

на правах рукописи



ТЮТЯЕВ ЕВГЕНИЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
КАРОТИНОИДОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ ТЕМПЕРАТУРЫ И ИЗМЕНЕНИЯ
ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ КЛЕТКИ**

03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Воронеж–2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва»

Научный руководитель: Доктор биологических наук, профессор
Максимов Георгий Владимирович

Официальные оппоненты: **Креславский Владимир Данилович** доктор биологических наук, профессор, ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии РАН, группа экологии и физиологии фототрофных организмов, ведущий научный сотрудник

Зотов Василий Сергеевич кандидат биологических наук, ФИЦ Биотехнологии РАН, лаборатория биохимии азотфиксации и метаболизма азота, научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук»

Защита состоится «08» ноября 2016 г. в 13.30 на заседании диссертационного совета Д 212.038.03 при Воронежском государственном университете по адресу: 394018, г. Воронеж, Университетская пл., 1 ауд. 59.

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Минобрнауки Российской Федерации и на сайте Воронежского государственного университета <http://www.science.vsu.ru>

С диссертацией можно ознакомиться в зональной библиотеке Воронежского государственного университета.

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук



Грабович Маргарита Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Фотосинтез является одним из ключевых процессов, происходящих в биосфере, благодаря которому стало возможным образование органического вещества путем аккумуляции солнечной энергии в энергию химических связей. Ключевую роль в конверсии световой энергии играют белковые комплексы, содержащие в своем составе фотосинтетические пигменты – хлорофиллы (Хл) и каротиноиды (Кар). С помощью пигментов осуществляются процессы как сбора световой энергии (Хл, Кар), разделение зарядов (хлорофиллы P680, P700), транспорта электронов, так и диссипации энергии в целях сохранения нативных функций фотосинтетического аппарата (ФСА) в условиях действия высоких энергий света (образование АФК, перекисей, липоперекисей, триплетных состояний хлорофилла и др.). Важно, что функционирование ФСА подстраивается к условиям среды обитания не только за счет трансформации пигмент-белковых комплексов (ПБК), но и также за счет изменений белок-липидных и липид-липидных взаимодействий в ФСА (Golovko T.K. *et al.*, 2014).

В настоящее время известно, что каротиноиды играют важную роль не только в поддержания стабильности ФСА растений, но также являются важными объектами исследования биофизики, биохимии и биотехнологии. В связи с этим весьма актуальным является исследование физико-химических характеристик каротиноидов в генетически модифицированных клетках, что позволит выявить зависимость между медленными (генетически детерминированными) и быстрыми (негенетически детерминированными – свет, температура, рН и др.) факторами и процессами происходящих в ФСА: флуоресценция хлорофилла, изменение конформации и содержания каротиноидов, их микроокружения (белки, липиды), что является важным для их практического использования в различных отраслях жизни человека.

Цель работы: Исследование физико-химических свойств каротиноидов при действии температуры и изменения генетического профиля клетки.

Задачи:

1. Исследовать изменения в функционировании и распределении молекул каротиноидов в клетках дикого типа и мутанта цианобактерии;
2. Исследовать роль изменений конформации каротиноидов в регуляции миграции энергии в клетках мутантов и дикого типа цианобактерии;
3. Исследовать изменения конформации молекул каротиноидов в клетках дикого типа и мутанта цианобактерии при различных температурах;
4. Исследовать роль рН в изменении содержания и конформации каротиноидов в клетках водоросли;
5. Исследовать температурную зависимость флуоресценции хлорофилла в листьях высших растений;
6. Исследовать изменения содержания и конформации пигментов в клетках листьев инбредных линий и гибридов кукурузы (*Zéa máys L.*).

Научная новизна работы. Установлено, что в мутанте *ΔPSII* в сравнении с диким типом, содержание каротиноидов увеличено и пигменты распределены равномерно по всей клетке. У дикого типа и мутантов *ΔPSI/ΔPSII*, *ΔOCP* цианобактерии *Synechocystis sp. PCC6803*, обнаружено, что увеличение времени жизни флуоресценции хлорофилла коррелирует с уменьшением степени делокализации π-электронной системы молекул каротиноидов. Доказано, что у дикого типа цианобактерий конформация каротиноидов зависит от изменения жирнокислотного состава, вызванного ферментом – десатуразой. Повышение экстраклеточного рН с 8,0 до 9,0 приводит как к увеличению содержания каротиноидов в клетках водоросли, так и к изменению их конформации (состава). Доказано, что инбредные линии растений отличаются в строении ССК ФС 1 и 2, а гибриды - конформацией молекул каротиноидов. Изменение температуры приводит как к увеличению флуоресценции хлорофилла, так и изменению распределения пигмента в листе, что, вероятно, связано с фазовыми переходами липидов мембран.

Научно-практическая значимость работы: Полученные результаты представляют дополнительную информацию для более глубокого изучения путей взаимодействия между конформацией каротиноидов, флуоресценцией хлорофилла и физико-химическим состоянием фотосинтетических мембран, а также разработки методологии тестирования процессов регуляции и адаптации фотосинтетического аппарата к стрессовым условиям, молекулярной генетики и селекции. Результаты по изменению содержания, конформации и распределения пигментов (каротиноиды, хлорофилл) могут быть предложены в качестве методологии диагностики состояния ФСА.

Связь работы с научными программами: Часть представленных результатов были получены в ходе исследований, проведенных в рамках научно-практических работ при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере У.М.Н.И.К. 2014–16 «Разработка метода индукции флуоресценции хлорофилла для изучения состояния фотосинтетического аппарата» (проект 3069 ГУ/2014 от 04.08.2014г).

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены для обсуждения на Огарёвских чтениях в Мордовском государственном университете им. Н. П. Огарёва (Саранск, 2012–2013); на конференции «Актуальные проблемы фундаментальных и прикладных наук» (Саранск, 2012); на конференции БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI века: 16-я международная Пушинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 16-21 апреля 2012); на международной научной конференции «Достижения и перспективы развития биотехнологии» (Саранск, 3-5 октября 2012г.); на XXI Пушинских чтениях по фотосинтезу и Всероссийской конференции «Фотосинтез и фотобиотехнология. Фундаментальные и прикладные аспекты» (Пушино, 2015); Всероссийской конференции с международным участием «Перспективы развития химических и биологических технологий в 21-м веке» (Саранск, 2015), международной конференции Biophysics, Biophotonics and Biotechnology (Москва, 2016).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 работ, в числе которых 4 статьи в российских научных журналах, рекомендованных ВАК, 2 статьи индексируемые в базах данных Web of Science и Scopus.

Положения, выносимые на защиту:

1. У мутанта *ΔPSII* содержание каротиноидов увеличено и молекулы в клетке распределены более равномерно, чем в диком типе;

2 В фотосинтетических системах мутанта *ΔOCP* и дикого типа обнаружены изменения конформации каротиноидов и хлорофилла: у хлорофилла возрастает время пребывания в возбужденном состоянии, а у каротиноидов увеличивается степень делокализации π-электронов;

3. Изменение жирнокислотного состава липидов мембраны, вызванное активацией фермента десатуразы ЖК у дикого типа цианобактерий приводит к делокализации π-электрона в полиеновой цепочке каротиноидов как в фотосинтетических системах, так и в мембране;

4. В клетках листьев растений функционирование фотосистем зависит от вязкости тилакоидной мембраны, что важно для адаптации растения к действию температур;

5. У генетически модифицированных гибридов и линий пигменты ФС1 и 2 отличаются по составу и конформации: у гибридов меняется конформация каротиноидов и не меняется состав ССК, а у линий меняется состав ССК.

Личный вклад автора заключается в поиске и анализе научной литературы по теме работы, участии в планировании и постановке конкретных задач диссертации на всех этапах её выполнения, осуществлении экспериментальной части исследования, в обсуждении результатов, подготовке публикаций и докладов.

Структура и объем диссертации. Материалы диссертации изложены на 153 страницах машинописного текста. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы. Диссертационная работа включает 76 рисунков и 11 таблиц. Список цитируемой литературы включает 160 источников, в том числе 140 на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ВВЕДЕНИЕ

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая ценность полученных результатов.

Глава 1. Обзор литературы

Глава состоит из двух разделов и анализирует данные литературы по биохимии природных пигментов – хлорофиллов и каротиноидов, и биофизики процессов миграции энергии с одного пигмента на другой. В первом разделе представлена

общая характеристика хлорофиллов, и их химическое строение распределение этих пигментов и выполняемые ими функции. Далее анализируются данные оригинальных исследований, свидетельствующих о важной роли молекул каротиноидов как компонента структуры ФСА, так и липидных мембран фотосинтетических организмов. В главе «Общая характеристика каротиноидов как структурных компонентов фотосинтетического аппарата и липидных мембран фотосинтетических организмов» подробно изложено химическое строение, локализация, охарактеризовано большинство выполняемых функций этих пигментов. Рассмотрена роль липид-белковых и липид-липидных взаимодействий в эффективной работе фотосинтетического аппарата. В разделе «Светосбор и передача энергии возбуждения в фотосинтетических комплексах» подробно раскрыты пути транспорта энергии через энергетические состояния каротиноидов и хлорофиллов, механизмы тушения триплетных форм хлорофилла и АФК, а также рассмотрена проблема сбора световой энергии и участия каротиноидов в тушении синглетного состояния хлорофилла.

Глава 2 Объект и методы исследования

Объекты исследования

В работе использовались цианобактерии штамма *Synechocystis sp. PCC 6803* и ее мутанты ($\Delta PSI/\Delta PSII$, $\Delta PSII$, ΔOCP и $desA^-/desD^-$), а также растения гибридов и инбредных линий кукурузы (*Zea máys L.*) и листья пшеницы (*Triticum aestivum L.*).

Клетки дикого типа *Synechocystis sp. PCC 6803*, и мутант ΔOCP были выращены в модифицированной среде BG-11 при 33°C, при освещении белого света (40 мкЭ м⁻² с⁻¹). Мутант $\Delta PSI/\Delta PSII$, лишенный ФС1 и ФС2, выращен в среде BG-11, содержащей глюкозу (10 мМ), стрептомицин (25 мкг/мл), эритромицин (20 мкг/мл) и хлорамфеникол (20 мкг/мл) при освещенности 5 мкЭ м⁻² с⁻¹. Мутант $\Delta PSII$ был выращен в среде BG-11 в присутствии 10 мМоль глюкозы, 25 мг/мл стрептомицина, 25 мг/мл эритромицина при освещенности 5 мкЭ м⁻² с⁻¹.

Водоросль *Cladophora rivularis* культивировалась в течение 7 дней при комнатной температуре (25°C) на среде Чу-10 (г/л): Ca(NO₃)₂-0,04; MgSO₄*7H₂O-0,025; KH₂PO₄ – 0,01; Na₂CO₃ – 0,02; Na₂SiO₃*9H₂O – 0,025; FeCl₃*6H₂O – 0,0008.

Гибриды (*ZP505*, *ZP341*, *ZP341*) и инбредные линии кукурузы *Zea máys L.* (*M 1-3-SdMS*, *ZPPL225*, *ZPPL186*), предоставлены Институтом Кукурузы («Земун поле», г. Белград, Сербия). Семена проращивали и высаживали в количестве 10 штук и выращивались до фазы 3-го настоящего листа (14-й день), в условиях 16 часового светового периода при относительной влажности 75%. Инбредные линии *ZPPL 16*, *ZPPL 218* и *ZPPL 62* кукурузы были выращены в полевых условиях.

Пшеница *Triticum aestivum L.* (сорта Эскада 70 и Прохоровка) была выращена при 20°C, относительной влажности 60% с 16-ти часовым световым периодом. Образцы растений выращивались до фазы третьего настоящего листа (20-й день). После достижения нужной фазы роста начинали проводить эксперимент.

Методы исследования

В работе использовали современные методы исследования молекулярной организации пигментов.

Спектры поглощения в области от 400 – 800 нм регистрировали с помощью спектрофотометров Ocean Optics (США) и UVmini 1240 (Shimadzu, Япония).

Спектры резонансного комбинационного рассеяния света (РКР) регистрировались на установках inVia Microscope (Renishaw, UK) с лазером 532 нм, и системы регистрации МОРС 1/3648 (Троицк, Россия), сконструированной на базе линейной ПЗС TCD1304DG (Toshiba, Япония). Кювету с образцом устанавливали на специальной подставке, таким образом, чтобы источник света падал на образец под углом 60 градусов. Отраженный свет лазера отсекался при помощи фильтра LPO2-473RS-50 (Shemrock, Россия). Для записи спектров на ПК использовалось программное обеспечение МОРС (Троицк, Россия) (кафедра биофизики, биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва).

Мгновенные спектры флуоресценции с пикосекундным временным разрешением регистрировали с помощью комплекса на базе системы однофотонного счета Simple Tau 140 (Becker & Hickl, Germany). Для анализа кинетики затухания флуоресценции использовали двухэкспоненциальные модели (Максимов Е.Г., 2011).

Индукционные кривые замедленной флуоресценции хлорофилла регистрировали с помощью фосфороскопа, который представляет собой систему из трех коаксиальных цилиндров. Свет от источника (светодиод) попадал на объект, а флуоресценцию регистрировали с помощью ФЭУ (Институт кукурузы «Земун поле», г. Белград, Сербия).

Флуоресцентные изображения от объекта получали при помощи флуориметра XFO-12, используя программу Living Image на базе установки системы визуализации IVIS Lumina II (Caliper, U.S.A.).

Спектры ЭПР регистрировали с помощью установки MMS ESR – Analysator (Medinnovation, GmbH) в специализированной к прибору программе MMS Analyzer.

Инфракрасные (ИК) спектры регистрировали с помощью ИК-спектрометра с Фурье-преобразователем фирмы Shimadzu – IR-Prestige 21 в диапазоне от 400 до 4000 см⁻¹.

Результаты обрабатывали статистически с использованием электронных таблиц Microsoft Excel 2013, Statistica 8 и OriginPro 8.1. Сравнение вариантов опытов проводили при 5% уровне значимости по t-критерию Стьюдента. В работе представлены средние значения из всех опытов со стандартными ошибками.

Глава 3 Результаты и их обсуждение

3.1. Изучение молекулярных характеристик каротиноидов в клетках мутантов цианобактерии *Synechocystis PCC6803*

3.1.1 Изучение конформации каротиноидов клеток цианобактерий *Synechocystis sp. PCC6803* и её мутанта без ФС2 (*ΔPSII*)

В данной серии экспериментов исследовали спектральные характеристики цианобактерии *Synechocystis sp. PCC6803* дикого типа (*WT*) и её мутанта без ФС2

($\Delta PSII$). Установлено, что величина поглощения в спектральной области 420-530 нм (каротиноиды) на 14% больше, а в области 670-695 нм (хлорофилл *a*) снижено на 38% у мутанта $\Delta PSII$ по сравнению с диким типом (Рис. 1А). Наши результаты подтверждаются результатами (Rakhimberdieva M.G., *et al.*, 2010), согласно которым содержание хлорофилла *a* в мутанте $\Delta PSII$ снижено в сравнении с диким типом. По-видимому, увеличение поглощения света связано либо с изменением концентрации каротиноидов либо с распределением их в клетке (Рис.2).

Далее исследовали конформации молекул каротиноидов и их распределение по клеткам дикого типа и мутантов с помощью микро-РКР спектроскопии. В спектрах РКР образцов были выявлены полосы, характеризующие колебания некоторых связей каротиноидов (Рис.1Б): так, амплитуда полосы ~ 1520 см^{-1} пропорциональна интенсивности валентных колебаний двойных -C=C- связей молекулы каротиноида; амплитуда полосы ~ 1156 см^{-1} пропорциональна интенсивности валентных колебаний одиночных =C-C= связей сочетания с -C=C- валентными колебаниями; амплитуда полоса ~ 1004 см^{-1} пропорциональна интенсивности валентных колебаний боковой метильной группы C-CH_3 . Амплитуда полосы ~ 960 см^{-1} спектра РКР пропорциональна интенсивности внеплоскостных валентных колебаний C-H около C=C связи, причем увеличение интенсивности данной полосы наблюдается при нарушении плоской конформации молекулы каротиноида (Alexandre M.T.A. *et al.*, 2014).

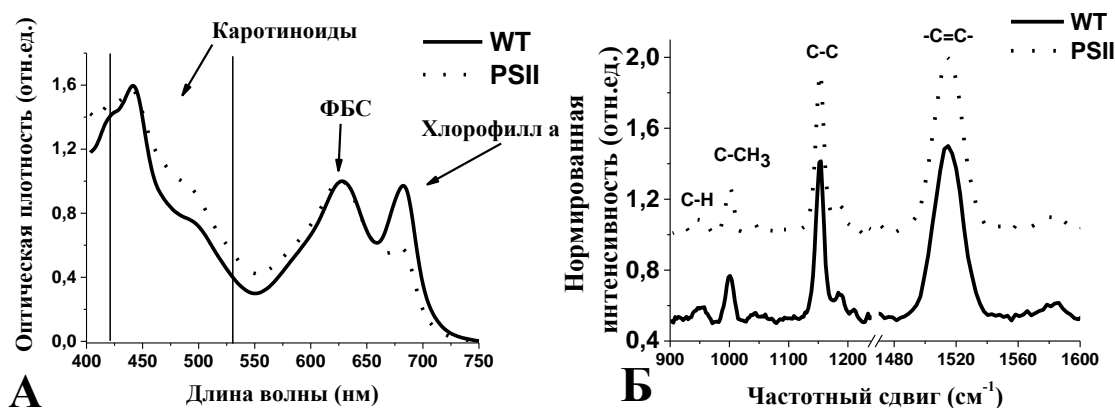


Рисунок 1. (А). Спектры поглощения дикого типа (*WT*) и мутанта без ФС2 ($\Delta PSII$); Стрелкой на рисунке показаны области поглощения каротиноидов фикобилисом (ФБС) и хлорофилла *a*. Спектры снормированы на значение оптической плотности фикобилисом. (Б) Спектр РКР каротиноидов мутанта $\Delta PSII$ и дикого типа цианобактерии *Synechocystis sp. PCC6803*.

Установлено, что у дикого типа максимальный РКР сигнал от каротиноидов сосредоточен локально, в то время как у мутанта распределен равномерно по всей клетке (Рис. 2, Табл.1), вероятно, это связано с накоплением вторичных каротиноидов в цитоплазме клетки виде жировых капель и/или этерифицированном

состоянии с жирными кислотами (Соловченко А.Е. и др., 2014). В ходе исследования не было выявлено достоверных изменений в системе сопряженных двойных связей молекул каротиноидов (соотношение интенсивности полос РКР-спектра I_{1520}/I_{1160}), а также изменений количества связанного пигмента с белком (I_{960}/I_{1004}), выраженности валентных колебаний метильных группировок у дикого типа и мутанта (I_{1004}/I_{1160} , I_{1004}/I_{1520}) во всех областях клетки (Рис.3).

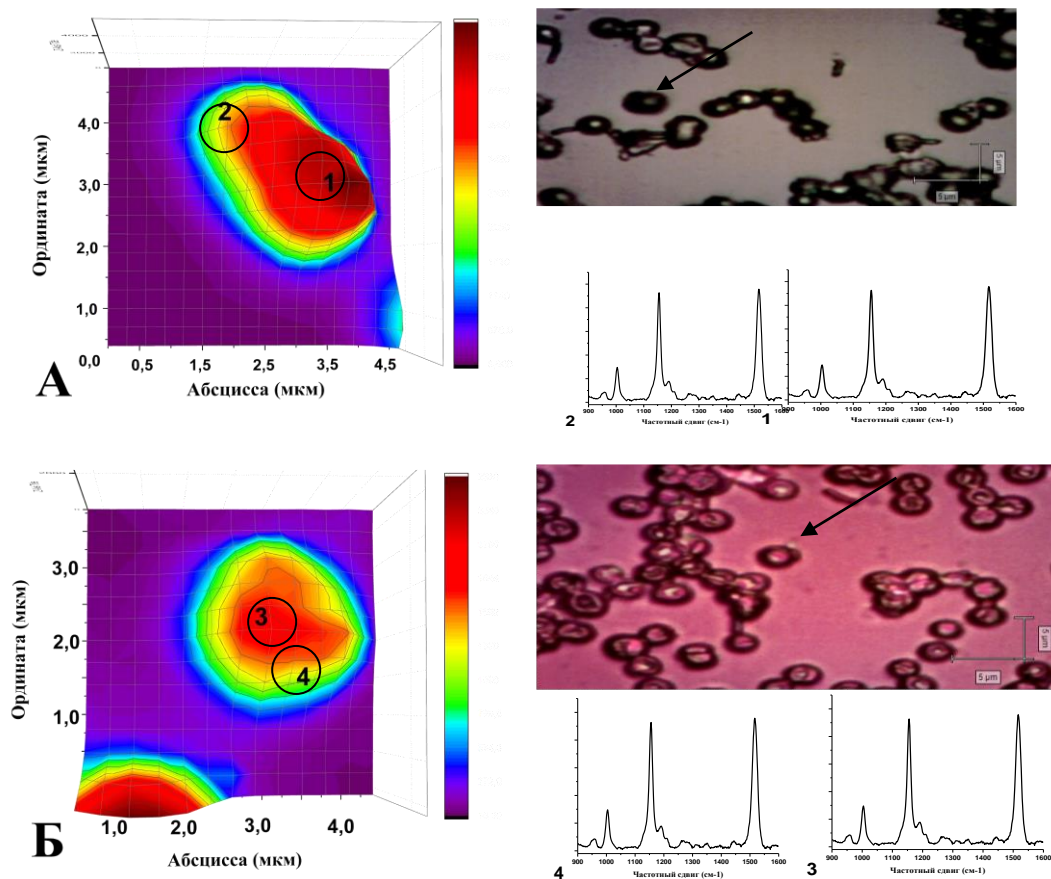


Рисунок 2. Распределение интенсивности амплитуды полосы 1520 см^{-1} РКР-спектра каротиноидов клеток дикого типа (А) и мутанта (Б) *Synechocystis sp PCC6803*: Разрешение пикселя – 300 нм; микрофотографии картируемых клеток. Цифрами обозначены области регистрации спектров РКР.

Таблица 1. Соотношения амплитуд характерных полос спектров РКР каротиноидов в разных областях клетки дикого типа (WT) и мутанта ($\Delta PSII$) (* $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

Амплитуда полос спектра РКР	Область 1	Область 2	Область 3	Область 4
	Отн.ед.			
1520 см^{-1}	5134 ± 462	$2554 \pm 281^*$	2234 ± 268	$1390 \pm 111^*$
1	2	3	4	5

1	2	3	4	5
1160 cm^{-1}	4667±420	2432±268*	2068±248	1241±99*
1004 cm^{-1}	1820±164	826±91*	930±112	596±48*
960 cm^{-1}	782±70	322±35*	363±44	262±21*
Соотношение полос спектра РКР	Отн.ед.			
1520/1160	1,11±0,04	1,05±0,05	1,08±0,03	1,12±0,04
960/1004	0,43±0,03	0,39±0,02	0,39±0,02	0,44±0,02
1004/1160	0,39±0,06	0,34±0,02	0,45±0,15	0,48±0,13
1004/1520	0,28±0,02	0,30±0,02	0,30±0,01	0,29±0,02

Для детализации данных полученных с помощью РКР, в следующей серии экспериментов регистрировали ИК спектры цианобактерии *Synechocystis sp. PCC6803* дикого типа (WT) и мутанта ($\Delta PSII$). В ИК-спектрах цианобактерий были обнаружены полосы, которые свидетельствуют о вкладе валентных колебаний ОН-групп воды (около 3600 cm^{-1}), валентных колебаний $-\text{CH}_2-$ группы углеводов (в районе 2780-2900 cm^{-1}), деформационных колебаний связей $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}-\text{N}$ амида I или ОН-групп структурированной воды (Тарасевич Б.Н., 2012).

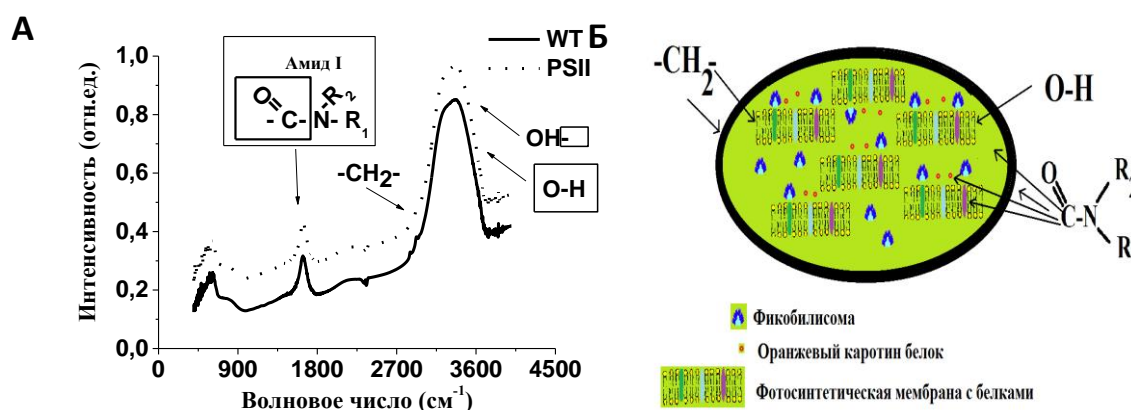


Рисунок 3 Инфракрасные спектры цианобактерий *Synechocystis sp. PCC 6803* дикого типа и мутанта без ФС2 (А) и схема возможной локализации веществ с зарегистрированными молекулярными связями в клетке цианобактерии (Б).

Известно, что некоторые каротиноиды (зеаксантин, 3-гидроксиэхиненон и др.) имеют в своем составе ОН-группы и вероятно содержание той фракции О-Н-содержащих каротиноидов (имеющих водородные связи с кислородом) остается постоянным как у дикого типа, так и у мутанта (3600 cm^{-1}), также как и постоянным остается и общее содержание белков (~1640 cm^{-1}). Вероятно, увеличение коэффициента поглощения света у мутанта $\Delta PSII$ в области спектра 420-530нм (поглощение каротиноидов) на фоне постоянной концентрации белка или содержания воды (ИК-спектры) не связано с перераспределением или изменением

конформации пигмента, а обусловлена большим содержанием каротиноидов в клетке.

Итак, в мутанте $\Delta PSII$ содержится больше каротиноидов и они, распределены более равномерно по всей клетке, чем в диком типе, что вероятно, обусловлено накоплением вторичных каротиноидов внутри пластоглобул и/или жировых капель. Полученные данные согласуются с тем, что в клетках мутанта в большей степени интенсифицированы свободнорадикальные процессы, за счет окисления органического субстрата (процессов дыхания) (Mullineaux C.W., 1986, 1990) с целью поддержания нециклического транспорта электронов и изменение содержания каротиноидов регулирует данный процесс.

3.1.2 Изучение конформации каротиноидов и времени жизни флуоресценции хлорофилла у мутантов ΔOCP , $\Delta PSI/\Delta PSII$ и дикого типа цианобактерий *Synechocystis sp. PCC6803*

С помощью пикосекундной флуориметрии и РКР были изучены штаммы цианобактерий дикого типа *Synechocystis sp PCC6803* и ее мутанты дефектные по ФС1 и ФС2 ($\Delta PSI/\Delta PSII$) и по оранжевому каротин-белку (ОКБ) – ΔOCP (Orange carotene protein).

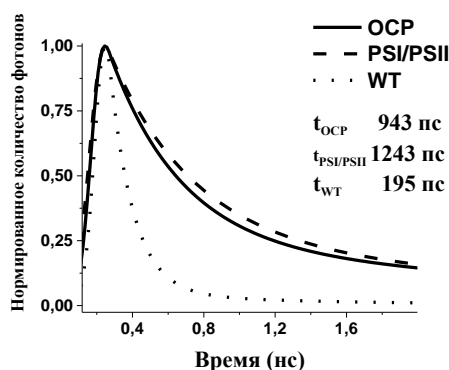


Рисунок 4. Время жизни флуоресценции хлорофилла дикого типа (WT) и его мутанта лишённого ОКБ (ΔOCP) зарегистрированные при длине волны 680нм, и флуоресценции ФБС ФС1 и ФС2 ($\Delta PSI/\Delta PSII$), зарегистрированные при 660 нм.

Установлено, что у цианобактерий дикого типа время жизни флуоресценции существенно меньше, чем у мутантов (Рис 4). Вероятно, у дикого типа, энергия квантов света, поглощенных ФБС быстро излучается в виде тепла и на фотохимические процессы (менее 200 пс). У мутанта ΔOCP время жизни флуоресценции хлорофилла в 4,8 раза превышает время жизни флуоресценции дикого типа, что связано с отсутствием белка *OCP*, который является одним из путей дезактивации энергии квантов света (Kirilovsky D. *et al.*, 2012, Maksimov E.G. *et al.*, 2015). У ΔOCP мутанта присутствует только фотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла, (среднее время жизни флуоресценции составило 943 пс). Анализ кинетики затухания флуоресценции мутантов $\Delta PSI/\Delta PSII$ в сравнении с диким типом свидетельствует о том, что данные фотосинтетические системы

обладают наибольшим временем жизни – (1,2 нс), что обусловлено отсутствием фотохимического тушения флуоресценции (Рис. 4).

Итак, максимально эффективное тушение флуоресценции имеет место в присутствии всех пигмент-белковых комплексов, которые составляют фото- и нефотохимическое тушение флуоресценции в ФСА; фотохимическое тушение флуоресценции протекает с большей эффективностью, чем нефотохимическое.

В связи с тем, что мутанты и дикий тип отличаются по наличию структурных компонентов ФСА, содержащих разные каротиноиды, важно было установить, связаны ли процессы изменения конформации каротиноидов, и изменения среднего времени жизни флуоресценции хлорофилла (Рис. 5, А и Б).

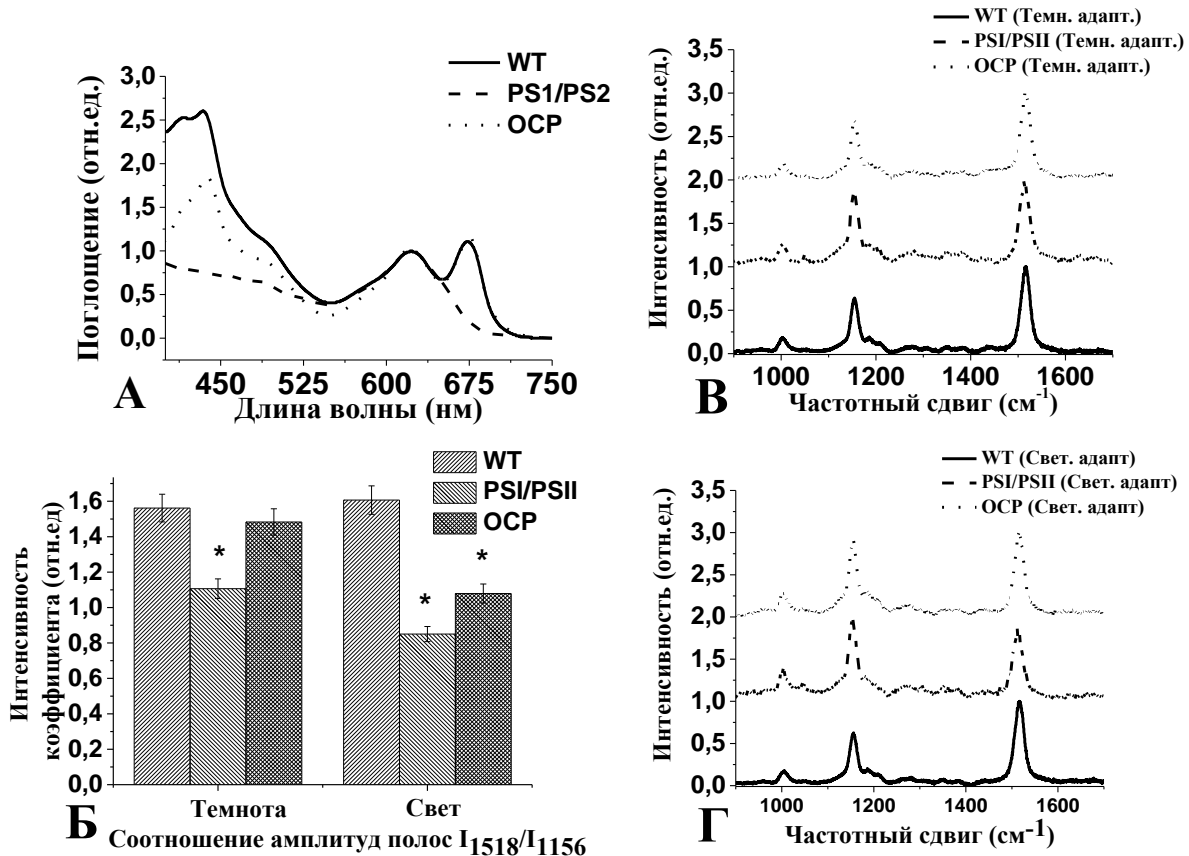


Рисунок 5 (А) Спектры поглощения дикого типа (*WT*) и мутантов, лишенных ФС1 и ФС2 (Δ *PSI*/ Δ *PSII*) и лишенного каротин-белка (Δ *OCP*), нормированных на максимум поглощения ФСБ (630 нм); (Б) соотношение амплитуды полос 1518см⁻¹ и 1156см⁻¹ спектра РКР каротиноидов у дикого типа (*WT*) и мутантов (Δ *OCP*) и (Δ *PSI*/ Δ *PSII*) при адаптации к свету высокой интенсивности; спектры РКР дикого типа и мутантов Δ *PSI*/ Δ *PSII*, Δ *OCP* адаптированных к темноте (В) и к свету (Г) (**p*<0,05 по t-критерию Стьюдента).

Установлено, что интенсивность поглощения в области 420-530 нм (каротиноиды) снижается на 56,0% и на 27,1% для мутантов Δ *PSI*/ Δ *PSII* и Δ *OCP* соответственно. Данный факт объясняется тем, что у данных мутантов содержание каротиноидов снижено. Показано, что при адаптации мутантов и дикого типа к свету высокой интенсивности в течение 20 минут (около 1200 Лк) наблюдаются

конформационные изменения в молекулах, что проявляется в уменьшении соотношения амплитуд полос I_{1518}/I_{1160} спектра РКР на 32,5% и 47,5% соответственно. Отметим, что у дикого типа подобных изменений нами не было обнаружено. Поскольку, у мутанта $\Delta PSI/\Delta PSII$ отсутствуют каротиноид-белковые комплексы – ФС1 и ФС2, а у мутанта ΔOCP отсутствует ОКБ, то соотношение полос I_{1518}/I_{1160} снижается, что обусловлено снижением степени делокализации π -электронов в молекулах каротиноидов, находящихся в ФС и/или мембранах. Вероятно, данные мутанты лишены белков, с которыми связаны каротиноиды (в случае мутанта $\Delta PSI/\Delta PSII$ это ФС1 и ФС2, а в случае мутанта ΔOCP – ОКР).

Итак, на диком типе и мутантах $\Delta PSI/\Delta PSII$, ΔOCP цианобактерий *Synechocystis sp. PCC6803*, установлено, что с увеличением времени жизни флуоресценции хлорофилла, уменьшается степень делокализации π -электронов каротиноидов.

3.1.3 Изучение действия температуры на конформацию каротиноидов при изменении насыщенности жирных кислот фотосинтетических мембран цианобактерий *Synechocystis sp. PCC6803*

Известно, что как показатели флуоресценции хлорофилла, так и конформация каротиноидов зависят от температуры (Rowland J.G. *et al.*, 2010., Andreeva A. *et al.*, 2011) за счет изменения состояния липидов мембраны (Sheng J. *et al.*, 2011., Mironov K.S., *et al.*, 2012). В данной серии экспериментов исследовали изменения спектров РКР штаммов дикого типа цианобактерий *Synechocystis sp. PCC6803* и мутанта с дефицитом десатураз жирных кислот *A/D* ($desA^-/desD^-$), культивируемых при температурах 33°C и 25°C (Рис.6).

Установлено, что в норме (при 33°C) у дикого типа и мутанта *A/D*, структура спектров РКР и конформация каротиноидов не изменяется, но при низкой температуре (при 25°C) выявлены характерные изменения в спектре РКР каротиноидов дикого типа цианобактерий: интенсивность амплитуды и полуширина полосы 1527cm^{-1} уменьшается и полоса смещается в сторону более низких частот, что свидетельствует о увеличении степени делокализации π -электронов в молекулах каротиноидов.

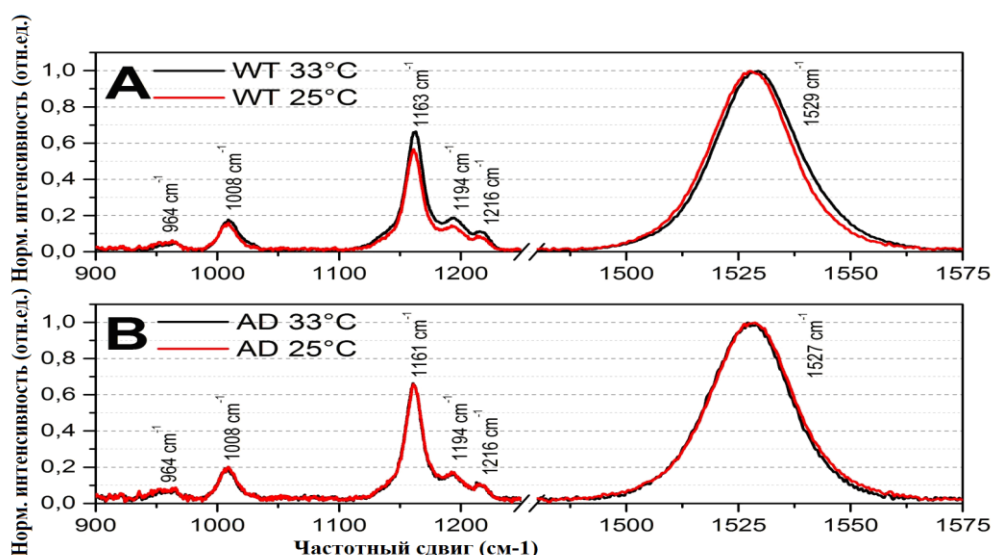


Рисунок 6 Спектры РКР каротиноидов дикого типа (*WT*) и мутанта (*AD*) цианобактерий *Synechocystis sp. PCC6803*, выращенных в условиях нормальных температур (33°C) и в условиях холодового шока (25°C).

Очевидно, что конформация каротиноидов в фотосистемах может зависеть от различий в распределении гидрофобных областей в белке. В связи с этим, с помощью спин меченых жирных кислот мы исследовали встраивание метки (16 доксилстеариновая кислота) в фотосинтетическую мембрану мутантов и дикого типа (Рис.7).

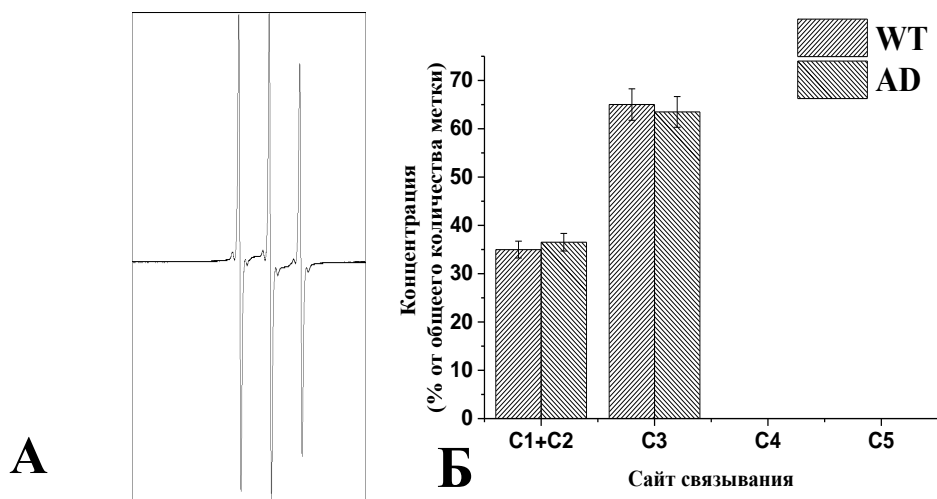


Рисунок 7. ЭПР спектр 16-доксил стеариновой кислоты инкубируемой вместе с фотосинтетической мембраной дикого типа (А) в концентрации 0,075 М (концентрация хлорофилла в образцах приведена к 1мг/мл); (Б) количество спин-метки, связавшейся с разной степенью аффинности с фотосинтетической мембраной.

В ходе проведенного эксперимента нами не выявлены изменения в связывании спин-метки в фотосинтетических мембранах мутанта, что

свидетельствует, вероятно, об отсутствии существенных различий в гидрофобных областях фотосинтетической мембраны (Рис. 7Б). Результаты исследования состояния фотосинтетических мембран при 33°C дикого типа и мутанта согласуются с результатами исследования: фотосинтетических мембран цианобактерий дикого типа с помощью РКР (при 33°C) (Рис.6). Установлено, что при низких температурах у дикого типа происходит увеличение вклада внеплоскостных колебаний С-Н, вероятно индуцируемых с увеличением количества связанного с белком каротиноидов, о чем свидетельствует увеличение соотношения полос I_{960}/I_{1008} на 28%. Отметим, что при адаптации к низким температурам культивирования у мутанта *A/D* не выявлено достоверных изменений конформации молекулы каротиноидов.

Отсутствие характерных изменений в спектрах РКР у мутантов дефектных по генам *desA*⁻/*desD*⁻ при культивации при низких температурах, свидетельствует о важной роли упаковки жирных кислот, позволяющих клеткам цианобактерий регулировать микровязкость мембран, состояние ПБК и эффективно адаптироваться к пониженным температурам.

3.2 Влияние экстраклеточного рН на конформацию каротиноидов в клетках водоросли *C. rivularis*

Известно, что внутриклеточный рН за счет протонной АТФазы может влиять на перенос электронов и функционирование пигментов в хлоропластах (Gilmore A.M. *et al.*, 1992). В следующей серии экспериментов с помощью абсорбционной и РКР- спектроскопии исследовали изменения содержания и конформации молекулы каротиноидов водоросли *C. rivularis* при культивировании в средах с различным рН (Рис.8). Смещение экстраклеточного рН приводит к изменению внутриклеточного состояния пигментов хлоропласта (Jahns P. *et al.*, 2011). Это может повлиять эффективность линейного транспорта электронов по Z-схеме.

Установлено, что в зависимости от рН среды культивирования водоросли меняется не только содержание, но и конформация каротиноидов (Рис.8): максимальный вклад полосы 1526см^{-1} наблюдается при рН 7 (исходя из соотношений амплитуды полос I_{1526}/I_{1160} и I_{1526}/I_{1003}). Вероятно, при культивировании водоросли меняется либо состав каротиноидов, либо конформация молекулы: возрастает вклад молекул каротиноидов, имеющих большее количество двойных С=С связей (Pioia C. *et al.*, 2011) или микроокружение пигментов становится более плотным (Максимов Г.В. *и др.*, 1996). Максимальный вклад полосы 1160 см^{-1} (С-С связей, I_{1160}/I_{1003}) выявлен при нейтральных значениях рН.

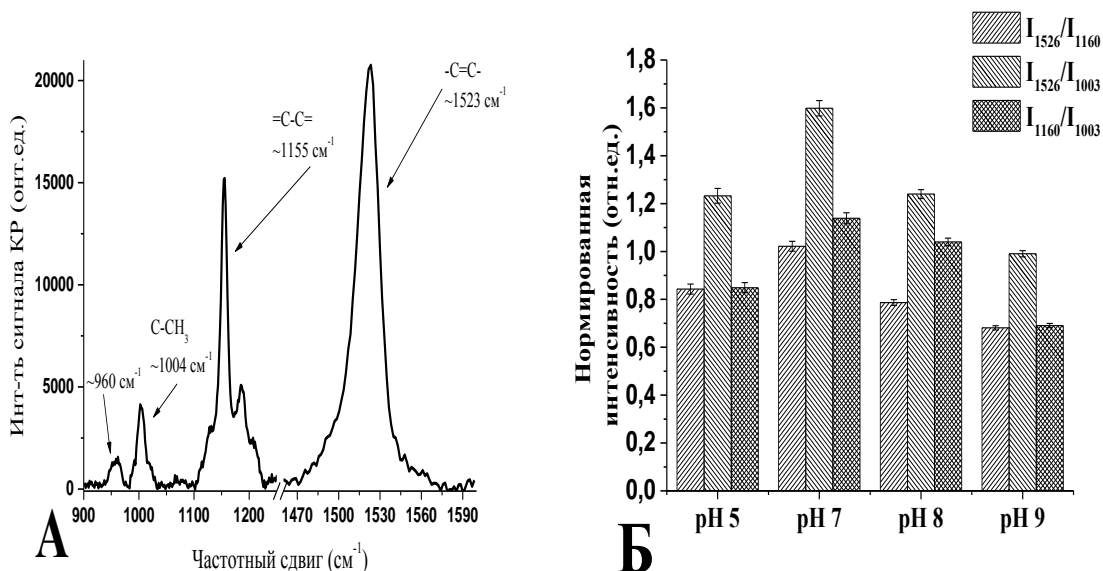


Рисунок 8. Спектр комбинационного рассеяния (А) и изменения соотношений амплитуд полос РКР- спектра каротиноидов (Б) при различном рН культивирования водоросли *C. rivularis*.

Вероятно, при нормальном функционировании водоросли (увеличении рН с 8,0 до 9,0) содержание каротиноидов увеличивается и меняется конформация молекулы: снижается вклад -C=C- связей полиеновой цепочки молекулы каротиноида. Вероятно, в клетках водоросли могут накапливаться либо вторичные каротиноиды, либо происходит их биосинтез *de novo*.

3.3 Изучение флуоресценции хлорофилла и физико-химических характеристик молекул каротиноидов в клетках высших растений

3.3.1 Исследование температурной зависимости флуоресценции хлорофилла в листьях инбредных линий кукурузы (*Zea máys L.*) и пшеницы (*Triticum aestivum L.*)

Выше мы отмечали, что физико-химические характеристики пигментов могут зависеть как от генетического профиля (наличие или отсутствия определенных генов), так и от действия температуры, (влияющей на состояние и вязкость мембранных липидов).

В данной серии экспериментов, проведенной в клетках тканей высших растений с различным генетическим аппаратом, мы исследовали зависимость между интенсивностью замедленной флуоресценции (ЗФ) хлорофилла и состоянием липидных мембран в клетках кукурузы инбредных линий *ZPPL 16*, *ZPPL 218* и *ZPPL 62*. Установлено, что температурная зависимость интенсивности ЗФ не монотонна (Рис 9) и имеет характерный максимум (критическая температура) для каждого гибрида: критической для *ZPPL 62* является температура в 47°C, что значительно ниже, чем соответствующий максимум *ZPPL 16* при 52°C.

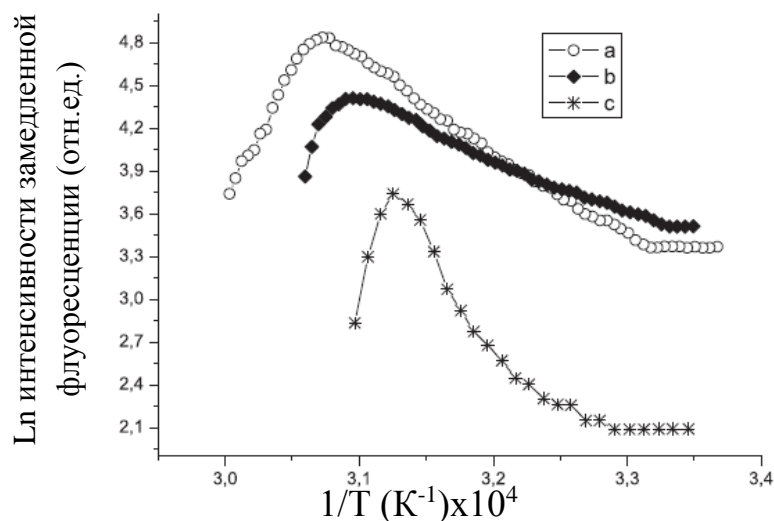


Рисунок 9. Температурная зависимость изменений интенсивности замедленной флуоресценции хлорофилла листа инбредных линий ZPPL 16 (a), ZPPL 218 (b), ZPPL 62 (c)

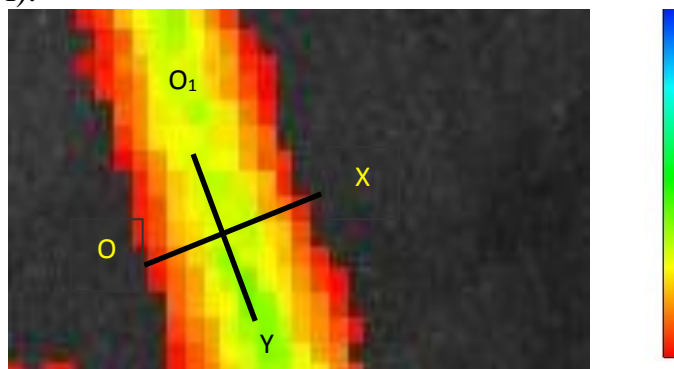
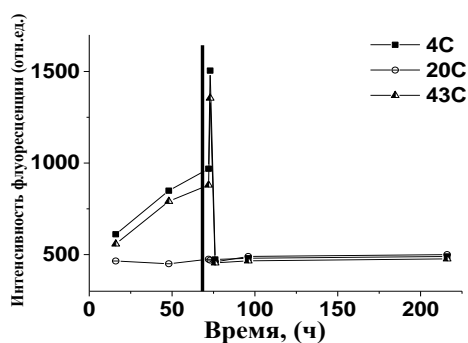
Известно, что величина ЗФ коррелирует с изменениями электрического и трансмембранного градиента протонов (Wraight, C.A. *et al.*, 1971), и зависит от наличия электронных акцепторов (Rubin A.V. *et al.*, 1988) и доноров (Mar T. *et al.*, 1975), а также влияет на состояние кислород-выделяющего-комплекса (Zankel K.L., 1972). Вероятно, выявленные изменения ЗФ обусловлены фазовым переходом тилакоидных мембранных липидов (Navaux M. *et al.*, 1983) и молекулы хинонов становятся более реактивными, в результате чего полученная ими дополнительная энергия (E_a) используется для преодоления энергетического барьера в реакции рекомбинации зарядов $\text{Pheo}^+ \leftarrow Q_a^-$ что проявляется в процессе возникновения ЗФ.

Итак, для инбредных линий чувствительных к холоду (ZPPL 16, ZPPL 218 и ZPPL 62) максимальный уровень ЗФ обнаружен при температуре, фазового перехода, а изменения ЗФ в естественных условиях может быть быстрым и чувствительным тестом фазовых переходов мембранных липидов (Ono T., Murata N., 1982).

Ранее мы отмечали (Рис.2), что процессы поглощения света могут зависеть от распределения пигментов в клетке цианобактерии. В следующей серии экспериментов были проведены аналогичные исследования на листьях высших растений с помощью разработанного нами метода исследования стационарной флуоресценции листа. Исследование было проведено на двух сортах пшеницы («Эскада 70» и «Прохоровка») при различных температурах культивирования растения. Растения выращивались до фазы третьего настоящего листа при 20°C. Затем первую группу растений культивировали в течении 16 часов при температуре 4°C, вторую группу при 43°C, относительной влажности 60%. Затем обе группы растений перемещались в нормальные условия (20°C) на 8 часов. В описанные выше условия растения помещались в течение трех дней.

В данной серии экспериментов исследовали не только изменения интенсивности флуоресценции хлорофилла, но и её распределение по поверхности листа. Установлено, что уровень стационарной флуоресценции листа для всех

сортов увеличивается с первого по третий день культивирования как при высокой, так и при низкой температуре (Рис. 11А).



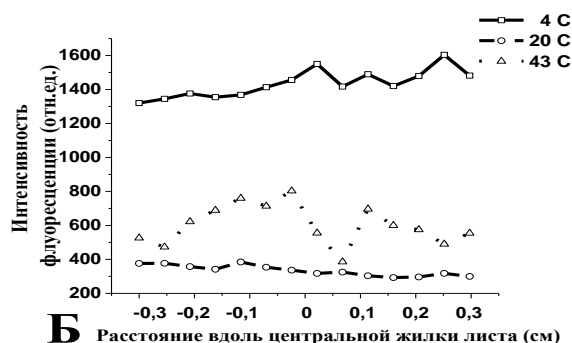
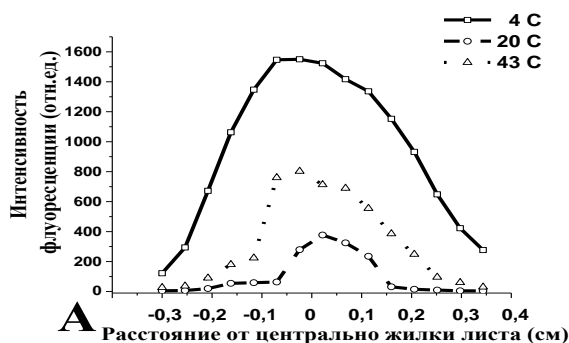
А

Б

В

Рисунок 11– Кинетика изменения флуоресценции хлорофилла пшеницы сорта Эскада 70 (А). Вертикальной линией указано окончание воздействия температурного фактора; фрагмент флуоресцирующей пшеницы (Б); Шкала интенсивности флуоресценции хлорофилла (В).

Установлено, что амплитуда интенсивности флуоресценции хлорофилла листа пшеницы увеличивается по мере приближения к центру листа, но не меняется вдоль центра листа (рис. 12А и Б).



А

Б

Рисунок 12 Изменение интенсивности ФХ листа поперек (А) и вдоль (Б) листа при различных температурах, выращивания растения

Анализ данных по распределению интенсивности флуоресценции хлорофилла при изменении температуры выращивания растений свидетельствуют о наличии характерной зависимости пространственной локализации процессов в листе: при сканировании вдоль оси ОХ наблюдается увеличение поверхности флуоресцирующего листа, что не выявлено при сканировании вдоль оси O_1Y (Рис. 12Б). Это, вероятно, объясняется отделением ССК от РЦ на площади листа с увеличенной флуоресценцией

Итак, на листьях пшеницы двух сортов было показано, что действие температуры приводит к увеличению доли ССК отделенных от РЦ, о чем свидетельствует изменение распределения флуоресценции хлорофилла поперек центра листа.

3.3.2 Исследование изменения содержания и конформации каротиноидов в клетках листьев инбредных линий и гибридов кукурузы (*Zéa máys L.*)

В данной серии экспериментов исследовали конформацию каротиноидов и содержание пигментов в зависимости от генотипа растения в листьях гибридов и инбредных линий кукурузы (*Zéa máys L.*). В ходе проведенного исследования установлено, что максимальное количество хлорофилла в листьях инбредных линий кукурузы (2,73 мг/г сырой ткани) содержится у линии *ZPPL186*, а содержание каротиноидов у всех инбредных линий примерно одинаковое (~0,40 мг/г сырой ткани) (Табл.2).

Таблица 2 Соотношение амплитуд полос в спектрах РКР каротиноидов и концентрации пигментов в листьях инбредных линий и гибридов кукурузы

Соотношение Полос	Инбредные линии кукурузы			Гибриды кукурузы		
	<i>M1-3-3Sdms</i>	<i>ZPPL186</i>	<i>ZPPL225</i>	<i>ZP434</i>	<i>ZP505</i>	<i>ZP341</i>
960/1004	0,34±0,02	0,35±0,02	0,37±0,02	0,47±0,02	0,35±0,02	0,40±0,02
1004/1153	0,11±0,01	0,11±0,01	0,13±0,02	0,16±0,01	0,12±0,01	0,24±0,01
1004/1520	0,28±0,01	0,27±0,01	0,30±0,02	0,28±0,01	0,29±0,01	0,19±0,01
1520/1153	1,18±0,06	1,20±0,06	1,22±0,06	1,18±0,06	1,21±0,06	1,24±0,06
Концентрация пигментов	мг/г сырой ткани			мг/г сырой ткани		
Хл а+б	2,35±0,12	2,04±0,10	2,73±0,14	2,17±0,11	3,00±0,15	3,32±0,17
хл а	1,65±0,08	1,31±0,07	1,81±0,09	1,47±0,07	2,00±0,10	2,28±0,11
хл б	0,70±0,04	0,74±0,04	0,93±0,05	0,70±0,04	1,00±0,05	1,05±0,05
Кар	0,39±0,02	0,36±0,02	0,40±0,02	0,30±0,02	0,39±0,02	0,52±0,03
Соотношение пигментов	Отн. ед.			Отн. ед.		
хл а / хл б	2,31±0,12	1,93±0,10	2,06±0,10	2,06±0,14	2,05±0,10	2,16±0,11
хл а+б/кар	6,76±0,34	6,68±0,33	6,92±0,35	8,13±0,57	7,68±0,57	6,86±0,34

Соотношение содержания хлорофиллов *a* и *b* в листьях инбредных линий кукурузы изменялось от 1,93 (*ZPPL225*) до 2,31 (*M1-3-3Sdms*). Поскольку хлорофилл *a* является главным компонентом светособирающих комплексов, то факт увеличения этих соотношений может трактоваться как возрастание функциональной роли светособирающих комплексов обеих фотосистем. Достоверных изменений в соотношении хл (а+б)/кар не обнаружено (6,76—6,92), как и не выявлены существенные изменения конформации каротиноидов (валентных колебаний метильной группы (соотношения I_{1004}/I_{1153} , I_{1004}/I_{1520} , I_{1153}/I_{1190}) (Табл. 2)).

В следующей серии экспериментов исследовали изменения количественное содержание пигментов и соотношения содержания хлорофиллов в листьях гибридов (хл *a*/хл *b*) (Табл. 2), а также соотношение концентраций суммы хлорофиллов и каротиноидов (хл/каротиноиды). Установлено, что максимальное количество хлорофиллов содержится в листьях гибридов кукурузы *ZP505* и *ZP341* –

соответственно 3,00 и 3,32 мг/г сырой ткани, а наибольшее количество каротиноидов — в листьях гибрида ZP341 – 0,52 мг/г сырой ткани (Табл. 2).

В связи с тем, что соотношение хл а/хл b у разных гибридов не меняется, вероятно, изменения генома не затрагивают биосинтез хлорофиллов. Соотношение хл/кар у гибрида ZP341 близко к 6,7, у ZP 505 — 7,7. Данное соотношение возрастает на фоне снижения концентрации общего хлорофилла (по сравнению с максимальной концентрацией хлорофиллов у гибрида ZP341), при снижении содержания каротиноидов (по сравнению с максимальной концентрацией этого пигмента у гибрида ZP341). Однако анализ спектров РКР каротиноидов листьев гибридов кукурузы, позволил выявить существенные изменения в конформации молекулы каротиноидов: внеплоскостных колебаний С-Н (I_{960}/I_{1004}) и валентных колебаний метильной группы (Табл. 2), что особенно выражено у гибрида ZP 341 (соотношения I_{1004}/I_{1153} , I_{1004}/I_{1520}).

Итак, внутри гибридов выявлены изменения в конформации молекул каротиноидов, а в инбредных линиях – в составе ССК фотосистем 1 и 2.

Заключение

В ходе проведенного исследования показано, что содержание и распределение каротиноидов в клетках дикого типа и в клетках мутанта по ФС2 в цианобактерии *Synechocystis sp. PCC6803* различно (Рис.13). Доказано наличие связи между конформацией каротиноидов и некоторыми показателями флуоресценции хлорофилла, а именно на диком типе у мутантов $\Delta PSI/\Delta PSII$, ΔOCP цианобактерии *Synechocystis sp. PCC6803*: увеличение времени жизни флуоресценции хлорофилла, сопровождается уменьшением степени делокализации π -электронной системы каротиноидов. Также конформация каротиноидов в тилакоидных мембранах определяется температурой, и отсутствием фермента десатуразы. Действительно у дикого типа цианобактерий и мутанте $desA^- /desD^-$ в определении конформации каротиноидов существенное место имеет количество полиненасыщенных жирных кислот в мембране при воздействии низких температур. Важно, что наряду с генетически детерминированными, «медленными» факторами (отсутствия гена или селекции и др.) на конформацию каротиноидов в фотосинтетических мембранах влияют экстраклеточные факторы (экстраклеточный pH, температура) (рис. 13).

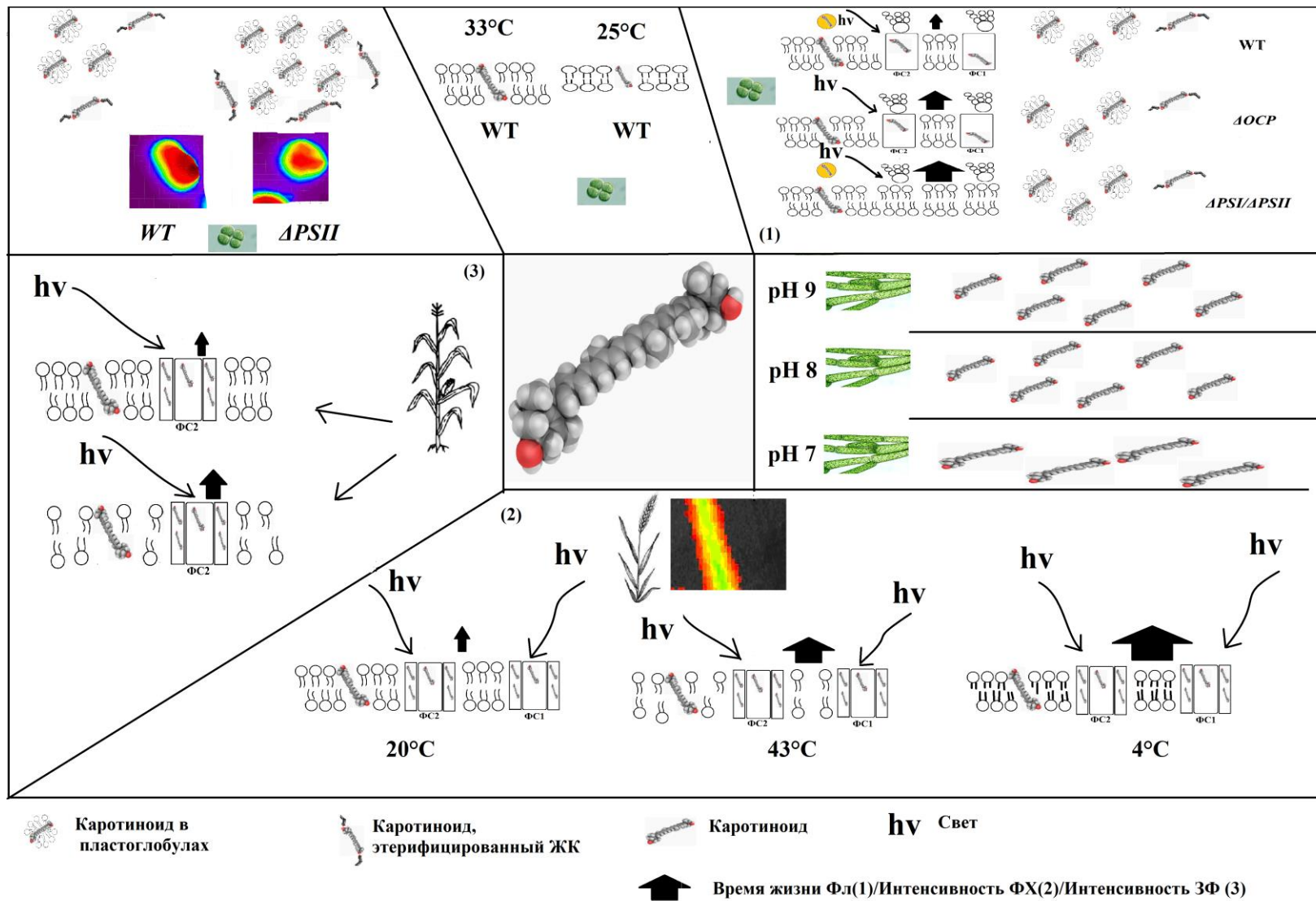


Рисунок 13 Взаимосвязь процессов протекающих в ФСА цианобактерий, водорослей и высших растений

ВЫВОДЫ:

1) Установлено, что в мутанте ΔPSI в сравнении с диким типом содержание каротиноидов увеличено по сравнению с диким типом, и они распределены более равномерно по всей клетке;

2) Доказано, что у дикого типа и мутантов $\Delta PSI/\Delta PSI$, ΔOCP цианобактерии *Synechocystis sp. PCC6803*, с увеличением среднего времени жизни флуоресценции наблюдается снижение степени делокализации π -электронов в молекулах каротиноидов;

3) Установлено, что у дикого типа цианобактерий, увеличение полиненасыщенных жирных кислот при температуре 25°C изменяет конформацию каротиноидов;

4) На водорослях *Cladophora* установлено, что при культивировании в условиях повышения экстраклеточного pH с 8,0 до 9,0 увеличивается количество и изменяется конформация каротиноидов;

5) Установлено, что внутри инбредных линий имеются различия в строении ССК фотосистем 1 и 2, а в гибридах присутствуют изменения в конформации молекул каротиноидов: изменяется вклад метильных групп в спектр РКР и интенсивность внеплоскостных валентных колебаний С-Н связи;

6) Установлено, что интенсивность ЗФ листа кукурузы коррелирует с фазовым переходом липидов тилакоидных мембран, а увеличение температуры приводит к увеличению интенсивности и изменению распределения флуоресценции хлорофилла относительно центра листа пшеницы.

7) Предполагается, что флуоресценция хлорофилла регулируется каротиноидами локализованными в фотосистемах и тилакоидных мембранах в клетке (листе), действия внешних факторов (pH, температура) и генетическим статусом растения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах и журналах, рекомендованных ВАК РФ:

1. Maksimov G.V. Investigation of Fluorescence Intensity and Distribution of Wheat Leaf on Exposure to Temperature/ G. V. Maksimov, **E.V. Tyutyayev**, T.S. Kolmykova [et al.] // Moscow University Biological Sciences Bulletin. – 2014. – Vol. 69 – No. 1. – P. 6–9. (ВАК, Scopus)

2. Максимов Г.В. Метод инфракрасной спектроскопии в молекулярной диагностике состояния семян чистых линий и гибридов кукурузы/ Г.В. Максимов, **Е.В. Тютяев**, И.В. Сюсин, [и др.]// Технологии живых систем. – 2014. - Т. 11.- № 2. - С. 60-62. (ВАК)

3. Radenovic C.N. Detecting the phase transition in thylakoid membranes of maize inbred lines by means of delayed fluorescence/ C.N. Radenovic, G.V. Maksimov, **E.V. Tyutyayev**, [et al.] // Plant Physiology and Biochemistry. – Vol.81. –2014. – P. 208-211. (ВАК, Web of Science, Scopus)

4. Раденович Ч.Н. Диагностирование конформационных и функциональных свойств зерна элитных инбредных линий кукурузы с помощью инфракрасных спектров/ Ч Н. Раденович, Г. В. Максимов, **Е.В. Тютяев**, [и др.] Селекция и семеноводство. – 2014. – Т. 20. – вып. 2 – P. 13-31.

5. **Тютяев Е.В.** Состояние фотосинтетических пигментов в листьях инбредных линий и гибридов кукурузы / Е.В. Тютяев, В.В. Шутова, Г.В. Максимов, [и др.] // Физиология растений и генетика. – 2015. – Т. 47. – № 2. – P. 147-159.

6. Radenovich C.N. Structural properties of maize hybrids established by infrared spectroscopy/ C.N. Radenovich, G.V. Maksimov, **E.V. Tyutyayev**, [et al.] //Matica Srpska J. Nat. Sci. Novi. Sad. – 2015. – №129. – P.35-44

7. Шутова В.В. ИК-спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния при исследовании каротиноидов водоросли *Cladophora rivularis* (Linnaeus) Hoek / В.В. Шутова, **Е.В. Тютяев**, А.А. Чурин, [и др.] // Биофизика. – 2016. – Т.61. – Вып.4. – С. 711-716. (ВАК, Web of Science, Scopus)

Публикации в сборниках научных и научно-практических конференций:

1. **Тютяев Е.В.** Исследование конформации каротиноидов штаммов *Synechocystis sp. PCC6803* и его мутантов, предварительно адаптированных к свету и темноте/ **Е.В. Тютяев**, Г.В. Максимов // Сборник трудов I студенческого научного форума с участием молодых исследователей «Актуальные проблемы фундаментальных и прикладных наук» / под редакцией Л.В. Матвеевой: Саранск. – Изд-во Морд-го ун-та. – 2012. – 228с

2. Е.Г. Максимов Исследование эффективности использования квантов света штаммами *SYNECHOCYSTIS SP. PCC6803* и его мутантов, методом пикосекундной флуориметрии / Е.Г. Максимов, **Е.В. Тютяев**, Г.В. Максимов // Генетико-биохимические аспекты современной биологии клетки: материалы международной научно-практической интернет-конференции 20 декабря 2011г / ред.коллегия : В.В. Ревин (отв. редактор) [и др.]: Саранск. – Изд-во Морд-го ун-та. – 2012. – 132с.

3. **Тютяев Е.В.** Исследование эффективности использования квантов света штаммами *Synechocystis sp. PCC6803* и его мутантов/ **Е.В. Тютяев**, Е.Г. Максимов, Г.В. Максимов // Биология – наука XXI века: материалы 16-ой международной Пущинской школы-конференции молодых ученых (Пущино 16-21 апреля 2012 года): Пущино, 2012. – С.485.

4. **Тютяев Е.В.** Зависимость распространения и состояния хлорофилла в листьях от сорта пшеницы / **Е.В. Тютяев**, В.В. Ревин. Г.В. Максимов // Достижения и перспективы развития биотехнологии: материалы международной научной конференции (Саранск МГУ им. Н.П. Огарёва, 3-5 октября 2012г.). – Саранск. – Типография ООО «Мордовия – Экспо». – 2012. – С.173.

5. **Тютяев Е.В.** Использование флуоресценции хлорофилла для диагностики физиологического состояния растения / Молодежь – развитию региона : сборник работ победителей всероссийского конкурса работ студентов и аспирантов/ **Е.В. Тютяев**, Г.В. Максимов // В.Д. Черкасов (отв. ред.) [и др.]: Саранск. – Изд-во Морд-го ун-та. – 2012. – С. 325-329.

6. **Тютяев Е.В.** Изменение состояния каротиноидов в клетках цианобактерий *Synechocystis sp. PCC6803* при холодовом стрессе/ **Е.В. Тютяев**, Е.Г. Максимов, Миронов К.С, [и др.]//«Фотосинтез и фотобиотехнология. Фундаментальные и прикладные аспекты». Сборник тезисов - Пущино, 2015. – С. 89.

7. **Тютяев Е.В.** Изучение молекулярного состояния и распределения каротиноидов в клетках цианобактерий *Synechocystis sp. PCC6803* в присутствии циклического транспорта электронов / **Тютяев Е.В.**, Максимов Г.В. // Перспективы развития химических и биологических технологий в 21-м веке: Материалы всеросс. Науч. Конф. с междунар. Участием (Саранск, МГУ им. Н.П. Огарёва, 23-25 сентября 2015 г.) – 2015. – С. 158-163.

8. **Тютяев Е.В.** Применение микрофлуориметрии и спектроскопии комбинационного рассеяния для исследования распределения и конформации пигментов в клетках водоросли рода *Cladophora* / **Е.В. Тютяев**, В.В. Шутова, А.А. Чурин [и др.] // Сборник «Перспективы развития современных математических и естественных наук» Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции: Воронеж, 2015. С. 59-65 (ВАК).

9. **Tyutyayev E.V** Carotenoids redistribution into a mutant cells Δ PS2 of cyanobacterium *Synechocystis PCC6803*/ **E.V Tyutyayev**, **E.G. Maksimov**, **I.V. Elanskaya** [et al.]//International Conference for Young Scientists «Biophysics, Biophotonics and Biotechnology (B3)» February 16-17, 2016 Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia