

На правах рукописи



ИВАНОВА

Елена Михайловна

**ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕДИ
И МЕХАНИЗМЫ ЕЕ ДЕТОКСИКАЦИИ
РАСТЕНИЯМИ РАПСА**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва, 2011

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

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Холодова Валентина Павловна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

Мейчик Наталья Робертовна

доктор биологических наук, профессор

Пронина Наталия Александровна

Ведущее учреждение: Московский педагогический государственный университет

Защита состоится «21» июня 2011 г. в 11 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, Ботаническая ул., 35.

Факс: (499)977-80-18, e-mail: m-azarkovich@ippras.ru ; ifr@ippras.ru.

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

Автореферат разослан «20» мая 2011 г.

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



М.И. Азаркович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Все возрастающее техногенное давление на среду обитания остро ставит вопрос о стратегиях и механизмах адаптации растений к действию абиотических стрессоров, среди которых особое положение занимают тяжелые металлы (ТМ). Медь (Cu), являясь наиболее токсичным ТМ, принадлежит к эссенциальным элементам, которые в следовых количествах необходимы для метаболизма, роста и развития растений, но при избытке в среде могут проявлять сильное токсическое действие (Hall, Williams, 2003).

В физиологических условиях медь существует в восстановленном (Cu^+) и окисленном (Cu^{2+}) состояниях и, являясь кофактором ряда ферментов, вовлекается в процессы фотосинтеза и дыхания, в защиту растений от окислительного стресса, в метаболизм клеточной стенки, в восприятие этиленового сигнала и биогенез молибденового кофактора (Yruela, 2009; CoHu, Pilon, 2010). Однако диапазон концентраций Cu, обеспечивающих оптимальный клеточный метаболизм и развитие растений, весьма узок. Считается, что даже их двукратное превышение может оказывать негативное действие, тогда как высокие концентрации Cu вызывают токсичные синдромы (хлорозы и некрозы, ингибирование роста корней и побегов), вплоть до летальных эффектов. В связи с этим остро встает крайне важный вопрос, каким образом в условиях избытка Cu растение регулирует ее гомеостаз, то есть, с одной стороны, обеспечивает клетки всех тканей и органов микроколичествами Cu, без которой жизнедеятельность организма невозможна, и, с другой стороны, предотвращает ее токсические эффекты и собственную гибель. Адаптация растений к токсическому действию меди связана с функционированием как специализированных (хелатирование, секвестеризация и компартментация ТМ), так и общих механизмов устойчивости (низкомолекулярные органические стресс-протекторные соединения, защитные макромолекулы и антиоксидантные системы) (Hall, 2002; Clemens, 2006). И те, и другие в настоящее время интенсивно изучаются, при этом недостаточно внимания уделяется физиологическим механизмам защиты растений от меди в высоких концентрациях, хотя до полного понимания молекулярных механизмов детоксикации меди еще далеко. Остается также не выясненным характер распределения этого эссенциального элемента по растению, что имеет принципиальное значение для анализа регуляторных

механизмов внутриклеточного гомеостатирования. В настоящем исследовании предпринята попытка поиска ответов на поставленные выше вопросы.

Цель и задачи исследования. Цель диссертационной работы заключалась в изучении особенностей повреждающего действия меди в высоких концентрациях на растения рапса (*Brassica napus* L.) с. Вестар и некоторых физиологических и молекулярных механизмов ее детоксикации.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Установить диапазон концентраций меди, в пределах которых растения рапса способны успешно завершить полный онтогенетический цикл.
2. Оценить степень токсического действия меди на некоторые физиологические параметры.
3. Изучить уровень аккумуляции меди и ее распределение по органам растений рапса.
4. Определить влияние повышенного содержания меди на поглощение и перенос в надземные органы ряда эссенциальных металлов.
5. На уровне матриц исследовать потенциальную роль в реализации устойчивости к меди генов мембранных транспортеров плазмалеммы *ZIP4* и *HMA5*, генов высокомолекулярных хелаторов металлотионеинов *MT1* и *MT2* и гена фитохелатинсинтазы *PCS* в клетках корней и листьев растений рапса.
6. Дать количественную оценку характера связи между содержанием накопленной в органах рапса меди и уровнем матриц изученных генов.

Научная новизна. Впервые выявлены биологические особенности локализации меди по органам растений рапса, в том числе распределение меди между корнями и листьями разного яруса. Проведена оценка подвижности меди в растениях в период восстановления, при удалении избытка меди из питательной среды. Экспериментально показано влияние меди на поступление и транслокацию таких микроэлементов как Fe, Mn и Zn, а также взаимодействие меди и цинка при внесении их в питательную среду в высоких концентрациях. Впервые на одной растительной системе изучена динамика аккумуляции меди и экспрессии генов, кодирующих мембранные транспортеры и хелаторы. Установлены особенности коррелятивных связей между экспрессией каждого из изученных генов и содержанием меди в тканях корней и листьев растений рапса. Получены данные о

скоординированной активации генов двух групп хелаторов – *MT* и *PCS* - на начальном этапе детоксикации избытка внутриклеточной *Cu*.

Практическая значимость. Полученные в работе данные имеют существенное значение для выяснения механизмов детоксикации, одним из которых является удерживание меди в листьях нижнего яруса, что позволяет снизить нагрузку на растение этого высоко токсичного ТМ. Эти данные необходимо учитывать не только при изучении механизмов адаптации растений рапса к действию меди, но и при оценке возможностей использования этого растения для очистки загрязненных территорий. Настоящее исследование уточняет представление о возможном участии генов *ZIP4*, *HMA5*, *MT1*, *MT2* и *PCS* в детоксикации меди, и позволяет говорить о скоординированном действии генов двух групп SH-содержащих хелаторов – металлотионеинов и фитохелатинов. Теоретические обобщения и совокупность полученных экспериментальных данных могут использоваться в курсах лекций для студентов биологических факультетов университетов и ВУЗов страны.

Апробация работы. Результаты исследований были представлены на Международной конференции «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений» (Екатеринбург, 2008); Международной конференции «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера» (Апатиты, 2009); межинститутском молодежном семинаре «Актуальные проблемы физиологии, молекулярной биологии и биотехнологии растений» (ИФР РАН, Москва, 2010); XVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2010» (МГУ, 2010); Всероссийской, с международным участием, конференции молодых ученых, посвященной 90-летию Уральского университета им. А.М. Горького «Биология будущего: традиции и инновации» (Екатеринбург, 2010); конференциях молодых ученых ИФР РАН (Москва 2009, 2010).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, из которых 2 статьи опубликованы в рецензируемых журналах.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследований, изложения полученных

результатов и обсуждения, заключения и выводов. Работа изложена на 129 страницах машинописного текста, включая 14 таблиц, 23 рисунка; список литературы состоит из 215 наименований, в т.ч. 198 на иностранном языке.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на растениях рапса (*Brassica napus* L.) с. Вестар.

Выращивание растений проводили при температуре 23-25°C/18-20°C, 12-часовом фотопериоде при освещенности 450 мкмоль/(м²с) металл-галогеновыми лампами (фирма «Philips», Нидерланды). В возрасте 3 недель растения, выращенные на перлите, высаживали на модифицированную питательную среду Хогланда–Снайдерс с Fe(NO₃)₂, содержащую 0,25 мкМ CuSO₄. Исследования проводили на 6-недельных растениях с 3-4 полностью развитыми листьями. Опыты начинали внесением CuSO₄ в питательную среду в концентрациях 10, 50 и 150 мкМ, продолжительность воздействия составляла от 3 ч до 10 дней. Контролем служили растения, росшие на стандартной среде с 0,25 мкМ CuSO₄. Среду сменяли каждые 5 дней.

Условия проведения опытов. В стандартных экспериментах физиологические показатели и уровень мРНК анализировали в корнях и листьях, включая в пробу корневого материала всю массу тонких корней, в пробу листьев – по 1-2 листа среднего яруса, при необходимости листья подразделяли на нижний и верхний ярусы. В отдельной серии экспериментов 3-недельные растения переносили с перлита в водную культуру на ½ концентрации среды Хогланда–Снайдерс, полностью исключая CuSO₄ из ее состава. После 20 дней роста растений на среде без меди их подвергали воздействию повышенных концентраций CuSO₄. При изучении процессов восстановления после 5 суток роста растений рапса на среде, содержавшей высокие концентрации меди, растения переносили на стандартный питательный раствор, предварительно промыв корни проточной водой.

Измерение свежей массы отдельных органов (корней и листьев) и **содержания в них воды** проводили стандартными весовыми методами. **Содержание пигментов** в листьях рапса проводили по Шлыку (1971). **Оценку аккумуляции Cu** в корнях проводили после энергичной промывки их

водопродной водой и дополнительно в течение 15 мин в 10 мМ ЭДТА. Содержание ТМ в тканях растений рапса измеряли на атомно-адсорбционном спектрометре ААС-ФМ 400 (фирма «ЛАБИСТ», Россия) после кислотного озоления тканей (Холодова и др., 2005).

Оценку уровня мРНК генов мембранных транспортеров (*ZIP4* и *HMA5*), высокомолекулярных хелаторов металлотионеинов (*MT1* и *MT2*) и гена фитохелатинсинтазы (*PCS*) проводили методом полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции (ОТ-ПЦР). Тотальную РНК выделяли с использованием RNeasy Mini Kit фирмы «QIAGEN». Реакцию обратной транскрипции выполняли по руководству фирмы «Fermentas». ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе 2720 Thermal Cycler фирмы «Applied Biosystems» (США). Для оценки результатов ПЦР проводили электрофорез нуклеиновых кислот в 1-1,5% геле в присутствии бромистого этидия. Специфические праймеры для проведения ПЦР исследуемых генов конструировали с использованием базы данных NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) в Vector NTI 9.0.0. В качестве контрольного гена использовали ген *18SrRNA*. Секвенирование кДНК последовательностей было выполнено в ЦКП «Геном» (Институт молекулярной биологии им. В.А. Эндельгардта).

Все опыты проводили в трехкратной биологической повторности. Обработку данных и корреляционный анализ проводили в программе Excel 2007. В таблицах представлены средние величины и их стандартные отклонения. Барами на рисунках обозначены стандартные отклонения от среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние меди на основные физиологические параметры

Одним из основных физиологических показателей состояния растений является накопление биомассы. Оценивали **свежую биомассу корней и листьев** рапса исходных растений, на 5-е и 10-е сутки действия меди в высоких концентрациях.

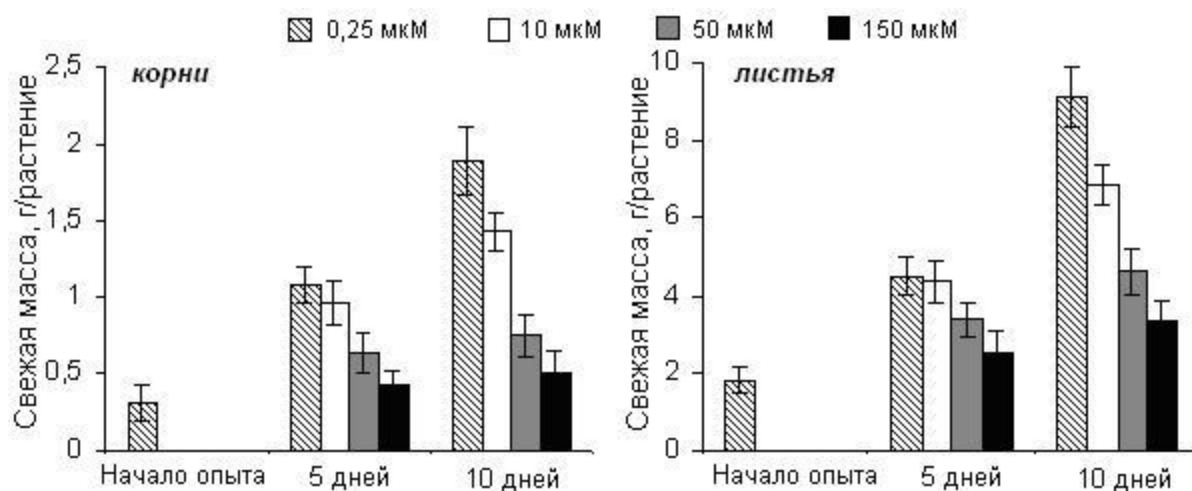


Рис. 1. Влияние меди в высоких концентрациях на накопление свежей массы корней и листьев растений рапса.

Как видно из данных, представленных на рис. 1, за 10 дней роста свежая масса корней растений контрольного варианта достигала 1,89 г/растение, листьев – 9,13 г. При действии меди в концентрациях 10 и 50 мкМ ингибирование накопления биомассы корней за 10 дней составило 24 и 60%, листьев – 25 и 49%. Однако при сравнении данных по накоплению биомассы за 5 и 10 суток воздействия 50 мкМ меди прирост свежей массы корней и листьев превышал 15 и 27% соответственно. Более значительное 73 и 64%-ое снижение биомассы корней и листьев происходило через 10 дней при действии меди в концентрации 150 мкМ, но, несмотря на это сохранялся небольшой прирост – на 8 и 21% для корней и листьев соответственно.

Доказательства жизнеспособности растений рапса при росте на среде, содержащей медь в высоких концентрациях, были получены в опытах по восстановлению, в которых растения после 5-дневного роста на среде с избытком меди были перенесены на 5 дней на стандартный питательный раствор (рис. 2). В течение 5-дневного периода восстановления рост корней составил 22-14%, и в большей степени – на 36-27% восстанавливался рост листьев.

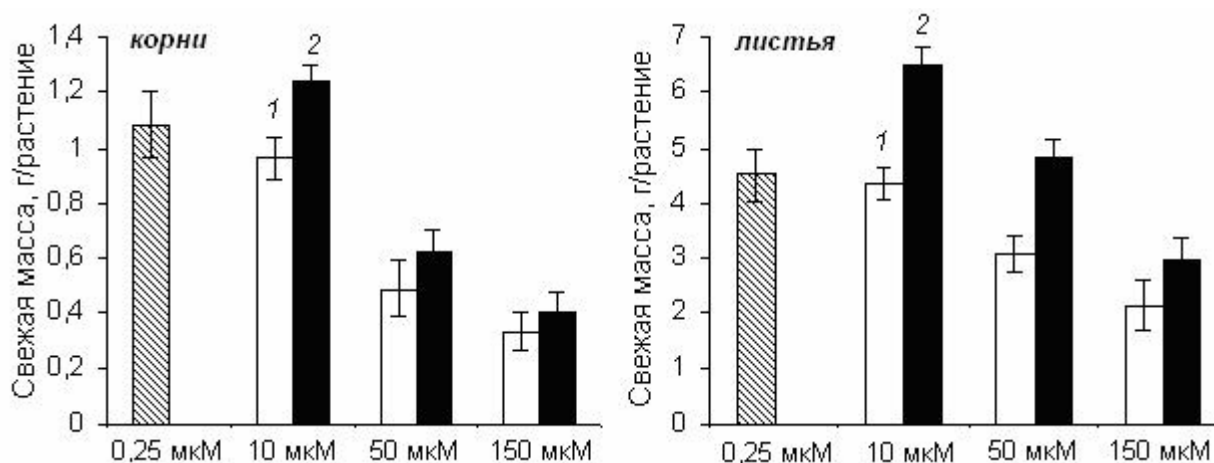


Рис. 2. Изменение свежей биомассы корней и листьев растений рапса, растущих в течение 5 дней на среде с избытком Cu (1) и в период 5-дневного роста на стандартной питательной среде (период восстановления) (2).

При росте на среде с избытком меди визуально наблюдалось подвядание растений и появление хлороза, поэтому была проведена оценка оводненности тканей и содержания в них пигментов. Оказалось, что рост растений на среде с медью в высоких концентрациях приводил к сильному снижению **содержания воды** в листьях рапса; со временем негативный эффект заметно усиливался (рис. 3).

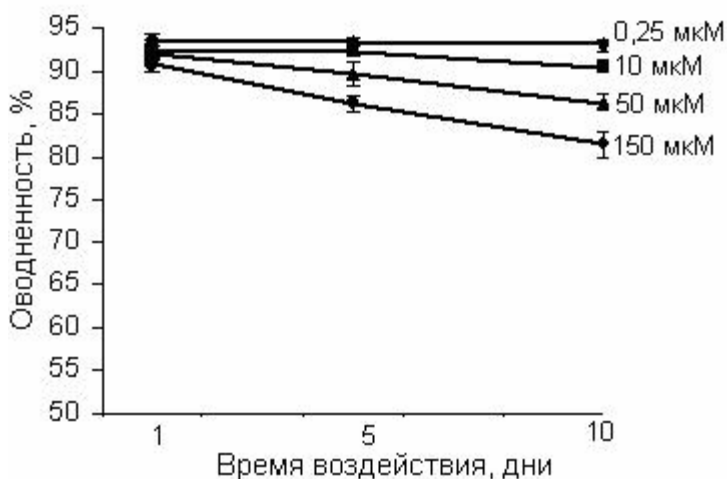


Рис. 3. Содержание воды в листьях растений рапса.

Одной из причин падения содержания воды в клетках растений может быть уменьшение размеров корневой системы и снижение всасывающей поверхности (Veselov et al., 2003; Титов и др., 2007).

Среди токсичных эффектов, вызванных высокими концентрациями меди, важно отметить не только снижение тургора листьев, но и появление хлороза, что связано со снижением **содержания фотосинтетических пигментов** (табл.1).

Таблица 1. Влияние меди на содержание фотосинтетических пигментов на 5- и 10-е сутки воздействия, мг/дм²

| 5 дней | | | | | | |
|------------|-------------|-------------|------------|------------|---------|---------|
| Вариант | Хл <i>a</i> | Хл <i>b</i> | <i>a+b</i> | <i>a/b</i> | Кар | Кс |
| 0,25 мкМ | 3,9±0,4 | 1,7±0,2 | 5,6 | 2,3 | 1,6±0,2 | 2,4±0,2 |
| Cu 10 мкМ | 3,8±0,2 | 1,6±0,3 | 5,4 | 2,4 | 1,4±0,3 | 2,3±0,2 |
| Cu 50 мкМ | 3,1±0,3 | 1,3±0,2 | 4,4 | 2,4 | 1,2±0,2 | 2,1±0,1 |
| Cu 150 мкМ | 2,6±0,2 | 0,9±0,1 | 3,5 | 2,9 | 0,9±0,1 | 1,7±0,2 |
| 10 дней | | | | | | |
| Вариант | Хл <i>a</i> | Хл <i>b</i> | <i>a+b</i> | <i>a/b</i> | Кар | Кс |
| 0,25 мкМ | 3,7±0,3 | 1,5±0,2 | 5,3 | 2,4 | 1,5±0,2 | 2,2±0,3 |
| Cu 10 мкМ | 3,5±0,3 | 1,3±0,3 | 4,8 | 2,7 | 1,2±0,2 | 2,1±0,3 |
| Cu 50 мкМ | 2,5±0,3 | 0,9±0,1 | 3,4 | 2,7 | 1,0±0,1 | 1,8±0,2 |
| Cu 150 мкМ | 1,9 ±0,2 | 0,5±0,1 | 2,5 | 3,2 | 0,4±0,2 | 1,3±0,2 |

Примечание: Определение содержания фотосинтетических пигментов проводили в листьях среднего яруса. Кар – каротиноиды, Кс – ксантофиллы.

Из данных, представленных в таблице 1, видно, что при продолжительном влиянии меди в концентрациях свыше 50 мкМ наблюдалось 2-3-кратное снижение содержания хлорофиллов, в большей степени хл *b*, что косвенно могло указывать на нарушение биосинтеза хлорофиллов (Maksymiec, 1997). Наиболее сильное негативное действие меди проявлялось в снижении содержания каротиноидов в 3,8 раза к 10 суткам эксперимента, что, вероятно, связано с выполняемой ими антиоксидантной ролью при развивающемся при высоких концентрациях меди в среде окислительном стрессе в листьях растений рапса (Кузнецов, Дмитриева, 2005).

Появление хлороза и снижение роста растений в целом могло происходить вследствие нарушения при избытке меди поступления других эссенциальных элементов. В связи с этим было изучено влияния меди на **поглощение и транслокацию Fe, Mn и Zn** (рис. 4). Опыты проводили на растениях рапса, выращенных на модифицированном питательном растворе Хогланда-Снайдерс, при содержании в среде 12 мкМ Fe(NO₃)₂, 1 мкМ MnSO₄, 1 мкМ ZnSO₄, 0,25 и 150 мкМ CuSO₄.

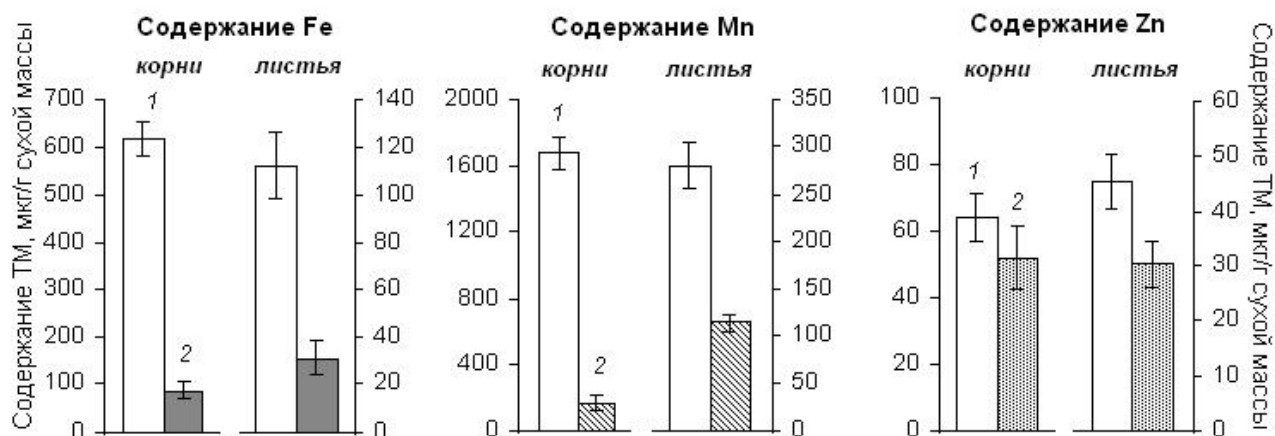


Рис. 4. Поступление и транслокация ряда эссенциальных элементов при действии меди в концентрациях 0,25 мкМ (1) и 150 мкМ (2) в течение 10 дней.

Анализ показал, что при действии меди в высокой концентрации происходило почти 7-кратное снижение поступления Fe в корни, но лишь 3-кратное снижение его транслокации в надземные органы. Значительно более сильным оказалось влияние меди на поглощение корнем Mn, снижение содержания которого достигло 90%, при этом поступление Mn в листья было задето в меньшей степени. Наименее заметным было влияние Cu на поглощение Zn корнем, при этом снижение его транслокации в надземные органы было более значительным.

В отдельной серии экспериментов было изучено **взаимовлияние Cu и Zn** как при избытке каждого ТМ на «партнера», так и при нахождении обоих ТМ в среде в высоких концентрациях (рис. 5).

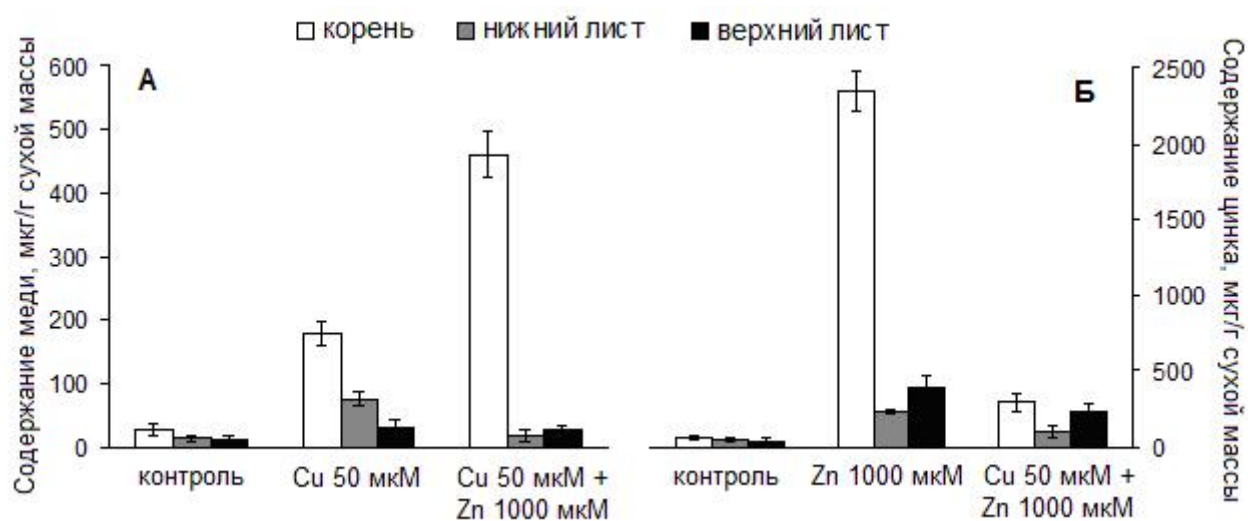


Рис. 5. Содержание меди (А) и цинка (Б) в корнях и листьях разного яруса при раздельном и совместном действии на растения рапса в течение 5 дней. Контролем служила стандартная питательная среда, содержащая 0,25 мкМ CuSO_4 и 1 мкМ ZnSO_4 .

Как видно из рис. 5А, при совместном внесении ТМ Zn способствовал поступлению Cu в корень, повышая ее содержание в 2,6 раза. Однако, накопившись в больших количествах в тканях корня, Zn препятствовал переносу Cu в надземные органы. Напротив, избыток Cu в среде очень сильно препятствовал поступлению Zn в корень (рис. 5Б), при этом транслокация цинка в надземные органы была заторможена лишь незначительно.

Таким образом, возможными механизмами взаимовлияния ТМ являются конкуренция на уровне мембранных транспортеров, на уровне формирования фонда транслокации или непосредственно при процессе загрузки ксилемы.

Динамика поступления меди и ее распределение между корнями и листьями разного яруса

Следовало оценить, чем обусловлено такое сильное негативное действие меди. Было установлено, что при росте растений рапса на стандартной питательной среде, содержащей 0,25 мкМ CuSO₄, среднее содержание меди в корнях составляло 26,2±4,0 мкг/г сухой массы, в листьях среднего яруса – 15,3±3,2 мкг/г (рис. 6).

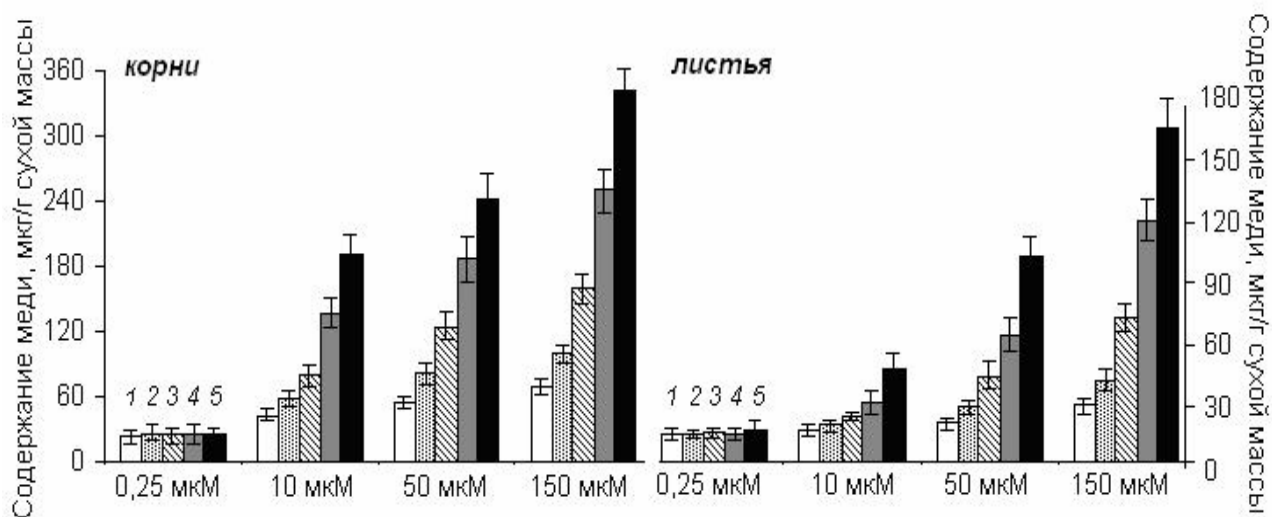


Рис. 6. Динамика накопления меди в корнях и листьях среднего яруса растений рапса при росте на среде с CuSO₄ в высоких концентрациях.

Время воздействия: 1 – 3 ч, 2 – 6 ч, 3 – 1сутки, 4 – 5 суток, 5 – 10 суток.

Уже в течение первых 3-6 ч опыта при действии меди во всех концентрациях было достигнуто 2-3-кратное превышение ее содержание в корнях по сравнению с уровнем контрольных растений. С увеличением продолжительности эксперимента накопление Cu продолжалось, и к 10 суткам наблюдалась более чем 11-кратная аккумуляция по сравнению с контролем.

Поступление ионов меди в листья происходило несколько медленнее, в течение 3 ч двукратное превышение концентрации Cu наблюдалось лишь при действии меди в концентрации 150 мкМ. К концу эксперимента при росте растений рапса на среде с 50 и 150 мкМ CuSO₄ содержание Cu в листьях в 5,8 и 11 раз превосходило контрольные величины, превосходя 160 мкг/г сухой массы. При этом аккумуляция меди в листьях происходила пропорционально ее концентрации в среде, что характеризует рапс как растение-индикатор меди.

Для уточнения особенностей локализации Cu в растении был проведен более детальный анализ распределения Cu в корнях и листьях разных ярусов (рис. 7).

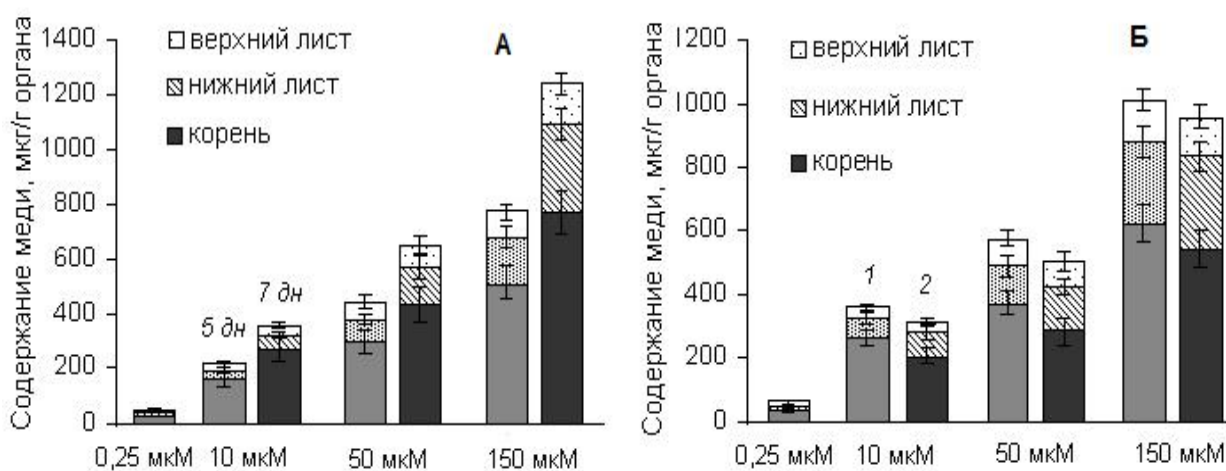


Рис. 7. Распределение меди в органах растений рапса при действии меди в высоких концентрациях (А) в течение 5 и 7 дней воздействия, и в период восстановления (Б).

1 – содержание меди в органах растений рапса при росте в течение 5 дней на среде с высокими концентрациями меди, 2 – содержание меди в органах рапса, росших в течение 5 дней на среде с высокими концентрациями меди, после чего перенесенных на 5 дней на стандартную питательную среду.

Как оказалось в ходе исследования, большая доля Cu локализовалась в корнях и весьма слабо транспортировалась далее по стеблю, преимущественно накапливаясь в листьях нижнего яруса (рис. 7А). Причем, за 10 дней действия меди в концентрации 50 и 150 мкМ ее содержание в листьях нижнего яруса в 8 и 13 раз превышало контрольные значения, достигая 114 и 216 мкг/г сухого веса. Аналогичное распределение меди было обнаружено в опытах по восстановлению (рис. 7Б), в которых при переносе растений на стандартную среду без избытка меди наблюдался небольшой ее отток из корней и преимущественная ее аккумуляция в листьях нижнего яруса.

Внутриклеточные механизмы детоксикации меди

Такое значительное накопление Cu в тканях растений рапса могло быть реализовано только при участии полноценной системы защиты от ее токсического действия. Изучение механизмов детоксикации меди проводили на уровне содержания мРНК, используя метод ОТ-ПЦР.

Была проведена оценка уровня матриц генов *ZIP4* и *HMA5*, кодирующих транспортеры плазматической мембраны, из которых первый, не являясь специфичным для Cu, может транспортировать этот ТМ внутрь клетки, тогда как второй, высоко специфичный, переносит Cu из цитоплазмы в апопласт (Weitz et al., 2003; Andres-Colas et al., 2006; Ytuela, 2009). Изучены также гены, кодирующие высокомолекулярные хелаторы Cu металлотионеины - *MT1*, *MT2* и ген *PCS*, кодирующий фитохелатинсинтазу – фермент синтеза полипептидных хелаторов (Cobbett, Goldsbrough, 2002).

Поскольку нуклеотидные последовательности данных генов у рапса не известны, подбор праймеров для синтеза фрагментов изучаемых генов проводили по консервативным участкам последовательностей соответствующих генов близкородственных видов семейства Brassicaceae – *Arabidopsis thaliana* и *Brassica juncea*. В таблице 2 представлена характеристика подобранных праймеров.

Таблица 2. Список праймеров, использованных для ПЦР

| Ген | Последовательность праймеров (5'-3') | Температура отжига, °С | Длина ПЦР продукта, п.н. | Исходная последовательность |
|----------------|---|------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| <i>ZIP4</i> | s-GCTGCTGGTAGTGAAGAGAT as-ATCAGCTGCGATGAGGTCCA | 52 | 599 | <i>A. thaliana</i> NM_100972 |
| <i>HMA5</i> | s- GACAACGACGATTCTCTGAGTAA as- ТААCACAAGCAGCACAAGTCAT | 68 | 349 | <i>A. thaliana</i> AAL02122 |
| <i>MT1</i> | s- GGCAGATTCTAACTGTGGATGT as- CCCACAGCTGCAGTTTGGAT | 60 | 118 | <i>A.thaliana</i> , NM_100633 |
| <i>MT2</i> | s- GTCTTGCTGTGGAGGGAAACTGT as – GGGTTGCACTTGCAGTCAGAT | 52 | 224 | <i>B. juncea</i> , BJY10850 |
| <i>PCS</i> | s- ATCAGACCACCATTGACGACTT as-GAACTCACAAGACGAGGAACATCT | 56 | 388 | <i>B. napus</i> , AM265632 |
| <i>18SrRNA</i> | s-GAGTGATGTGCCAGACCTAGGAATT as- ATGCTGATCCGCGATTACTAGC | 66 | 451 | <i>B. napus</i> , NC_008285 |

Примечание: s – прямой праймер, as – обратный праймер.

Полученные в результате ОТ-ПЦР продукты элюировали из агарозного геля и секвенировали. Анализ секвенированных последовательностей ПЦР-продуктов

показал высокий процент сходства с предполагаемыми последовательностями, выбранными для изучения генов: *ZIP4* – 92%, *HMA5* – 86%, *MT1* – 82%, *MT2* – 89% и *PCS* – 96%.

На электрофореграммах (рис. 8) представлены данные одного из типичных опытов по изменению уровня ампликонов исследуемых генов при действии меди в концентрации 50 мкМ в течение 3 ч – 10 дней. Уровень ампликонов *ZIP4*, *MT1*, *MT2*, *PCS* и *HMA5* в опытных вариантах определяли относительно уровня экспрессии контрольного гена *18SrRNA*. Изменения в экспрессии генов, вызываемые воздействием повышенных концентраций Cu в питательной среде, оценивали как отношение содержания мРНК в органах растений опытных вариантов к уровню матриц того же гена у растений, выращенных на стандартной питательной среде. Данные ПЦР анализа были обработаны с помощью программы 1D Scan Version 1.3 (фирма «CSP Inc», США).

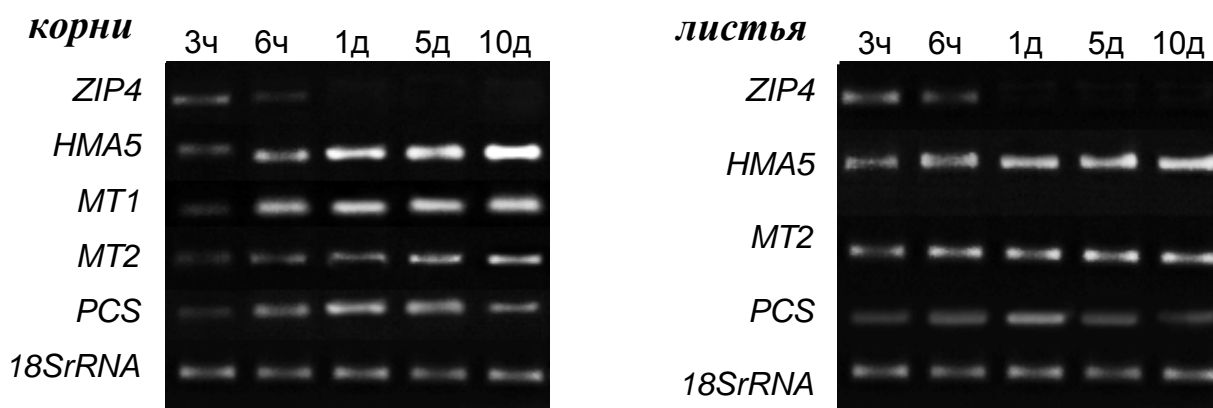


Рис. 8. Электрофореграммы ампликонов исследуемых генов при действии меди в концентрации 50 мкМ.

В качестве примера на рис. 9 представлены количественные данные об изменении уровня транскриптов генов *ZIP4*, *HMA5*, *MT1*, *MT2* и *PCS* при действии меди в концентрации 50 мкМ в течение 3 ч – 10 суток. Как оказалось, уровень мРНК гена *ZIP4* в корнях уже через 3 ч воздействия был ниже контрольного уровня, а, начиная с 6 ч, совсем не обнаружена его экспрессия. Уровень матриц гена *HMA5* с самого начала эксперимента был выше контрольных значений в 4,3 раза, к 10 суткам максимальное превышение достигло 26,7 раза. Важными элементами детоксикации является хелатирование – связывание избыточного содержания меди в цитозоле.

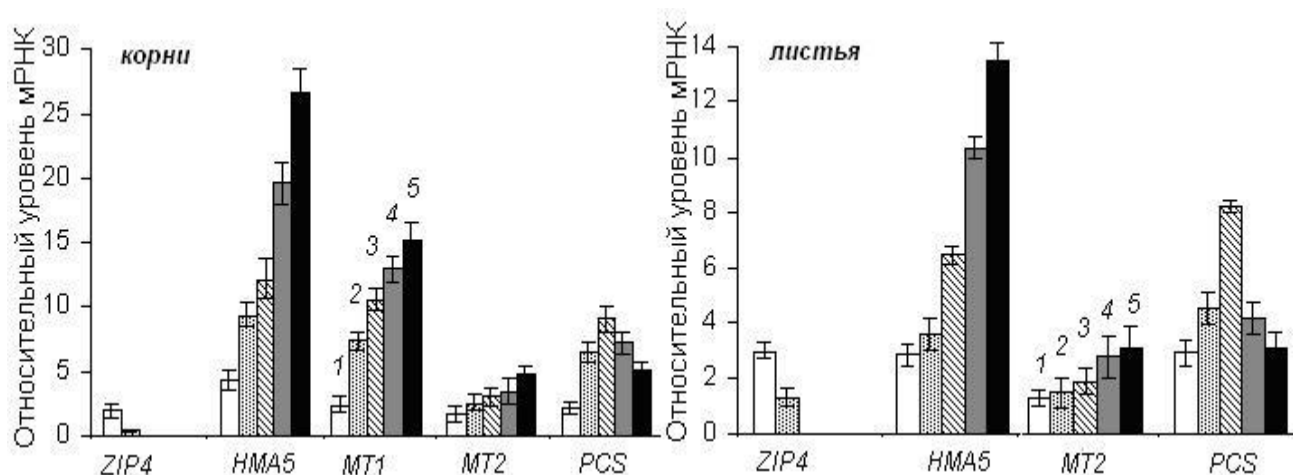


Рис. 9. Уровень мРНК исследуемых генов в корнях и листьях растений рапса при действии меди в концентрации 50 мкМ в течение: 1 – 3 ч, 2 – 6 ч, 3 – 1 суток, 4 – 5 суток, 5 – 10 суток воздействия.

Содержание транскриптов *MT1* повышалось уже с самого начала воздействия меди в концентрации 50 мкМ, достигнув к 10 суткам 15-кратного превышения. Значительно меньший эффект наблюдался в отношении мРНК *MT2*, достоверное превышение контроля было достигнуто только к 6 ч опыта – в 2,5 раза, максимальное увеличение составило всего 4,7 раза. Помимо генов металлотIONEИНОВ, была исследована экспрессия гена фермента фитохелатинсинтазы. Статистически достоверный подъем уровня матриц *PCS* проявился уже через 3 ч воздействия, к первым суткам наблюдалось 9-кратное превышение, но далее происходило существенное снижение уровня мРНК.

В листьях растений уровень транскриптов *ZIP4* за 3 ч воздействия меди в концентрации 50 мкМ был несколько выше, чем в корнях, и превышал контрольные значения в 1,8 раза. Однако, уже начиная с 1 суток, экспрессия *ZIP4* прекращалась, что, видимо, было обусловлено 1,7-кратным накоплением меди в листьях. Уровень матриц гена *HMA5* к 6 ч воздействия в 6 раз превосходил контроль, к концу эксперимента – в 13 раз (рис. 9). В листьях совсем не было обнаружено экспрессии гена *MT1*, что вполне соответствует представлению о его корневой органоспецифичности (Murphy, Taiz, 1995; Cobbett, Goldsbrough, 2002). Достоверный уровень активации *MT2* был обнаружен лишь к первым суткам, к концу эксперимента наблюдалось относительно небольшое повышение экспрессии. Несмотря на более медленное в сравнении с корнями поступление Cu в клетки листьев, достоверное превышение уровня мРНК *PCS* над контролем наблюдалось

уже после 3 ч. После достижения максимального уровня матриц *PCS* при 24 ч воздействии уровень транскриптов *PCS* снижался в 2,3 раза от максимальных значений.

В дальнейшем был проведен корреляционный анализ, за основу которого взято соотношение матриц исследованных генов (см. рис. 9) и содержание *Cu* непосредственно в тканях корней и листьев растений рапса (количественная оценка которой представлена на рис. 6).

До сих пор остается неясной роль транспортера, кодируемого геном *ZIP4*, в поступлении *Cu* внутрь клеток (Wintz et al., 2003). Как было установлено (рис. 10), содержание матриц *ZIP4* в клетках корней быстро снижается уже при незначительном повышении содержания в них меди, вплоть до полного блокирования экспрессии. Эти результаты свидетельствуют о том, что первой реакцией растений в ответ на появление избыточных количеств меди в тканях является ограничение ее поступления внутрь клеток.

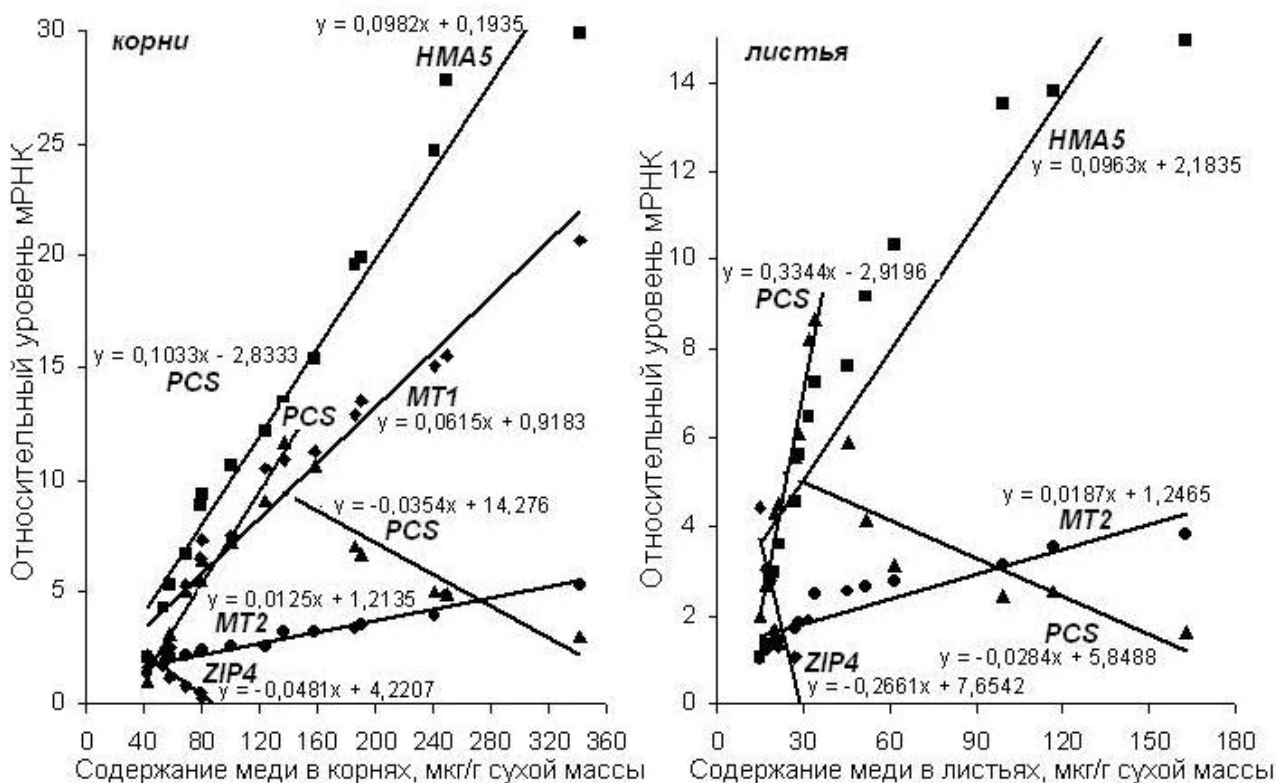


Рис. 10. Корреляционная зависимость между содержанием транскриптов генов транспортеров *ZIP4* и *HMA5*, генов металлотиионеинов *MT1*, *MT2* и гена фитохелатинсинтазы *PCS* и содержанием меди в корнях и листьях растений рапса.

Принципиально иная картина характеризовала уровень транскриптов гена *HMA5*; аккумуляция меди вызывала резкое повышение уровня мРНК,

происходившее пропорционально содержанию поступившей в корни меди. Такой высокий уровень матриц *HMA5* свидетельствовал о высокой вероятности того, что продукт этого гена принимает участие в удалении Cu из цитозоля. Повышение содержания меди в клетках корней приводило к значительному увеличению уровня матриц *MT1*, которое далее продолжало интенсивно нарастать; значительно меньше повышался уровень мРНК *MT2*. Сильный подъем уровня матриц *PCS* происходил на начальных этапах аккумуляции меди корнями, но при увеличении содержания в них Cu наблюдалось быстрое снижение мРНК *PCS*.

Сходная картина характеризовала изменение уровня транскриптов изученных генов в листьях растений. Уровень транскриптов *ZIP4* был в 2 раза выше, чем в корнях, но при повышении аккумуляции меди наблюдали резкое снижение уровня матриц *ZIP4* и прекращение его экспрессии (рис. 10). При этих же концентрациях меди происходило сильное повышение мРНК гена *HMA5*. Увеличение уровня транскриптов *MT2*, единственных металлотионеинов, синтезирующихся в зрелых листьях, происходило значительно слабее, чем в корнях; лишь при накоплении 50-60 мкг Cu/г сухой массы дальнейшая аккумуляция Cu вызывала довольно слабый рост содержания матриц. Вместе с этим, достоверное превышение уровня мРНК *PCS* наблюдалось уже при 20 мкг Cu/г сухой массы, но при достижении 50 мкг/г сухой массы уровень транскриптов *PCS* снижался в 2 раза от максимальных значений.

Еще один физиологический подход был использован для получения дополнительной информации о внутриклеточных механизмах детоксикации меди. Для этого растения выращивали на $\frac{1}{2}$ концентрации среды Хогланда-Снайдерс без внесения CuSO_4 . Проведенная проверка показала, что реальная концентрация Cu в такой среде оказалось равным 0,021 мкМ, что в 11 раз ниже стандартных значений. Содержание меди в органах растений рапса, выращенных на этой среде, было несколько пониженным. Среднее содержание меди составляло $17,3 \pm 3,1$ мкг/г сухой массы в корнях растений и $9,3 \pm 2,6$ мкг/г сухой массы в листьях (по данным 3 опытов).

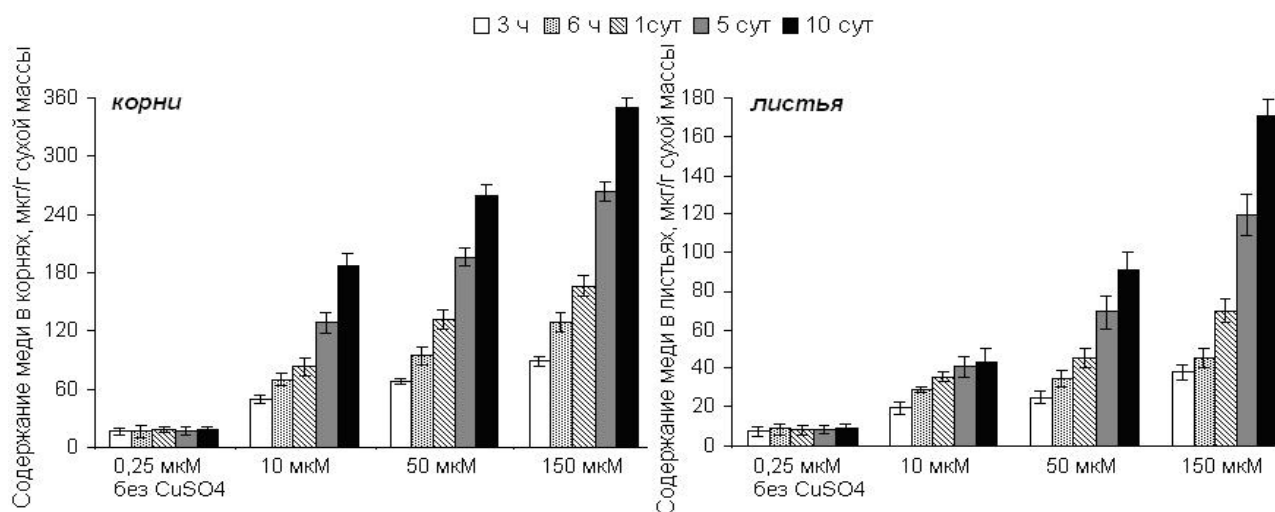


Рис. 11. Аккумуляции меди в корнях и листьях растений рапса, выращенных на $\frac{1}{2}$ концентрации среды без внесения CuSO_4 .

При внесении в питательную среду меди в концентрациях 10, 50 и 150 мкМ наблюдалась несколько большая ее аккумуляция, как в корнях, так и листьях растений рапса в первые часы воздействия, по сравнению с обычной постановкой опыта, когда растения выращивали на полном составе питательной среды. Однако при продолжении эксперимента содержание Cu в тканях достоверно отличалась от накопления меди в тканях растений при стандартной постановке опыта (рис. 11).

Аналогично предыдущим опытам было проведено исследование уровня матриц генов транспортеров *ZIP4* и *HMA5*, генов SH-содержащих хелаторов меди – *MT1*, *MT2* и гена фитохелатинсинтазы *PCS* в корнях и листьях растений, росших на $\frac{1}{2}$ концентрации среды без внесения CuSO_4 в течение 20 дней, после чего перенесенных на среду с медью в высоких концентрациях.

В условиях недостатка Cu в питательной среде оказался резко повышенным уровень мРНК *ZIP4* гена транспортера плазматической мембраны как в корнях, так и в листьях – в 14 и 7,5 раз по отношению к контрольному варианту растений, выросших на полном составе стандартной среды (с добавлением 0,25 CuSO_4) (Рис. 12). При этом, уровень транскриптов *MT1* и *PCS* в корнях и *MT2* в листьях был в 2 раза ниже, чем в стандартных условиях и совсем не было обнаружено ампликонов гена *HMA5* ни в корнях, ни в листьях растений рапса.

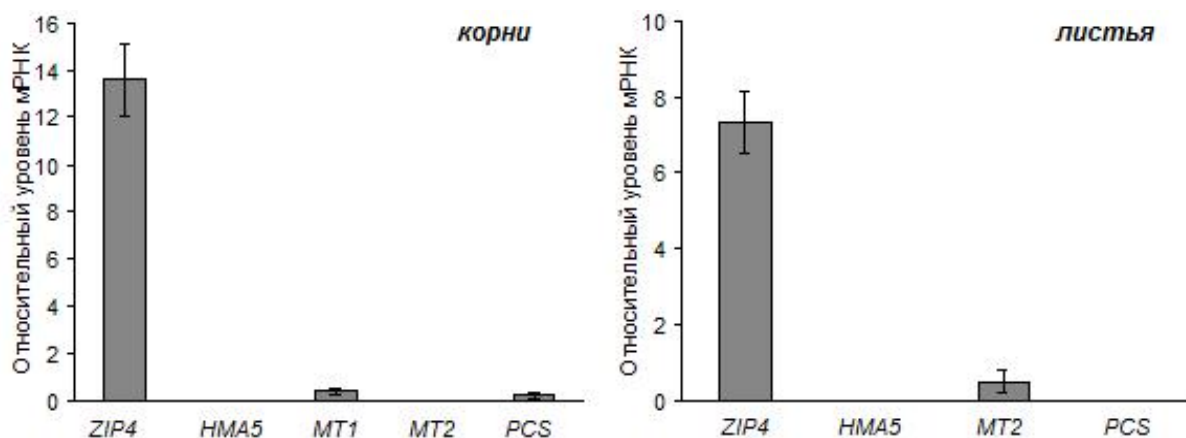


Рис. 12. Уровень матриц генов транспортеров *ZIP4* и *HMA5*, генов хелаторов меди *MT1*, *MT2* и гена фитохелатинсинтазы *PCS* в корнях и листьях растений рапса, выращенных на $\frac{1}{2}$ концентрации среды без внесения CuSO_4 .

При переносе растений, выращенных в условиях «дефицита» меди, на питательную среду, содержащую медь в высоких концентрациях, наблюдали резкое снижение мРНК гена *ZIP4* (рис. 13). Наоборот, активность гена *HMA5*, на уровне содержания матриц, резко повышалась пропорционально содержанию Cu как в корнях, так и в листьях.

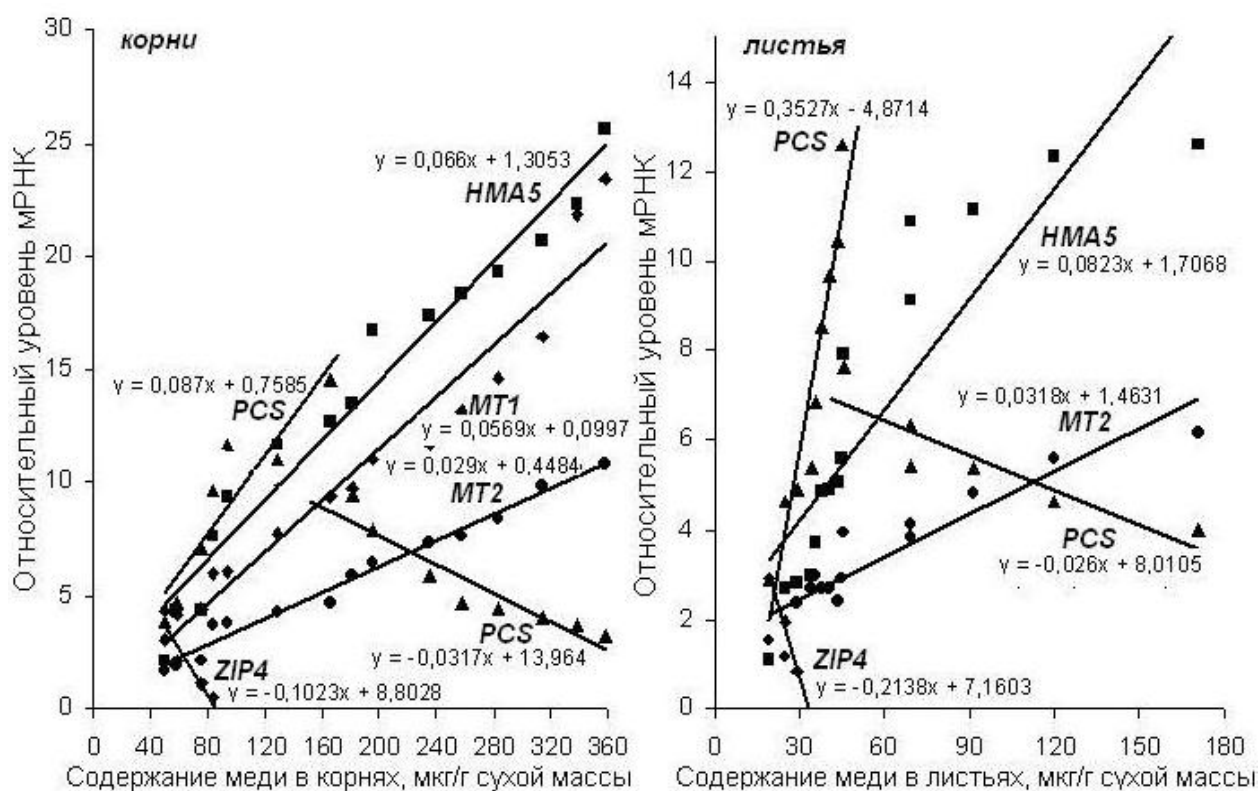


Рис. 13. Корреляционная зависимость между уровнем транскриптов генов транспортеров *ZIP4* и *HMA5*, генов хелаторов меди *MT1*, *MT2* и гена фитохелатинсинтазы *PCS* и содержанием меди в корнях и листьях растений рапса, выращенных на $\frac{1}{2}$ концентрации среды без внесения CuSO_4 .

Зависимость накопления транскриптов генов хелаторов от содержания меди в органах растений была схожа с предыдущей картиной: подтверждалась органоспецифичность гена *MT1*, экспрессирующегося только в корнях; наблюдалось быстрое повышение уровня транскриптов гена *PCS* уже при небольшом содержании меди в клетках корней и листьев и при несколько меньшем уровне матриц генов металлотионеинов и резкое снижение мРНК гена *PCS* при высоком накоплении меди в органах на фоне повышающегося содержания матриц генов *MT1* и *MT2*.

По результатам проведенных исследований составлена сводная таблица коэффициентов корреляции между концентрацией меди и уровнем транскриптов изученных генов (табл. 3). Высокие коэффициенты корреляции свидетельствуют о том, что интенсивность экспрессии изученных генов в высокой степени определяется содержанием накопленной в органах рапса меди.

Таблица 3. Коэффициенты корреляции между содержанием меди и уровнем транскриптов изученных генов в корнях и листьях растений рапса

| Исследованные гены | Корни | | Листья | |
|-----------------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| | полная среда* | «дефицит» Cu** | полная среда* | «дефицит» Cu** |
| <i>ZIP4</i> | 0,938 | 0,889 | 0,785 | 0,981 |
| <i>HMA5</i> | 0,965 | 0,958 | 0,852 | 0,775 |
| <i>MT1</i> | 0,944 | 0,947 | *** | *** |
| <i>MT2</i> | 0,956 | 0,984 | 0,853 | 0,853 |
| <i>PCS</i> начальный этап | 0,964 | 0,845 | 0,968 | 0,896 |
| <i>PCS</i> завершающий этап | 0,807 | 0,882 | 0,717 | 0,812 |

Примечание: до переноса растений на среду с избыточными концентрациями меди они росли на полной среде (*) или на среде с пониженной концентрацией меди (**).

*** - транскрипты отсутствуют.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе была проведена оценка токсического действия меди и изучение механизмов ее детоксикации растениями рапса с. Вестар.

Как показали проведенные эксперименты, уже при небольшом повышении концентрации меди в среде наблюдалось ингибирование роста и ряда физиологических параметров. Отчетливым признаком негативного действия меди является торможение развития корневой системы, нарушение водного статуса растений, пониженное содержание пигментов. Кроме того, обнаружено значительное ингибирование поглощения и переноса в надземные органы таких эссенциальных элементов как Fe и Mn, что, вероятно, происходит как из-за конкуренции на уровне мембранных транспортеров, так и наличия общего хелатирующего агента – никотианамина, который участвует в дальнем транспорте Cu и Fe (Krämer, Clemens, 2005; Yruela, 2009). В проведенных опытах были установлены существенные различия по взаимодействию Cu и Zn как при избытке каждого из изучаемых ТМ, так и при нахождении обоих ТМ в среде в высоких концентрациях.

Несмотря на сильное негативное действие избытка меди в среде на растения рапса, в ходе экспериментальной работы были получены доказательства довольно высокой их устойчивости к действию меди в высоких концентрациях. В первую очередь это проявлялось в способности восстановления роста после снятия действия меди, в сохранении жизнеспособности в течение 6 недель даже при концентрации 150 мкМ и в способности полностью завершать онтогенетический цикл при 100 мкМ CuSO_4 .

Высокая устойчивость рапса связана, в частности, с преимущественной аккумуляцией Cu в листьях нижнего яруса и довольно слабой транслокацией ее по побегу. При длительном воздействии меди в высоких концентрациях происходил опад нижних листьев, в которых наблюдалось 15-кратное превышение аккумуляции Cu, что, видимо, следует рассматривать в качестве одного из механизмов детоксикации на органном уровне. Слабая подвижность меди отчасти определяется ее адсорбцией клеточными стенками, большей частью О-связями (Meuchik, Yermakov, 2001; Wei et al., 2010; Kholodova et al., in press).

Безусловно, высокий уровень накопления меди в тканях и в то же время высокая устойчивость растений происходили благодаря полноценной системе внутриклеточных механизмов детоксикации. На это указывают данные о сбалансированности между подавлением и активацией экспрессии генов, продукты которых участвуют в поступлении меди в клетку (*ZIP4*) и в выносе ее избытка в апопласт (*HMA5*). В настоящее время лишь в нескольких работах упоминалось об изменении уровня мРНК *ZIP4* в ответ на действие меди (Grotz et al., 1998, Guerinot, 2000; Wintz et al., 2003), но не давалась характеристика вклада данного гена в детоксикацию меди. В представленной работе показано, что при недостаточном содержании Cu в тканях растений рапса обнаруживался высокий уровень матриц гена *ZIP4*. Такое соотношение свидетельствует в пользу представления о вероятности участия белка-транспортера плазмалеммы, кодируемого этим геном, в переносе меди из среды при ее нехватке или стандартном содержании в органах растений рапса. Напротив, при избыточном содержании Cu в органах происходило быстрое блокирование экспрессии *ZIP4*. Данные, полученные в работе, также вносят существенный вклад в до сих пор остающийся спорным вопрос – участвуют ли фитохелатины в детоксикации меди. Скоординированность ответов генов двух групп SH-содержащих хелаторов – металлотионеинов (*MT1* и *MT2*) и фитохелатинсинтазы (*PCS*) подтверждает возможность участия этих высокомолекулярных хелаторов в связывании избытка меди.

Таким образом, в условиях стресса обнаруживается сложное и скоординированное изменение уровня матриц генов, отвечающих за поступление (*ZIP4*), связывание (*MT1*, *MT2*, *PCS*) и удаление избытка меди из цитозоля (*HMA5*).

ВЫВОДЫ

1. Установлен относительно высокий уровень устойчивости растений рапса *Brassica napus* L. с. Вестар к меди в высоких концентрациях, обеспечивающий завершение полного онтогенетического цикла в присутствии 100 мкМ CuSO₄ в среде и проявляющийся в восстановлении роста при снятии действия стрессора.

2. Показано, что токсическое действие меди в повышенных концентрациях реализовалось в растениях рапса в ингибировании аккумуляции биомассы, в большей степени затрагивающем корневую систему, падении оводненности

тканей, снижении содержания хлорофилла, ингибировании поглощения ионов железа, марганца и цинка и их транслокации по растению.

3. Продемонстрировано, что растения рапса накапливали медь пропорционально ее концентрации в среде, что характеризует рапс как растение-индикатор. Низкая подвижность меди в растениях рапса проявлялась в преимущественной ее аккумуляции в корнях по сравнению с надземными органами, а также в слабой транслокации по побегу. При продолжительном воздействии избытка меди максимальное ее накопление в листьях, тем не менее, превышало стандартные значения более чем в 15 раз и достигало 216 мкг Cu/г сухой массы при факторе транслокации 0,51.

4. Впервые на одной растительной системе изучена динамика аккумуляции меди и экспрессии двух основных функциональных групп генов, кодирующих мембранные транспортеры и хелаторы меди, продукты которых участвуют в регуляции внутриклеточного Cu-гомеостаза и детоксикации избытка меди.

5. Впервые установлена сбалансированность интенсивности экспрессии генов *HMA5* и *ZIP4*, белковые продукты которых локализованы в плазмалемме и осуществляют транспорт ионов меди из цитозоля в апопласт и поступление ее в цитозоль, соответственно. Показано, что в ответ на повышение концентрации меди в среде интенсивность экспрессии гена *HMA5* резко возрастает, тогда как экспрессия гена *ZIP4* полностью блокируется, что позволяет говорить об возможном участии этих генов в регуляции внутриклеточного гомеостаза меди с целью ограничения ее аккумуляции до летальных концентраций.

6. Продемонстрирован скоординированный ответ двух групп генов, кодирующих высокомолекулярные хелаторы (металлотионеины, гены *MT1* и *MT2*) и небольшие полипептиды (фитохелатины, ген фитохелатинсинтазы *PCS*) при воздействии меди в высоких концентрациях на растения. Эта скоординированность проявляется в доминирующей экспрессии гена *PCS* по сравнению с генами *MT1* и *MT2* в первые часы воздействия избытка меди, которая на более позднем этапе адаптации сменяется преимущественной транскрипцией генов *MT1* и *MT2* при падении интенсивности экспрессии гена *PCS*.

7. Корреляционный анализ показал высокую степень соответствия между уровнем матриц *ZIP4*, *HMA5*, *MT1*, *MT2* и *PCS* и содержанием меди,

аккумулированной в корнях и листьях растений рапса в течение всего периода воздействия во всем исследованном диапазоне концентраций Cu в среде. Высокие коэффициенты корреляции – от 0,717 до 0,984 – свидетельствуют о том, что интенсивность экспрессии изученных генов в значительной степени детерминирована концентрацией аккумулированной в органах рапса меди.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1) Волков К.С., **Иванова Е.М.**, Мещеряков А.Б., Холодова В.П. (2008) «Ингибирующее действие высоких концентраций меди и цинка на содержание железа и пигментов в листьях растений рапса» // *Тезисы докладов Международной научной конференции «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений»*. Екатеринбург, с. 116.

2) **Иванова Е.М.**, Холодова В.П. (2009) «Сравнительный анализ процессов накопления и распределения в побегах рапса меди и цинка в условиях их избытка в среде и в период восстановления» // *Тезисы докладов Международной научной конференции «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера»*. Апатиты, Мурманская область, с. 132.

3) Ралдугина Г.Н., Хмахми М., Кунда М.С., **Иванова Е.М.**, Волков К.С., Кочетов А.А., Холодова В.П. (2009) «Влияние NaCl и CuSO₄ на трансгенные растения *Brassica napus* L., содержащие антисмысловый супрессор гена пролиндегидрогеназы» // *Тезисы докладов Международной научной конференции «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера»*. Апатиты, Мурманская область, с. 275.

4) Холодова В.П., **Иванова Е.М.**, Волков К.С., Гринин А.Л., Кузнецов Вл.В. (2009) «Участие металлотионеинов в детоксикации меди и цинка в растениях» // *Тезисы докладов Международной научной конференции «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера»*. Апатиты, Мурманская область, с.349.

5) Volkov K.S., Kuznetsov Vl.V., **Ivanova E.M.**, Grinin A.L., Kholodova V.P. (2010) «Metallothionein participation in copper and zinc detoxification in plants». Abstracts of the XVIII *FESPB* Congress, Valencia, Spain, p. 117.

6) **Иванова Е.М.** (2010) «Скоординированные ответы генов двух групп высокомолекулярных хелаторов на избыток меди в растениях» // *Тезисы докладов*

XVII международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2010». Москва, с. 253.

7) **Иванова Е.М.**, Холодова В.П. (2010) «Влияние высоких концентраций меди на поступление и транслокацию некоторых эссенциальных элементов» // *Тезисы докладов по материалам Всероссийской, с международным участием, конференции молодых ученых, посвященной 90-летию Уральского университета им. А.М. Горького «Биология будущего: традиции и инновации»*. Екатеринбург, с.120.

8) Михальская Л.Н., **Иванова Е.М.**, Швартау В.В. (2010) «Современные представления о регуляции ионного гомеостаза растений» // *Тезисы докладов XI конференции молодых ученых «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів»*. Киев, с. 119-120.

9) Гринин А.Л., Холодова В.П., **Иванова Е.М.**, Кузнецов Вл.В. (2010) «Пролин функционирует в качестве химического шаперона при действии хлористого натрия и меди» // *Тезисы докладов Всероссийского симпозиума «Растение и стресс»*. Москва, с. 119.

10) **Иванова Е.М.**, Холодова В.П. (2010) «Взаимодействие меди и цинка при комплексном действии на растения рапса» // *Тезисы докладов Всероссийского симпозиума «Растение и стресс»*. Москва, с. 168.

11) Холодова В.П., Киселева И.С., **Иванова Е.М.**, Волкова А.С., Кузнецов Вл.В. (2010) «Устойчивость растений *Coronaria flos-cuculi* к высоким концентрациям меди в среде» // *Тезисы докладов Всероссийского симпозиума «Растение и стресс»*. Москва, с. 374.

12) **Иванова Е.М.**, Холодова В.П., Кузнецов Вл.В. (2010) «Биологические эффекты высоких концентраций меди и цинка и характер их взаимодействия в растениях рапса» // *Физиология растений*, т. 57, № 6, с. 864-873.

13) **Иванова Е.М.**, Волков К.С., Холодова В.П., Кузнецов Вл.В. (2011) «Новые перспективные виды растений в фиторемедиации загрязненных медью территорий» // *Вестник Российского университета дружбы народов*, №2, с. 30-37.

14) Kholodova V.P., **Ivanova E.M.**, Kuznetsov V.I.V. (2011) «Initial step of copper detoxification: outside and inside of the plant cell» // Chapter in the Book: *«Detoxification of Heavy Metals»*, Springer Heidelberg.