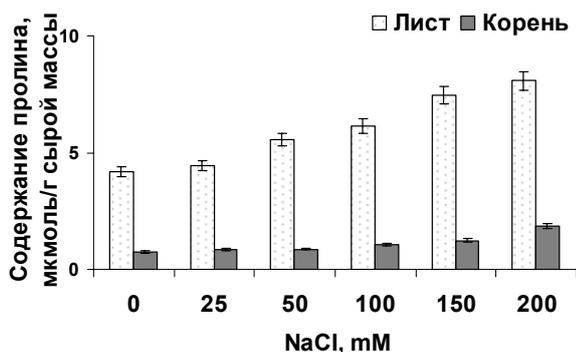


Рис. 6. Изменение содержания пролина в растениях *Th. halophila*. под действием NaCl.

Рис. 7. Изменение содержания пролина в каллусной культуре в ответ на действие NaCl.

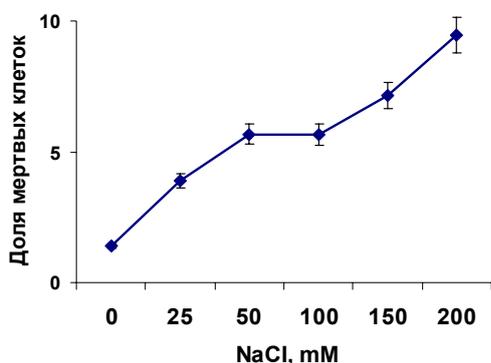


Рис. 8. Изменение содержания мертвых клеток в каллусах под действием засоления.

Таким образом, каллусная культура по сравнению с целым растением *Th. halophila*, была менее жизнеспособна в условиях засоления и накапливала пролин в меньшем количестве, что соответствует ряду исследований по сравнению солеустойчивости растений на уровне целого организма и клеточном (Шевякова и др., 1998). В связи с этим представляло интерес исследовать: насколько клетки каллуса способны защищаться от окислительного стресса и сравнить их с целым растением. Как следует из изменений в активности СОД в листьях конститутивная активность этого фермента была почти в 2 раза ниже, чем в каллусной ткани (рис. 9а, 10а).

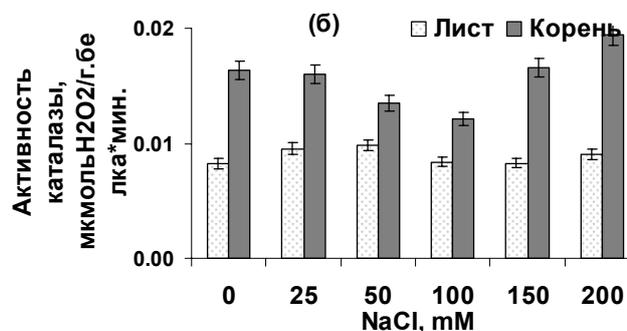
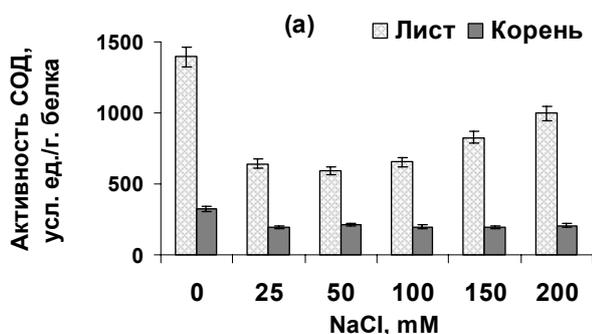


Рис. 9. Влияние засоления на активность СОД и каталазы в листьях и корнях нативных растений

С увеличением дозы засоления вплоть до 200 мМ NaCl общая активность СОД в листьях и в корнях была понижена, а активность каталазы в них практически не изменялась (рис. 9а, б). В каллусной ткани, напротив, резкий подъем активности СОД начинался уже при минимальной концентрации соли (25 мМ), превышая контрольный уровень в 3,5 раза (рис. 10). На основании полученных данных заключили, что в каллусах ответная реакция клеток на засоление и сопровождающий его окислительный стресс была во много раз более ярко выражена, чем на организменном уровне. Более того, если в листьях и, особенно, в корнях преимущество в нейтрализации  $H_2O_2$  принадлежало каталазе, то в клетках каллуса основную роль играла гваяколовая пероксидаза.

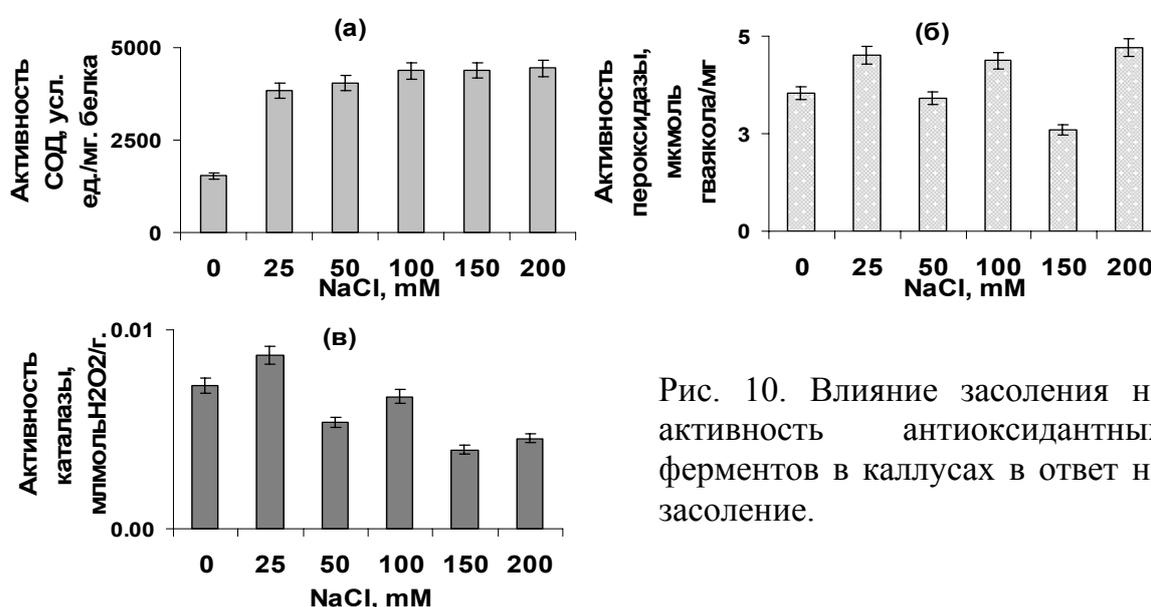


Рис. 10. Влияние засоления на активность антиоксидантных ферментов в каллусах в ответ на засоление.

Это может указывать на то, что в клетках каллусов главной мишенью действия АФК служили пластиды, что могло быть связано с низким содержанием в них хлорофилла и низкой активностью фотосинтеза по сравнению с целым растением. В целом, изменение биохимических показателей в каллусной культуре при действии солевого стресса (пролин, СОД, каталаза, пероксидаза), в большей степени отражало характер ответной реакции, найденный у растений хрустальной травки с пониженной способностью аккумулировать пролин.

Влияние обработки листьев и каллусов паракватом на содержание пролина и активность антиоксидантных ферментов. Растения и каллусы сразу после обработки паракватом помещали в темноту, а затем переносили на свет для генерации супероксид-радикала. Через 2, 4, 8 и 24 ч облучения светом проводили биохимические анализы. В качестве контроля использовали образцы листьев и каллусов перед обработкой

паракватом. Содержание пролина в листьях понизилось по сравнению с контролем в первые 2 ч действия света, что могло происходить в результате использования части его клеточного пула как “ловушки“ образующихся АФК (рис. 10а). О том, что в клетках паракуват генерировал АФК указывало повышение активности СОД (рис. 10б), свободной пероксидазы (рис. 11б) и усиление повреждения мембран (ПОЛ) (рис. 11а).

Следует отметить, что при высоком конститутивном пуле пролина в листьях общая конститутивная активность СОД была относительно низкой (150 усл. ед./г. сырой массы). Это можно объяснить обратно коррелятивной связью между этими параметрами (Радюкина 2008), когда низкая активность СОД поддерживается в клетках из-за функционирования пролина как “тушителя“ АФК, постоянно образующихся в растениях. Поэтому можно допускать, что внезапное повышение АФК при обработке растений PQ увеличивало как долю использования пролина для их нейтрализации, так и активность СОД как первой линии защиты от их накопления.

Следует обратить внимание на то, что в корнях после облучения светом листьев содержание пролина повысилось, что могло произойти вследствие оттока пролина из листьев в результате повреждения их мембран. При этом в корнях также произошло повышение активности пероксидазы, что указывает на возможное поступление в корни  $H_2O_2$ , образовавшейся как продукта дисмутации супероксид-радикала. В то же время появление “экзогенного” для корней пероксида не вызвало в них повышения активности каталазы (данные не представлены), что могло свидетельствовать о перехвате пероксида пероксидазой.

В аналогичных условиях обработки паракуватом каллусной ткани (рис. 12) отмечалось резкое повышение содержания пролина через 2 ч генерации супероксид-радикала, затем падения через 4 ч и вновь подъем в 8 и 24 ч. Такой характер изменения

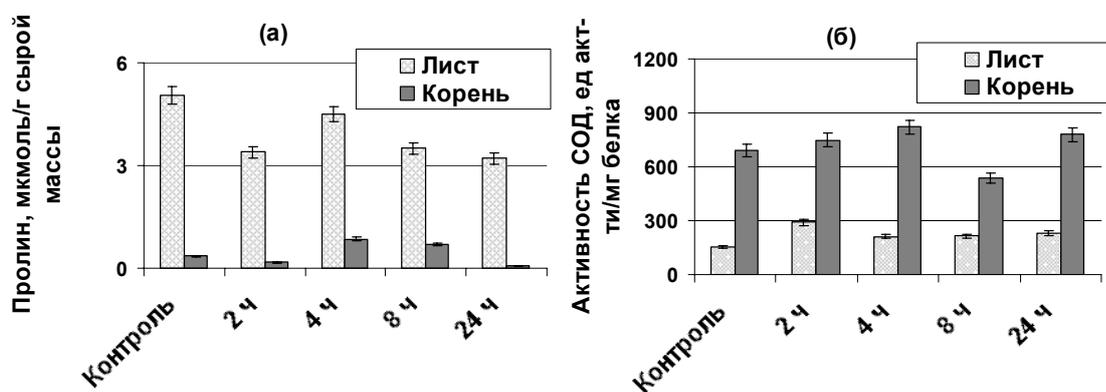


Рис. 10. Изменение содержания пролина и активности СОД в ответ на обработку PQ.

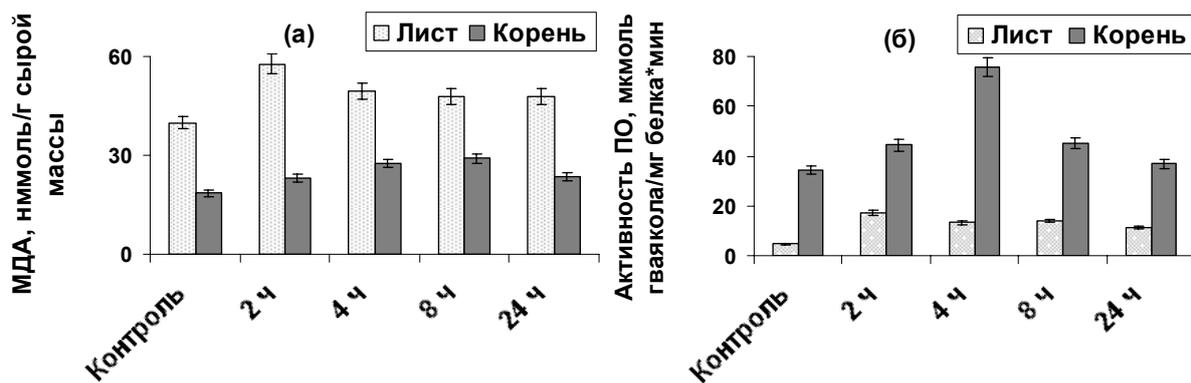


Рис. 11. Изменение содержания ПОЛ и активности свободной пероксидазы в листьях и корнях в ответ на обработку PQ.

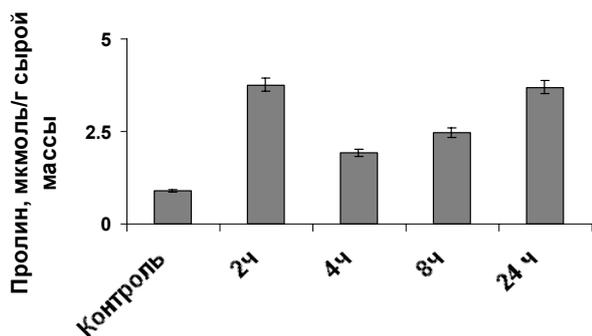


Рис.12. Изменение содержания пролина в каллусной культуре в ответ на обработку PQ.

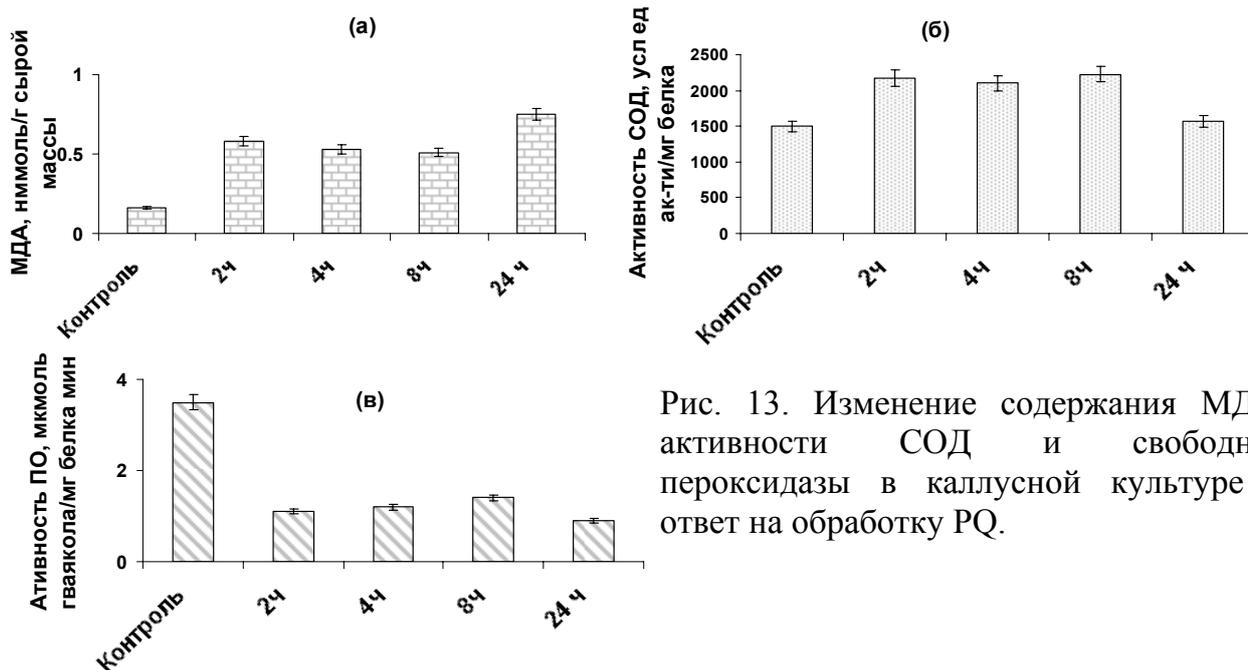


Рис. 13. Изменение содержания МДА, активности СОД и свободной пероксидазы в каллусной культуре в ответ на обработку PQ.

содержания пролина сопровождала более выраженная реакция СОД и свободной пероксидазы (рис.13б, в) и менее выраженное повреждение мембран (рис.13а).

Имея в виду более низкий конститутивный уровень пролина в каллусах по сравнению с листьями можно допускать, что имеющегося клеточного пула аминокислоты не хватало для полной нейтрализации АФК и этот дефицит восполнялся повышением его биосинтеза или снижением деградации. В нормальных условиях роста

клеток, образующиеся АФК, нейтрализовались гораздо более высоким конститутивным уровнем активности СОД (в 10 раз выше, чем в листьях) (рис. 10а и рис. 12в).

На основании сравнительного анализа ответных реакций листьев, корней и каллусов на искусственно созданный окислительный стресс при генерации PQ на свету  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  и, возможно,  $OH^\circ$ , можно заключить, что найденные изменения в их метаболизме формировались с участием антиоксидантного действия пролина и антиоксидантных ферментов. В листьях *Th. halophila* основную роль в защите от окислительного стресса играл высокий эндогенный уровень пролина, который, прежде всего, был способен “потушить” образующиеся при солевом стрессе АФК, что не требовало развития высокой активности антиоксидантных ферментов. В то же время, в полученной из листьев каллусной культуре для выполнения пролином защитной функции от резко повышенного образования АФК, о чем говорит высокая активность исследованных нами антиоксидантных ферментов (СОД, пероксидаза), имеющегося в клетках пула свободного пролина в условиях засоления, могло быть недостаточно для эффективного “тушения” токсичных форм кислорода. Более того, как показано в исследованиях (Smirnoff, Cumbes, 1989; Shen et al., 1997) при освещении хлоропластов наряду с образованием  $^1O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$  в них постоянно присутствует гидроксил-радикал ( $OH^\circ$ ), образуемый в реакции Haber-Weis или Fenton в присутствии транзитных металлов ( $Fe^{+2}$  и  $Cu^{+2}$ ) (Halliweell a Gutteridge 1980). Удаление  $OH^\circ$  также необходимо для поддержания функциональной активности хлоропластов. В отличие от  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$  ферменты, нейтрализующие  $OH^\circ$  до сих пор не найдены. Начиная с работ, проведенных Смирновым и Камбес (Smirnoff, Cumbes, 1989), считается, что пролин, присутствующий в пластидах, является “скавенджером” этой самой токсичной формы АФК. По этой причине мы посчитали необходимым хотя бы косвенно проследить такую возможность у каллусной ткани, обработанной паракватом.

Возможное участие стресс-индуцированного пролина в каллусах в “тушении” гидроксил-радикала. Для доказательства такой роли пролина мы воспользовались для идентификации реакцией подавления пролином образования тирозина из фенилаланина в присутствии гидроксил-радикала, что ранее было показано на примере маннита (Kaur, Halliwell, 1994; Shen et al., 1997) (рис. 14).

Опыты по доказательству “тушения” пролином  $OH^\circ$  по реакции образования тирозина из фенилаланина мы проводили на примере каллусной культуры, которую

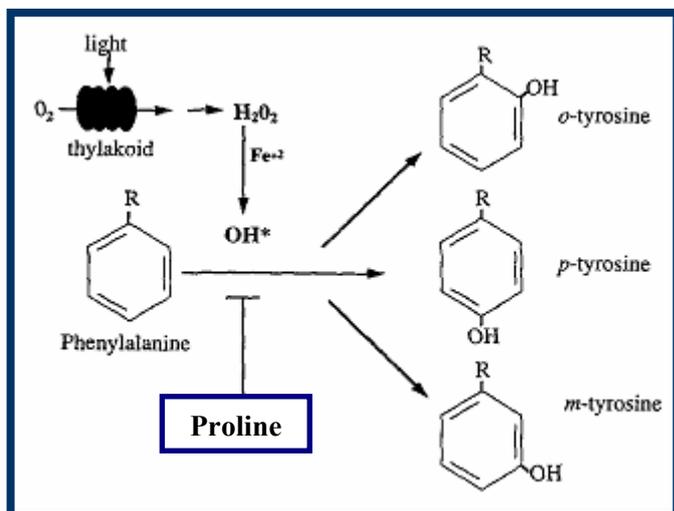


Рис. 14. Предполагаемая схема «тушения» гидроксил-радикала пролином.

обрабатывали PQ. Для усиления роли пролина как возможного «скавенджера» образуемого в этой системе гидроксил-радикала, каллусную ткань предварительно (3 дн) культивировали в присутствии 100 мкМ NaCl для стресс-индуцированного накопления пролина. Содержание пролина в каллусах в присутствии NaCl возросло по сравнению с контролем в 3 раза, а при совместном действии засоления и параквата в 5 раз (рис. 15). При этом содержание в клетках предшественника пролина глутамата, резко упало, то есть увеличение содержания пролина происходило путем повышения его биосинтеза.

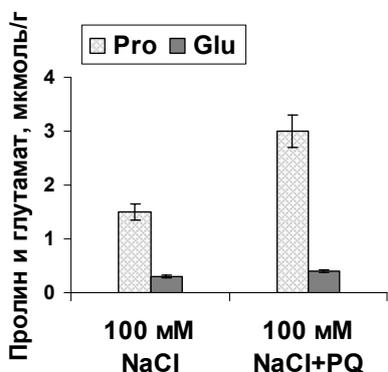


Рис. 15. Влияние обработки каллусов паракватом на повышение биосинтеза пролина из глутамата.

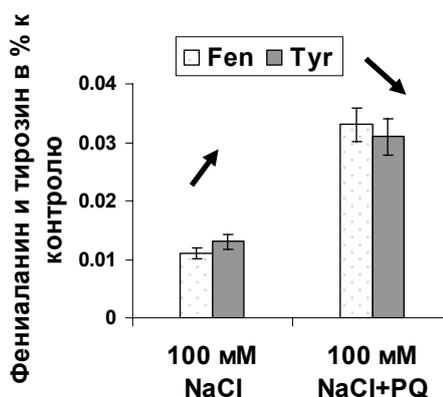


Рис. 16. Торможение пролином реакции гидроксирования фенилаланина при образовании тирозина в каллусах, предварительно культивированных в присутствии NaCl и обработанных PQ.

Как следует из сравнения полученных данных (рис. 15 и 16) при усилении в клетках биосинтеза пролина и его действия как «скавенджера» OH<sup>\*</sup>, образование тирозина из фенилаланина имело тенденцию к торможению. Таким образом, можно предполагать, что пролин служил «ловушкой» гидроксил-радикала.

Влияние PQ на биосинтез и деградацию пролина в листьях и каллусной культуре *Th. halophila*. Для выяснения возможного действия PQ на экспрессию мРНК ключевых

генов биосинтеза (*P5CS1*) и деградации (*PDH*) пролина в связи с использованием пролина на “тушение“ образующихся АФК.

Влияние PQ на биосинтез и деградацию пролина исследовали у нативных растений и каллусной линии, предварительно культивированных в условиях засоления (100 или 200 мМ NaCl) в течение 7 дн. Мы полагали, что у растений, адаптированных к засолению и уже имеющих повышенный пул пролина, ожидаемые *de novo* изменения в содержании пролина и уровне транскриптов генов его биосинтеза и деградации могут быть инициированы исключительно действием АФК, образованных на свету в присутствии PQ.

У контрольных растений, произраставших в течение 7 дн на контрольной среде (без NaCl), в начале генерирования паракватом АФК в световых условиях (4 ч) конститутивный уровень пролина в листьях резко снижался, что могло указывать на расходование пролина для их “тушения“ (рис. 17). Последующее восстановление содержания пролина могло быть результатом активации его биосинтеза, индуцированного продолжающимся нарастанием интенсивности окислительного стресса. Было показано, что восстановление содержания пролина в листьях действительно происходило путем активации экспрессии гена *P5CS1* и отсутствия существенных изменений в транскриптах гена деградации пролина (*PDH*).

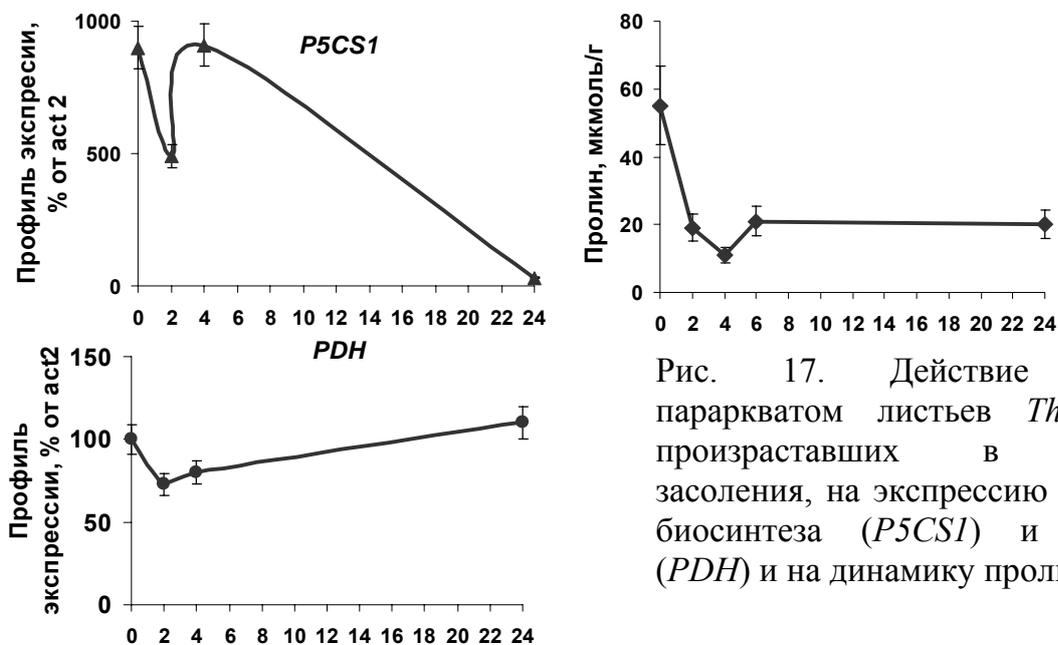


Рис. 17. Действие обработки паракватом листьев *Th. halophila*, произраставших в отсутствии засоления, на экспрессию мРНК генов биосинтеза (*P5CS1*) и деградации (*PDH*) и на динамику пролина (ч).

В то же время у растений, предварительно адаптированных к засолению, аккумуляция пролина в листьях на фоне окислительного стресса, генерируемого PQ, уже через 2 ч после темнового периода совпадала с транзитной активацией в этих

условиях экспрессии мРНК гена биосинтеза (*P5CS1*) (рис. 20). Следующий транскрипционный максимум в биосинтезе пролина проявился через 8 ч действия стресса, когда содержание пролина резко упало предположительно из-за его расхода на “тушение” АФК (рис. 22). Этот вывод подтверждался ходом изменения в этих условиях активности СОД, обезвреживающего супероксид, и находящейся в обратном отношении с динамикой аккумуляции пролина, что свидетельствовало об участии пролина в “тушении“ супероксида (рис. 18). При этом уровень транскрипта гена *PDH* резко повышался через 2 и 4 ч действия стресса, а затем постепенно снижался к концу экспозиции растений (8-12 ч) в присутствии параквата (рис. 18).

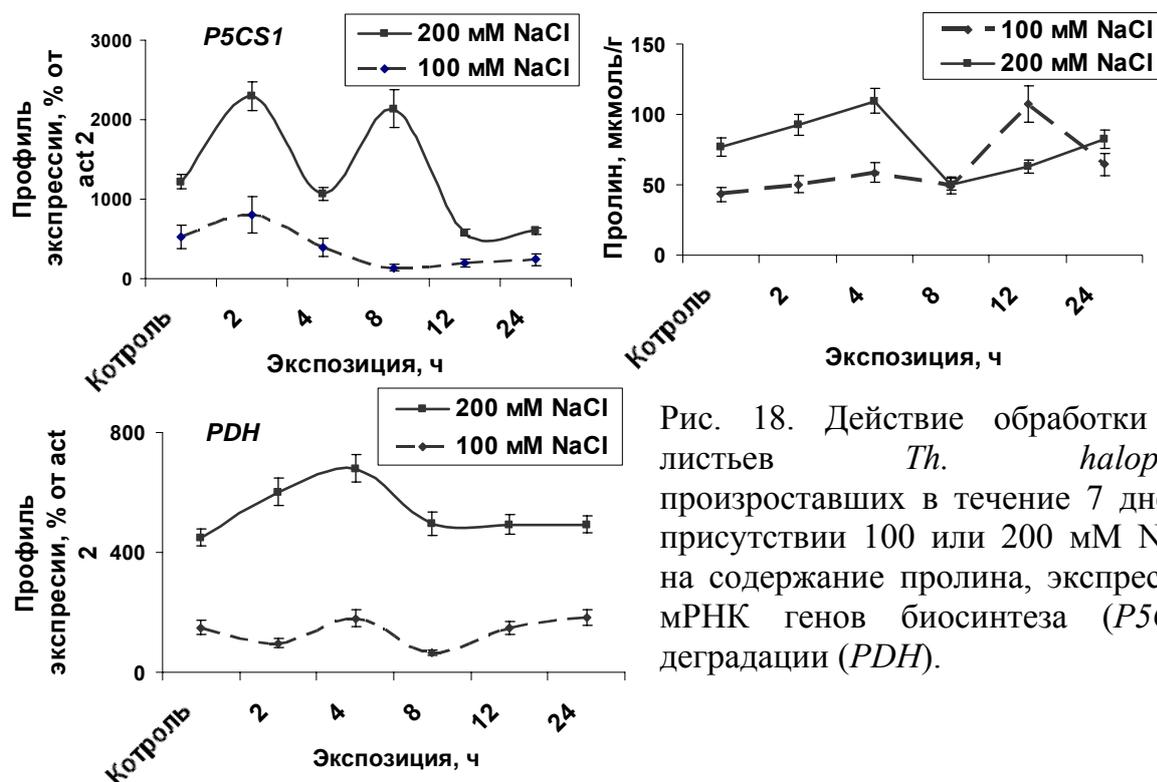


Рис. 18. Действие обработки PQ листьев *Th. halophila*, произрастающих в течение 7 дней в присутствии 100 или 200 мМ NaCl, на содержание пролина, экспрессию мРНК генов биосинтеза (*P5CS1*) деградации (*PDH*).

Мы полагали, что у растений, адаптированных к засолению и уже имеющих повышенный пул пролина, ожидаемые *de novo* изменения в содержании пролина и уровне транскриптов генов его метаболизма могли быть инициированы исключительно действием АФК, образованных на свету в присутствии параквата.

По той же схеме были проведены опыты с каллусной тканью. В клетках, адаптированных к меньшей концентрации NaCl (100 мМ) действие параквата вызвало менее выраженные изменения, как в накоплении продукта, так и активации генов его биосинтеза и деградации (рис. 19). При этом катаболизм пролина, регулируемый на транскрипционном уровне, активировался подобно его биосинтезу.

На основании проведенного анализа литературы и собственных исследований мы

предположили, что сигналом к стресс-индуцируемому усилению биосинтеза пролина может быть образование АФК как в условиях засоления, так и непосредственно в условиях окислительного стресса, вызываемого PQ. Мы исходили из того, что накопление в растениях АФК, одно из ранних проявлений повреждающего действия абиотических стрессоров. Действие PQ индуцировало свободно-радикальные реакции с участием кислорода, и одновременно с образованием супероксид-радикала в клетке мог образовываться синглетный кислород, супероксид-радикал (Foyer, Noctor, 2005), а также перекись водорода, которая в отличие от перечисленных выше АФК, способна к передвижению (Cheesman, 2007). Возможно также, что возникновение АФК опережает по времени появление других сигнальных соединений – АБК и салициловой кислоты, которые синтезируются *de novo* или освобождаются из конъюгированных форм в условиях стресса (Ugano et al., 2004, Холодова и др. 2006; Шевякова и др., 2009).

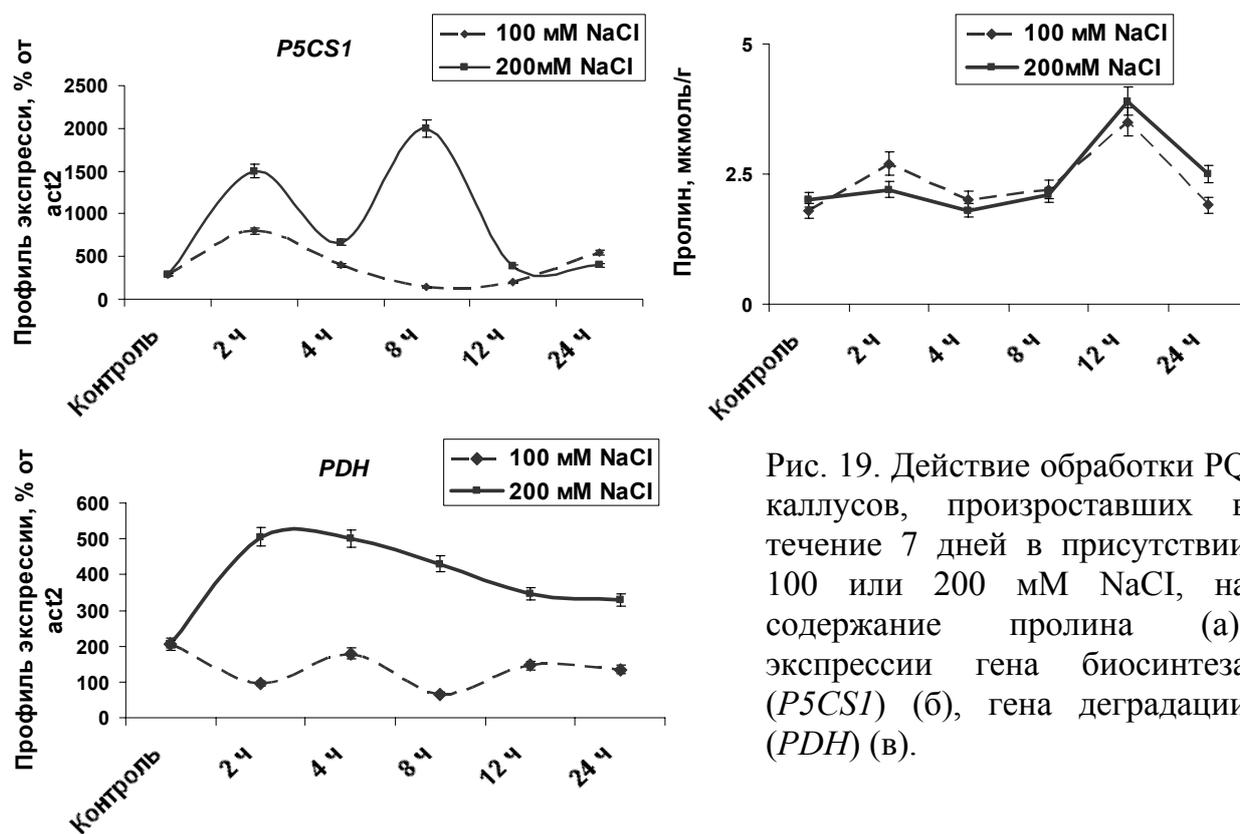


Рис. 19. Действие обработки PQ каллусов, произрастающих в течение 7 дней в присутствии 100 или 200 мМ NaCl, на содержание пролина (а), экспрессии гена биосинтеза (*P5CS1*) (б), гена деградации (*PDH*) (в).

Таким образом, полученные результаты позволяют предполагать, что в сигнальном каскаде, приводящему к дифференциальной экспрессии генов биосинтеза пролина в листьях и каллусной культуре клеток у галофита *Th. halophila* участвуют АФК, и в частности, пероксид водорода, как наиболее подвижное соединение. Стресс-индуцируемое повышение уровней мРНК наблюдалось, прежде всего, для ключевых генов биосинтеза *P5CS1* и катаболизма *PDH*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема образования в растительных клетках избыточного количества активных форм кислорода (АФК) и, в первую очередь, синглетного кислорода ( $^1\text{O}_2$ ) и супероксид-радикалов ( $\text{O}_2^{\circ-}$ ) в последнее время приобретает универсальный характер. Считается, что первой линией защиты от накопления супероксид радикала в растительных клетках является активация супероксиддисмутаза (СОД). Однако, у некоторых видов растений, в частности у галофита *Thellungiella halophila*, был найден низкий конститутивный уровень этого фермента и отсутствие стресс-индуцируемого повышения его активности (Радюкина и др., 2007). В то же время у этого растения в листьях был высокий конститутивный уровень пролина и его необычно интенсивная аккумуляция (выше 300 мкмоль/г сырой массы) в ответ на солевой стресс (600-700 мМ NaCl) (Inan et al., 2004; Kant et al., 2006; Радюкина и др., 2007, 2008). В связи с этим мы предположили, что необычно высокий конститутивный уровень пролина и его NaCl-зависимая аккумуляция могут быть связаны с проявлением пролином антиоксидантной активности. Для проверки этой гипотезы мы провели сравнительный анализ характера изменения различных параметров окислительного стресса у двух модельных объектов факультативного галофита *Mesembryanthemum crystallinum* L., экстремального галофита *Thellungiella halophila* Mey и полученного из листьев этого растения каллусной культуры. Для решения поставленных задач использовали различные косвенные критерии проявления пролином антиоксидантной активности: ответную реакцию антиоксидантных ферментов (СОД, ПО, каталазы), интенсивности ПОЛ, образование  $\text{O}_2^{\circ-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  на обработку растений экзогенным пролином и моделирование повышенного образования АФК при действии про-оксиданта параквата (PQ).

В проведенных исследованиях было установлено, что у растений и каллусной культуры с пониженной продукцией пролина основную защитную роль в условиях накопления АФК выполняли антиоксидантные ферменты (СОД, ПО, каталаза), а антиоксидантная роль пролина проявлялась у пролин-аккумулирующих растений, что было показано на примере обработки растений экзогенным пролином и PQ, индуцирующим усиление окислительного стресса. При совместном действии экзогенного пролина и PQ активность СОД падала, снижалась продукция  $\text{O}_2^{\circ-}$ , что свидетельствовало о “тушении“ экзогенным пролином  $\text{O}_2^{\circ-}$  и восстановлении нормального содержания в листьях хлорофилла и низкой интенсивности ПОЛ. При инициации супероксидного стресса PQ на свету контрольных листьев и листьев, испытывающих

действие солевого фактора, было найдено статистически значимое снижение содержания в них эндогенного пролина в первые 2 ч действия света, что указывало на использование пролина для нейтрализации образовавшихся АФК. При этом использование пролина для “тушения” АФК в последующие часы действия света восполнялось повышением экспрессии мРНК ключевого гена биосинтеза пролина (*P5CSI*) и деградации (*PDH*). Усиление распада пролина в митохондриях также рассматривается как необходимость повышения в клетках пула глутамата-предшественника пролина, который в стрессорных условиях мог тратиться также для других метаболических процессов.

Совокупность полученных данных свидетельствует, что “суперпродукция” пролина у галофитов в условиях засоления наряду с проявлением пролином других защитных функций направлена на ликвидацию повышенного образования АФК и, в частности, “тушение” синглетного, супероксидного и гидроксильного радикалов.

## ВЫВОДЫ

1. Проведен сравнительный анализ изменения различных параметров окислительного стресса у растений-галофитов (*Mesembryanthemum crystallinum* L. и *Thellungiella halophila* Mey), аккумулирующих пролин в условиях засоления, косвенно свидетельствующий о проявлении пролином антиоксидантных свойств.

2. Установлено, что обработка про-оксидантом паракватом (PQ) взрослых растений *M. crystallinum* с низким уровнем NaCl-зависимого накопления пролина резко повышала в листьях активность СОД, которая служила основной линией защиты от окислительного стресса у этой группы растений.

3. При совместном действии экзогенного пролина и PQ на растения с низким содержанием пролина активность СОД резко падала, что сопровождалось снижением в листьях содержания супероксид-радикала, повышением содержания хлорофилла и снижением интенсивности ПОЛ, т.е. экзогенный пролин выполнял роль “тушителя” супероксидного радикала ( $O_2^{\bullet-}$ ).

4. У молодых растений *M. crystallinum* с повышенным уровнем NaCl-зависимой аккумуляции пролина активность СОД при усилении окислительного стресса обработкой листьев PQ практически не изменялась, что косвенно свидетельствовало о “тушении” эндогенным пролином образующихся *de novo* АФК.

5. Впервые проявление антиоксидантной активности пролина исследовали у экстремального галофита *Th. halophila*, обладающего необычно высоким конститутивным уровнем и стресс-индуцированной аккумуляцией пролина, но относительно низкой активностью СОД, что могло указывать на участие в этих условиях механизма “тушения” пролином АФК.

6. Анализ накопления пролина и активности СОД в каллусной культуре, полученной из листьев *Th. halophila*, показал резкое снижение солеустойчивости клеток и поддержание в них более низкого, чем у нативного растения как контрольного, так и стресс-индуцируемого уровня пролина. Вместе с тем, в каллусах найдена высокая конститутивная активность антиоксидантных ферментов (СОД и ПО) и возрастание их активности в ответ на засоление и обработку PQ. Повышенная активность этих ферментов в каллусной линии может указывать на то, что в этом случае понижение NaCl-зависимого накопления пролина может компенсироваться усилением активности антиоксидантных ферментов.

7. Исследование динамики накопления пролина при действии PQ на каллусную линию и листья нативного растения *Th. halophila* показало, что использование пролина на “тушение” образующихся АФК восполнялось активацией экспрессии мРНК ключевого гена его биосинтеза (*P5CS1*). Повышение в этих условиях уровня транскриптов мРНК гена деградации пролина (*PDH*) могло быть направлено на поддержание пула глутамата - предшественника пролина.

#### Список работ по материалам диссертации

1. Шашукова А.В., **Бакулина Е.А.** Исследование защитных систем *Mesembryanthemum cristallinum* L. в ответ на действие NaCl И УФ-Б" // 11 международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология наука 21 века» г. Пущино, 2007 г. С. 165-166.

2. **Бакулина Е.А.**, Идрешев А., Литонова Т.В., Шевякова Н.И. Антиоксидантная роль пролина у галофита *Thellungiella halophila* Mey в условиях супероксидного стресса // Годичное собрание общества физиологов растений России, международная конференция «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений», Екатеринбург. 2008г. С.61-62.

3. Шевякова Н.И., **Бакулина Е.А.** Пролин защищает растения хрустальной травки

от супероксидного стресса // Годичное собрание общества физиологов растений России, международная конференция «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений», Екатеринбург. 2008. С.436-437.

4. **Бакулина Е.А.**, Шевякова Н.И., Кузнецов Вл.В. Исследование антиоксидантной роли пролина при засолении и действии параквата // Международная научная конференция «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера» Апатиты, Мурманская область. 2009. С.42-44.

5. Радюкина Н.Л., Иванов Ю.В., **Бакулина Е.А.**, Юренков А.А., Абдуллаев М.Н., Карташов А.В., Кузнецов Вл. В.. Участие пролина в защитном ответе растения *Tellungiella halophila L.* на действии абиотических стрессоров // Международная научная конференция «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера» Апатиты, Мурманская область. 2009. С.243-275.

6. Шевякова Н. И., **Бакулина Е. А.**, Кузнецов Вл. В. Антиоксидантная роль пролина у галофита *Mesembryanthemum crystallinum* ответ на краткосрочный супероксидный стресс, генерируемый паракватом // Физиология растений. 2009. Т.56. № 5. С.1-7.