

*На правах рукописи*



**ЕШИНИМАЕВА Бэлигма Цыденжаповна**

**ВЛИЯНИЕ ДЕФИЦИТА И ИЗБЫТКА ЖЕЛЕЗА НА АКТИВНОСТЬ  
АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ И ОБРАЗОВАНИЕ  
ФЕРРИТИНА У РАСТЕНИЙ ХРУСТАЛЬНОЙ ТРАВКИ**

03.01.05 – Физиология и биохимия растений

**Автореферат**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва – 2010

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

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор

Шевякова Нина Ивановна

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор

Тараканов Иван Германович

доктор биологических наук

Трофимова Марина Сергеевна

**Ведущая организация:**

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет

Защита состоится «08» июня 2010 г. в 11<sup>00</sup> часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 35.

Факс: (495) 977-80-18, e-mail: [ifr@ippras.ru](mailto:ifr@ippras.ru); [m-azarkovich@ippras.ru](mailto:m-azarkovich@ippras.ru)

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

Автореферат разослан «05» мая 2010 г.

Учёный секретарь совета по защите

докторских и кандидатских диссертаций,

кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

## Общая характеристика работы

**Актуальность проблемы.** Fe – эссенциальный элемент для растений. Fe необходимо растениям для функционирования фотосинтеза и дыхания, в которых в качестве переносчиков электронов участвуют железосодержащие и железосерные белки такие как, ферредоксин, цитохромы и другие. Как кофактор Fe входит в состав многих антиоксидантных ферментов (Fe-супероксиддисмутаза, пероксидазы, каталаза) и участвует в образовании предшественника хлорофилла.

Однако, ярко выраженная способность этого металла в восстановленной форме ( $Fe^{2+}$ ) вступать в реакции с кислородом с образованием гидроксил радикала ( $OH^\circ$ ) - самого токсичного из АФК, создает необходимость у всех аэробных организмов, в том числе и у растений, поддерживать в клетках гомеостаз железа, не допускающий накопления его “каталитической“ формы ( $Fe^{2+}$ ). Такое нарушение гомеостаза железа у растений может возникать в стрессорных условиях, индуцирующих окислительный стресс (Hernandes et al., 2001).

Одним из уникальных механизмов, препятствующих проявлению токсичности  $Fe^{2+}$  при его избыточном образовании в клетках, может являться функционирование у всех живых организмов, за исключением дрожжей, железосодержащего белка негеминовой природы **ферритина**, запасящего Fe в окисленной нетоксичной форме ( $Fe^{3+}$ ). К настоящему времени гены, ответственные за биосинтез ферритина, клонированы и охарактеризованы у ряда видов растений: кукурузы, гороха, сои, люпина, риса и арабидопсиса. У растений ферритин локализован в хлоропластах (Perrin, 1970; Парамонова и др., 2004; 2007), реже в митохондриях (Zancani et al., 2004) и отсутствует в цитоплазме. Структура ферритина в пластидах растений отличается от ферритина животных и бактерий наличием в минеральном ядре не только железа, но и фосфора в соотношении P:Fe (1:3) (Waldo et al., 1995). Главное отличие ферритинов растений от животных состоит в том, что синтез ферритина у животных регулируется на трансляционном уровне в ответ на избыток железа, а у растений – на транскрипционном уровне (Briat et al., 2009). В поддержании гомеостаза Fe у растений участвует множество генов (42 гена у риса), включая гены транспорта ZIP (транспортер Fe и Zn) и гены FRO, кодирующие  $Fe^{+3}$ -хелат редуктазы оксидазы (Vert et al., 2002).

Долгое время образование отложений ферритина в пластидах растений рассматривали как запасную форму железа (Hyde et al., 1963). В последнее время изучение функций ферритина рассматривается в связи с защитой от окислительного стресса, как у растений, так и у животных (Андреев, 2004; Theil and Briat, 2004).

Однако до сих пор отсутствуют исследования по изучению взаимосвязи образования ферритина у растений, испытывающих окислительный стресс при действии абиотических факторов.

**Цель исследования.** Цель настоящей работы – исследовать зависимость накопления ферритина в листьях факультативного галофита *Mesembryanthemum crystallinum* L. от содержания железа в питательном растворе и интенсивности окислительного стресса.

**Задачи исследования:**

1. Определить дозovou зависимость поглощения железа растениями *M. crystallinum* L. в контрольных условиях культивирования и в присутствии 300 мМ NaCl.
2. Исследовать основные биохимические параметры: активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, пероксидаза), содержание пролина, хлорофилла и интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ), характеризующие взаимосвязь между состоянием окислительного стресса и гомеостазом железа у галофита *M. crystallinum*, в зависимости от статуса железа, засоления и их совместного действия.
3. Изучить зависимость отложения ферритина и его ультраструктурные особенности в пластидах мезофилла листьев от статуса железа в контрольных условиях и при засолении с помощью электронной микроскопии.
4. Идентифицировать мРНК генов ферритина у хрустальной травки с помощью метода ОТ-ПЦР и секвенировать продукты ПЦР.
5. Оценить уровень экспрессии генов ферритина в листьях методом ОТ-ПЦР и Вестерн-блоттингом в зависимости от статуса железа и развития окислительного стресса.
6. Исследовать влияние про-оксиданта метилвиологена (параквата - PQ) – индуктора окислительного стресса в пластидах, и антиоксиданта полиамина спермидина (Спд) на экспрессию генов ферритина и содержание белка в листьях.

**Научная новизна.** Впервые проведено комплексное изучение образования ферритина у факультативного галофита *Mesembryanthemum crystallinum* L. (хрустальная травка) в зависимости от уровня железа в питательной среде и интенсивности окислительного стресса.

Показано, что внесение NaCl (300 мМ) в питательную среду резко снижало поступление железа ( $Fe^{3+}$ -ЭДТА) в растения и предотвращало появление симптомов токсичности при его избытке (750-1000 мкМ). Впервые установлено, что адаптация растений *M. crystallinum* к засолению сопровождала повышение устойчивости к

избытку железа, что свидетельствует о проявлении **кросс-адаптации** к двум стресс-факторам. Впервые с помощью электронно-микроскопического анализа продемонстрирована прямая зависимость уровня отложений ферритина в мезофилле листьев от содержания в них железа и интенсивности окислительного стресса. В листьях *M. crystallinum* впервые установлена экспрессия не менее двух генов ферритина (*McFer*), один из которых является ортологом гена *AtFer1* арабидопсиса и проявляет сходство по уровню экспрессии на окислительный стресс и избыток Fe.

Показано, что индукция паракватом (PQ) образования супероксид-радикала и перекиси водорода в листьях хрустальной травки повышала уровень мРНК генов ферритина и содержание белка. Напротив, спермидин, обладающий антиоксидантным свойством, тормозил экспрессию генов ферритина. Впервые экспериментально показано, что окислительный стресс индуцировал образование отложений ферритина в листьях хрустальной травки. Это указывает на антиоксидантную роль ферритина, связывающего восстановленную форму железа ( $Fe^{2+}$ ) – катализатора образования  $OH^\circ$ .

**Теоретическая и практическая значимость.** Детекция ферритина в листьях галофита *M. Crystallinum*, способы регуляции его содержания могут использоваться при создании трансгенных растений со сверхэкспрессией ферритина. Теоретические обобщения и совокупность экспериментальных данных работы могут использоваться в курсах лекций для студентов биологических факультетов ВУЗов страны.

**Апробация работы.** Результаты работы докладывались на годовом собрании общества физиологов растений России, Международной конференции «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений», Екатеринбург (2008 г); годовом собрании общества физиологов растений России, Международной конференции «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях крайнего Севера», Апатиты, Мурманская область (2009 г); Всероссийской конференции «Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды», Иркутск (2009 г).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ, из которых 1 – статья в журнале «Физиология растений».

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 121 страницах машинописного текста и содержит 2 таблицы, и 30

рисунков. Список цитируемой литературы включает 191 наименование, в т.ч. 172 иностранных.

### Объекты и методы исследования

**Объект исследования** – факультативный галофит *Mesembryanthemum crystallinum* L. (хрустальная травка) семейства *Aizoaceae*, способная на поздних этапах онтогенеза формировать стресс-индуцируемый водосберегающий механизм фотосинтеза САМ – типа (Adams et al., 1998; Kuznetsov et al., 1997; Winter, Holtum, 2007).

Растения выращивали в условиях водной культуры в камере фитотрона при 12- часовом световом периоде и мощности освещения 37,6 Вт/м<sup>2</sup> люминесцентных ламп Philips (F36W/54). Температура воздуха – 23±1°C/15±1 °C, относительная влажность воздуха – 55/70% день/ночь. Условия проведения опытов. Семена хрустальной травки были использованы из коллекции Лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации ИФР РАН. Опытные растения *M. crystallinum* составляли две возрастные группы: молодые (4-5 недель, фотосинтез С<sub>3</sub> -типа) и взрослые (8-9 недель, в фазе перехода на САМ-тип фотосинтеза). Молодые растения после образования 2-пар первичных листьев переносили на питательную среду с различным содержанием Fe – Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>-ЭДТА (рН=6.0): контроль (2 мкМ Fe<sup>3+</sup>-ЭДТА), дефицит Fe (без внесения Fe<sup>3+</sup>-ЭДТА), 3-я доза Fe (6 мкМ Fe<sup>3+</sup>-ЭДТА). Через две недели проводили отбор проб. Растения, составившие группу взрослых растений (8-9 недель), получали рассаживанием двухнедельных проростков сначала на питательную среду, содержащую 6 мкМ Fe<sup>3+</sup>-ЭДТА (контроль), на которой они произрастали в течение 14 д. до достижения 4-х недельного возраста. Затем растения культивировали по следующей схеме: контрольные растения (6 мкМ Fe<sup>3+</sup>-ЭДТА), дефицит Fe (без внесения Fe<sup>3+</sup>-ЭДТА), условный «избыток» (18 мкМ Fe<sup>3+</sup>-ЭДТА). Те же варианты с различным содержанием Fe создавали на фоне засоления (300 мМ NaCl), который присутствовал в последние 8 дней: (контроль + NaCl), (дефицит Fe + NaCl) и (избыток Fe + NaCl). В вариантах с действием засоления NaCl вносили в среду в течение 3 д. порциями по 100 мМ до конечной концентрации 300 мМ.

Для исследования дозовой зависимости действия железа на жизнедеятельность растений и характер изменения в листьях ответных реакций антиоксидантных ферментов, содержание железа, хлорофилла и уровня ПОЛ растения предварительно выращивали в течение 2 нед. на питательной среде (рН=6.0) в присутствии 6 мкМ Fe<sup>3+</sup>-ЭДТА. Затем растения разделяли на две части: одну часть переносили на

засоление до конечной концентрации 300 мМ NaCl на две недели, а другую часть оставляли в исходных условиях. Далее все растения культивировали с различным содержанием железа (6, 18, 50, 100, 150, 200 и 750 мкМ) в контрольных условиях или в условиях засоления в течение 2-3 нед. (общий возраст растений – 8-9 нед.).

Для биохимических анализов отобранные образцы растений фиксировали жидким азотом и хранили при – 70°C. В те же сроки проводили фиксацию проб для электронной микроскопии по стандартной методике (Парамонова и др., 2004).

Содержание **малонового диальдегида (МДА)** определяли методом, описанным Heath and Packer (1968). Содержание **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** определяли методом с использованием сульфата титана (Brennan and Frenkel, 1977). Содержание **свободного пролина** определяли по методу Bates с соавторами (1973). **Активность СОД** определяли по методу Beauchamp and Fridovich (1971). **Активность гваякол-зависимых пероксидаз** проводили по методу Ridge and Osborn (1971). **Концентрацию белка** в полученных ферментных препаратах измеряли по методу Esen (1978).

Экстракцию из растительного материала **валового Fe** проводили по методу Голубкиной (1995), а содержание определяли с помощью атомно-абсорбционного спектрофотометра ЛабИст-400 (Россия).

**Оценку уровня экспрессии генов ферритина** проводили методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Тотальную РНК выделяли из растительного материала кислым фенол-хлороформом (Kraap et al., 1993). Очистку от примесей ДНК, синтез кДНК проводили с использованием ферментов и реактивов фирмы «Fermentas» по протоколу производителя. ПЦР проводили в амплификаторах модели PTC1160 («BioRad», США) или Mastercycler personal («Eppendorf», Германия). Для оценки результатов ПЦР проводили электрофорез нуклеиновых кислот в 1% агарозном геле в присутствии бромистого этидия. **Специфические праймеры для генов ферритина хрустальной травки** конструировали с помощью филогенетических дендрограмм кДНК последовательностей соответствующих генов других растений с использованием базы данных Национальной медицинской библиотеки (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) в среде Vector NTI 9.0.0. Секвенирование кДНК последовательностей было проведено в ЦКП «Геном» института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта.

Электрофорез белковой фракции в денатурирующих условиях проводили в 15% полиакриламидном геле по стандартной методике (Laemmli U.K., 1970) на приборе Bio-Rad «Mini protein 3», США.

**Вестерн-блоттинг** проводили по Towin (1979) с использованием первичных поликлональных антител к ферритину гороха, которые были любезно предоставлены проф. Бриат (Монпелье, Франция). Вторичные антитела были конъюгированы пероксидазой хрена (Goat Anti-Rabbit IgG:HRP) производства «Stressgen», Канада.

Идентификацию ферритина и определение числа и размера пластоглобул в пластидах 6-ой пары первичных листьев проводили с помощью электронной микроскопии (электронный микроскоп JEM – 100СХП(JEOL) по стандартной методике (Парамонова и др., 2004, 2007) в совместных исследованиях с Н.В. Парамоновой, которой автор выражает глубокую благодарность.

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

### Результаты и обсуждение

#### Ответная реакция растений на изменение содержания $Fe^{3+}$ в питательной среде

Влияние дефицита и избытка железа на молодые растения. Как видно из рисунка 2а молодые растения, произраставшие при различном содержании  $Fe^{3+}$ , различались по общему содержанию Fe в листьях, уровень которого коррелировал с содержанием данного элемента в питательной среде. При этом в присутствии в среде 6 мкМ  $Fe^{3+}$ -ЭДТА корни аккумулировали его в десятки раз больше по сравнению с листьями (рис. 2б). Судя по образованию МДА, конечного продукта ПОЛ, интенсивность окислительного повреждения мембран листьев была наиболее высокой при дефиците железа особенно в корнях (рис. 2в). Для растений дефицитных по железу было характерно наименьшее содержание хлорофилла в листьях, что визуально проявилось в виде хлороза (рис. 2г). По полученным данным (рис.1) и внешнему виду растений (рис. 1) концентрация  $Fe^{3+}$  6 мкМ для хрустальной травки оказалась наиболее оптимальной для роста и развития. В дальнейших экспериментах эта концентрация была использована в качестве контроля.

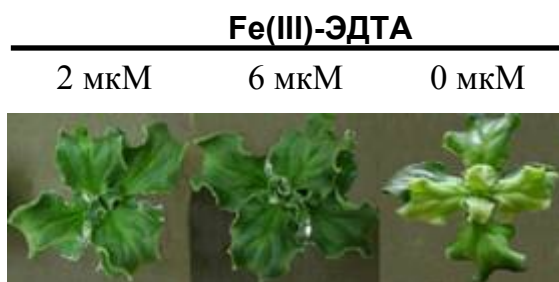


Рис. 1. Внешний вид молодых растений.



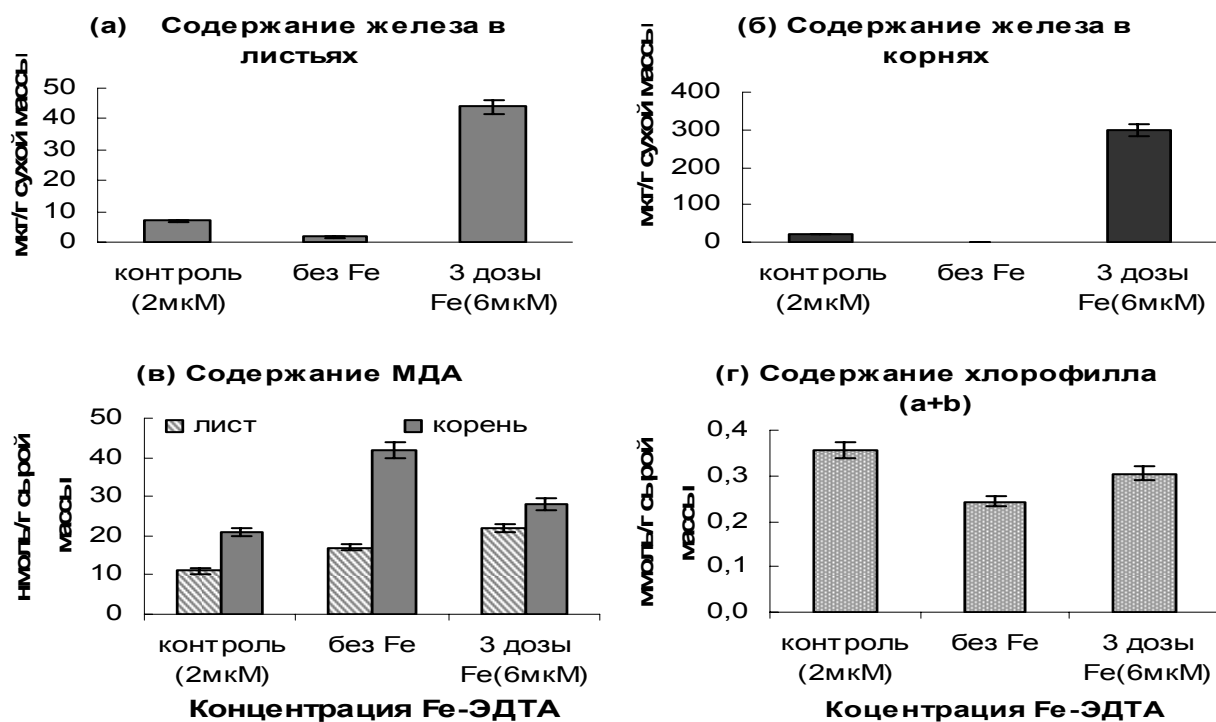


Рис. 2. Влияние статуса железа в питательной среде на содержание общего железа и перекисное окисление липидов в листьях и корнях молодых растений хрустальной травки: контроль (2 мкМ Fe<sup>3+</sup>-ЭДТА); без Fe (дефицит); 3 дозы Fe (6 мкМ Fe<sup>3+</sup>-ЭДТА).

Ответная реакция взрослых растений на изменение статуса Fe<sup>3+</sup> в среде выращивания в присутствии и отсутствии NaCl. По внешнему виду растений наибольшая биомасса первичных и вторичных листьев образовывалась при повышенной дозе железа (18 мкМ) как в присутствии, так и в отсутствии в среде NaCl (рис. 3в, 3е). Однако признаки дефицита железа в виде пожелтения листьев ярче проявились на среде без железа в присутствии засоления (рис. 3б, 3д).

Различия в ростовой активности растений и содержании в листьях хлорофилла (рис. 4б) были обусловлены изменением содержания Fe<sup>3+</sup> в последние 15 д. их культивирования. До этого растения в длительное время (в течение 21 дня)

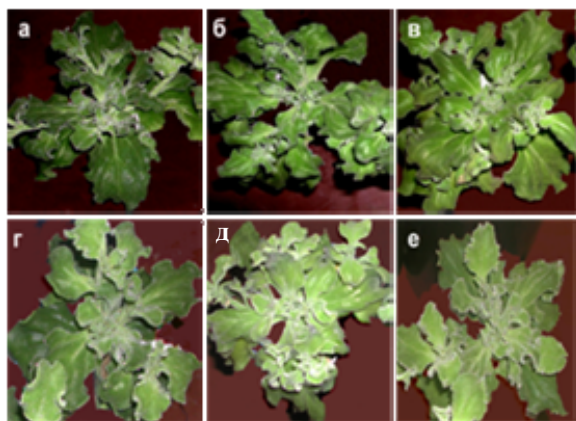


Рис. 3. Внешний вид взрослых растений хрустальной травки, произраставших на питательной среде с различным статусом Fe на контрольной среде (а - контроль (6 мкМ Fe<sup>3+</sup>-ЭДТА); б - без Fe (дефицит); в - «избыток» Fe (18 мкМ Fe<sup>3+</sup>-ЭДТА)) и последние 8 дней на среде с внесением 300 мМ NaCl (г - контроль (6 мкМ Fe<sup>3+</sup>-ЭДТА)+NaCl; д - без Fe (дефицит)+NaCl; е - «избыток» Fe (18 мкМ Fe<sup>3+</sup>-ЭДТА)+NaCl).

произрастали на среде с достаточным количеством железа (6 мкМ  $\text{Fe}^{3+}$ ). По этой причине у взрослых растений дефицит Fe не проявился в полной мере при культивировании на среде без железа, поскольку запасный пул Fe, возможно, не успевал израсходоваться. Тем не менее, самое яркое проявление хлороза наблюдалось у вторичных листьев взрослых растений, также произраставших предварительно на среде с 6 мкМ  $\text{Fe}^{3+}$ , а затем в течение 15 д. на среде без Fe, но в условиях засоления (рис. 3д и 4а), что положительно коррелировало с резким падением в них содержания хлорофилла (рис. 4а). В основе этого явления может лежать снижение поступления запасенного ранее Fe из стареющих в молодые растущие листья в условиях засоления. Вместе с тем, низкое содержание хлорофилла в листьях в условиях дефицита и даже “избытка” Fe могло иметь общую причину, связанную с развитием в условиях засоления окислительного стресса, поскольку хлоропласты являются главным источником генерации АФК в стрессорных условиях. Одним из свидетельств развития повреждений в клеточных мембранах, вызванное накоплением АФК, является повышение ПОЛ.

В листьях растений, произраставших в течение 15 д. на фоне избыточного содержания Fe (18 мкМ), интенсивность ПОЛ была выше контрольного уровня (рис. 4б), тогда как в присутствии NaCl при дефиците Fe и, особенно, при его “избытке” уровень МДА снижался (рис. 4б).

Обращает на себя внимание тот факт, что уровень Fe в питательной среде, не содержащей NaCl, практически не влиял на количество в листьях пролина – важного стресс - индуцируемого метаболита, в то время как в корнях, его содержание было наибольшим при дефиците Fe в среде (рис. 4в).

В присутствии NaCl при дефиците Fe на фоне стресс-индуцируемой аккумуляции пролина наиболее высокое его содержание отмечено в листьях (рис. 4в), что могло быть связано также с дефицитом железа.

Общая активность СОД в листьях в отсутствие NaCl в питательной среде повышалась как в варианте с дефицитом, так и с «избытком» Fe. В условиях засоления самая низкая активность этого фермента была в листьях в контроле (6 мкМ  $\text{Fe}^{3+}$ ), а самая высокая активность обнаруживалась в отсутствие в среде Fe (рис. 5а). В полном соответствии с уровнем активности СОД в листьях изменялась активность свободной гваяколовой ПО в листьях в контрольных условиях и на засолении (рис. 5а, 5б), тогда как активность ПО в корнях на засолении снижалась (рис. 5г).

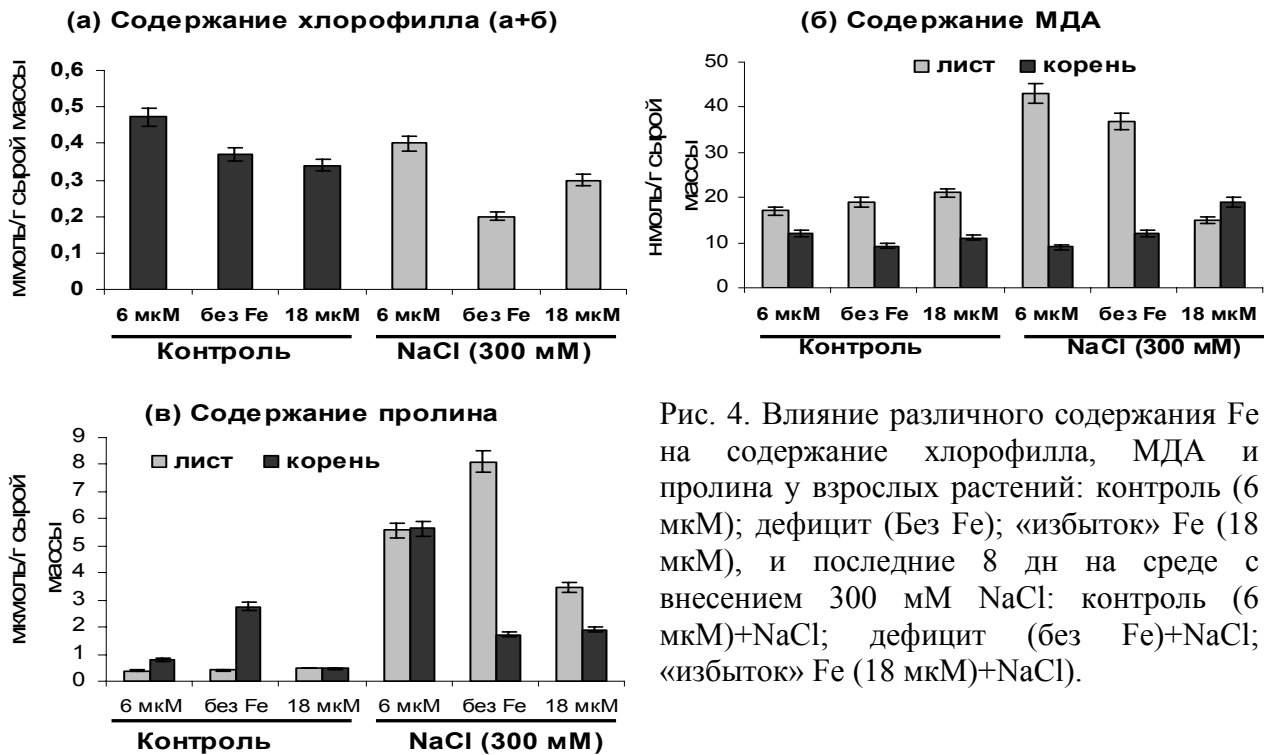


Рис. 4. Влияние различного содержания Fe на содержание хлорофилла, МДА и пролина у взрослых растений: контроль (6 мкМ); дефицит (Без Fe); «избыток» Fe (18 мкМ), и последние 8 дн на среде с внесением 300 мМ NaCl: контроль (6 мкМ)+NaCl; дефицит (без Fe)+NaCl; «избыток» Fe (18 мкМ)+NaCl.

Содержание перекиси водорода - продукта реакции дисмутации, катализируемой СОД, не коррелировало с изменениями активностей СОД и ПО (рис. 5в). Можно предположить, что при дефиците железа  $H_2O_2$ , образовавшийся в пластидах как продукт функционирования СОД, транспортировался в корневую систему, на что указывает его повышенное содержание в корнях (рис. 5в).

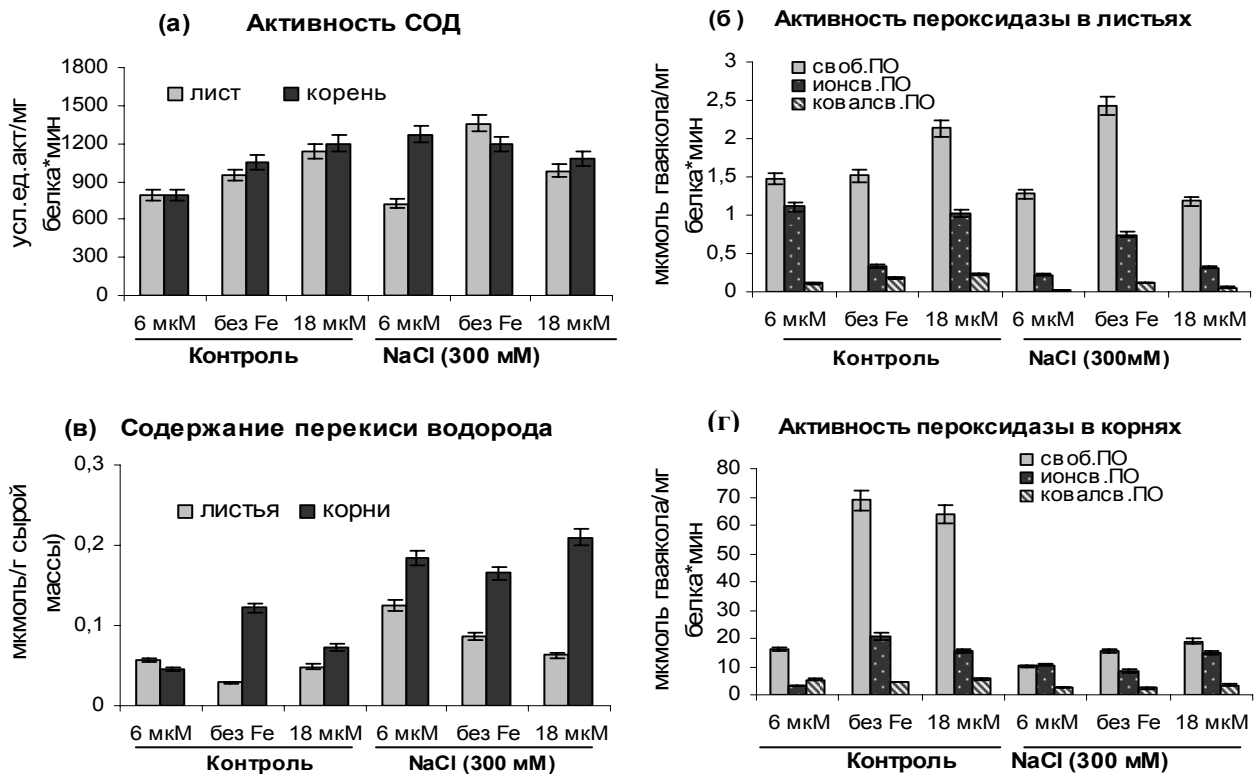


Рис. 5. Влияние изменения содержания Fe в условиях засоления на активность антиоксидантных ферментов (СОД, гваяколовой ПО) и содержание  $H_2O_2$  в листьях и корнях взрослых растений хрустальной травки: контроль (6 мкМ); дефицит (без Fe); «избыток» Fe (18 мкМ), и последние 8 дн на среде с внесением 300 мМ NaCl: контроль (6 мкМ)+NaCl; дефицит (без Fe)+NaCl; «избыток» Fe (18 мкМ)+NaCl).

Дозовая зависимость изменения содержания железа и состояния окислительного стресса в контрольных условиях и в присутствии NaCl в листьях хрустальной травки.

Засоление в значительной степени изменяло ответные реакции растений на присутствие в среде относительно невысоких доз железа. Можно предположить, что такая реакция связана с тем, что хрустальная травка является факультативным галофитом. В связи с этим возникла необходимость провести специальный опыт, где была сделана попытка сравнить 1) дозовую зависимость поступления железа в листья хрустальной травки на контрольной среде (без засоления) и в присутствии 300 мМ NaCl и 2) проследить в листьях характер изменения окислительного статуса.

У взрослых растений дозовая зависимость изменения содержания железа в листьях в области высоких концентраций 150-750 мкМ хелата железа в среде показала наличие корреляции в контрольных условиях (в отсутствии засоления). При более низких концентрациях железа (6-100 мкМ) отсутствовала корреляция между содержанием этого металла в среде и в листьях, что указывало на возможность регуляции поступления железа в этом диапазоне (рис.6). Однако, в присутствии NaCl (300 мМ) в диапазоне высоких концентраций железа в среде поступление его в листья было резко ограничено по сравнению с контрольными условиями. При этом растения меньше всего страдали от избытка железа, чем в контрольных условиях. Это наблюдалось как по внешнему виду растений (рис. 9), так и по содержанию МДА (рис. 6).

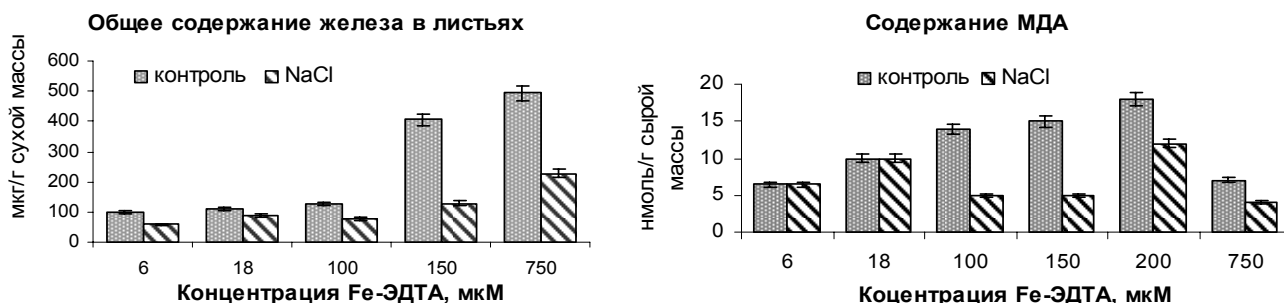


Рис. 6. Содержание общего железа и МДА в листьях взрослых растений при различной концентрации железа ( $Fe^{3+}$ -ЭДТА) в питательном растворе в контрольных условиях (контроль) и при засолении (NaCl, 300 мМ).

Повышение перекисного окисления липидов (ПОЛ) с увеличением в листьях содержания железа в контрольных условиях указывало на усиление в них

окислительных процессов. Вместе с тем, активность СОД – первого звена в каскаде антиоксидантной защиты, и свободной пероксидазы, практически не изменялись в листьях растений, культивируемых в пресных условиях (рис. 7).

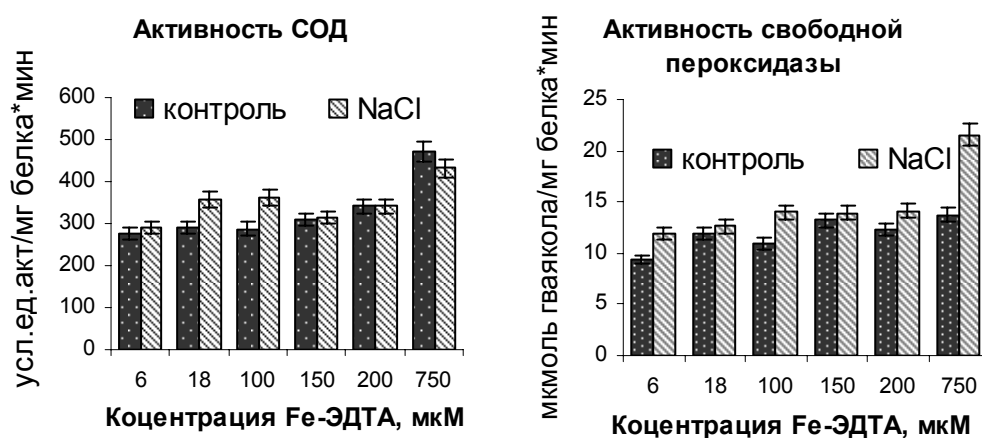


Рис. 7. Активность супероксиддисмутазы и свободной пероксидазы в листьях взрослых растений при различной концентрации железа ( $Fe^{3+}$ -ЭДТА) в питательном растворе в контрольных условиях (контроль) и при засолении (NaCl, 300 мМ)

Некоторое увеличение в активности СОД проявилось при токсичной концентрации железа (750 мкМ). При этом в листьях при токсичных дозах железа заметно повысилось содержание пролина (рис. 8), который мог выполнять антиоксидантную роль в этих условиях (Шевякова и др. 2009).

При совместном действии повышенных концентраций железа в среде и засоления (300 мМ NaCl) содержание хлорофилла ( $a+b$ ) было уже на порядок ниже, чем в контрольных условиях, что проявлялось также в изменении внешнего вида растений, а именно в обесцвечивании листьев. Тогда как уровень пролина резко повышался по мере увеличения концентрации железа в среде на фоне засоления (рис. 8).

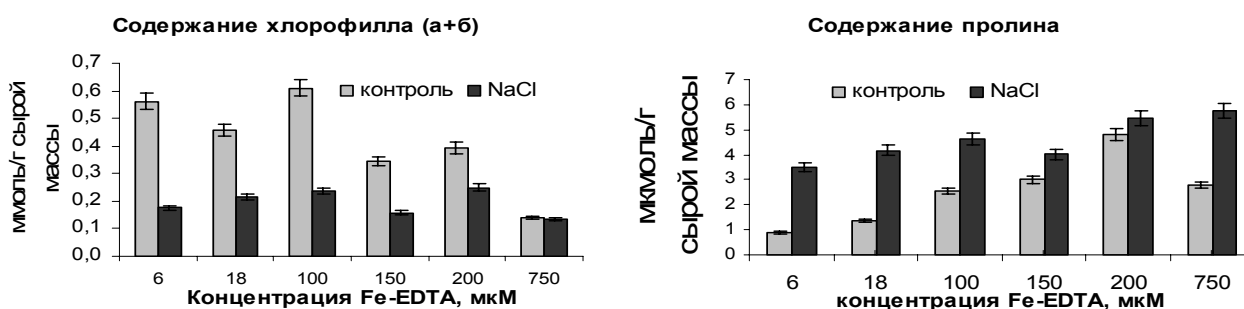


Рис. 8. Содержание хлорофилла ( $a+b$ ) и пролина в листьях взрослых растений при различной концентрации железа ( $Fe^{3+}$ -ЭДТА) в питательном растворе в контрольных условиях (контроль) и при засолении (NaCl, 300 мМ).

Концентрации 750 и 1000 мкМ хелата железа ( $\text{Fe}^{3+}$ -ЭДТА) в контрольной среде (без засоления) были летальными. Наиболее приемлемой концентрацией, при которой происходили изменения в биохимических показателях у растений, не сопровождавшихся появлением внешних признаков повреждения на листьях, можно считать 18 мкМ хелата железа в питательной среде (рис. 9).

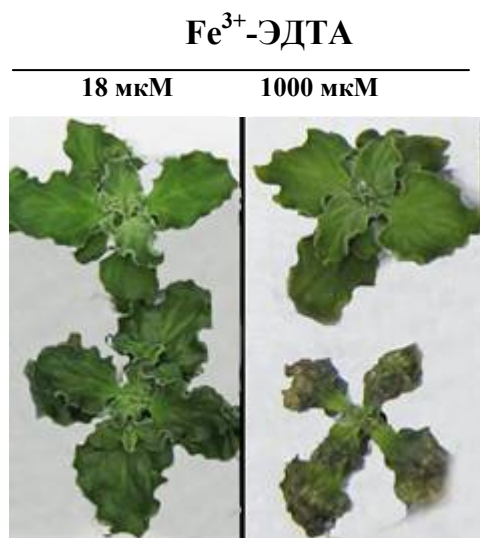


Рис. 9. Внешний вид растений хрустальной травки в конце культивирования.

В условиях засоления на фоне снижения поступления железа в растения изменение в листьях активности СОД, пероксидазы, которые могли бы свидетельствовать о состоянии окислительного стресса, были не столь значительны, но в то же время в них резко повысилась аккумуляция пролина как возможного антиоксиданта и понизилось содержание МДА, в том числе при высокой дозе железа в среде (750 мкМ) (рис. 6). При этом у растений, произраставших в условиях засоления (300 мМ NaCl), отсутствовали внешние отравления железом, которые присутствовали в контроле (рис. 9).

Таким образом, можно сделать вывод, что в условиях засоления происходило снижение поступления в растения железа, что способствовало нормализации метаболических процессов, что в конечном итоге препятствовало проявлению токсичности железа.

Влияние дефицита и “избытка“  $\text{Fe}^{3+}$  на состояние мембран, запасные включения и образование ферритина в пластидах в присутствии и в отсутствии в среде NaCl. Сравнение состояния мембранной системы и пластоглобул в двух контрольных вариантах (на фоне засоления и без него) показало, что при действии NaCl в некоторых пластидах наблюдалось набухание гран (рис. 10б, 10в, 11б, 11в) и появлялись отдельные включения ферритина (рис. 11г).

Парциальная площадь пластоглобул на срезе хлоропласта при засолении (рис. 11б) уменьшалась приблизительно в 2-3 раза по сравнению с контролем (рис. 10а, 10б). Уменьшение пластоглобул, очевидно, обусловлено их лизисом в присутствии NaCl. Так на рис.11а (увеличенный фрагмент из 11б) видны две пластоглобулы: с нормальной электронной плотностью и электроннопрозрачная, лизированная.

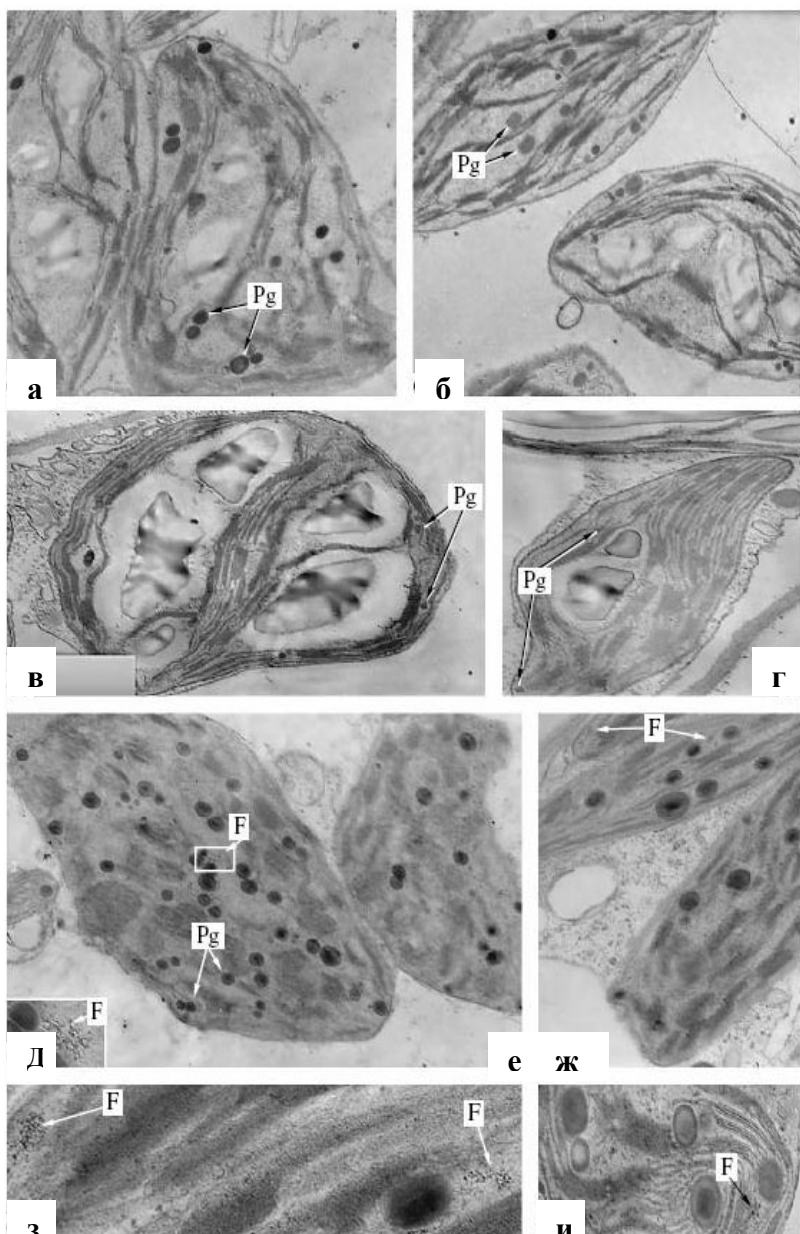


Рис. 10. Хлоропласты в листе хрустальной травки : а, б - в контроле; в, г - в варианте с дефицитом железа; д, е, ж, з, и - в варианте с избытком железа. а, б - хлоропласты содержат средних размеров пластоглобулы и крахмальные зерна (увел. 15000); в, г - в хлоропластах отмечается уменьшение объема пластоглобул (стрелки) (увел. 15000,); д - увеличенный фрагмент из «е», скопление гранул ферритина (стрелка) около пластоглобул (увел. 42000); е, ж - в хлоропластах увеличивается число и размеры пластоглобул и исчезает крахмал (увел. 20000), з, и - при избытке железа наблюдаются гранулы ферритина (стрелки), пластоглобулы в рис. «з» имеют различную электронную плотность в центральной части и на периферии (увел. 60000, 29000). F - ферритин, Pg - пластоглобулы

Сходные изменения в парциальном объеме пластоглобул на срез хлоропласта отмечались и при дефиците Fe на контрольной среде без NaCl (рис. 10в, 10г). В этом варианте в пластидах значительно уменьшались размеры пластоглобул, и они были более светлыми.

При дефиците Fe, но в условиях засоления (рис. 11д, 11е), число пластоглобул возрастало. Кроме того, в некоторых хлоропластах наблюдались набухшие тилакоиды гран (рис. 11е). При повышенной дозе  $Fe^{3+}$  (18 мкМ  $Fe^{3+}$ -ЭДТА) в отсутствии NaCl в питательной среде пластоглобулы были наиболее крупными, темной окраски (рис. 10д-10ж), нередко двуслойные с электронно-плотной центральной частью и более светлые на периферии (рис. 10з). В этом варианте был обильно представлен ферритин в виде групп гранул, которые часто контактировали с пластоглобулами (рис. 10д, 10з).

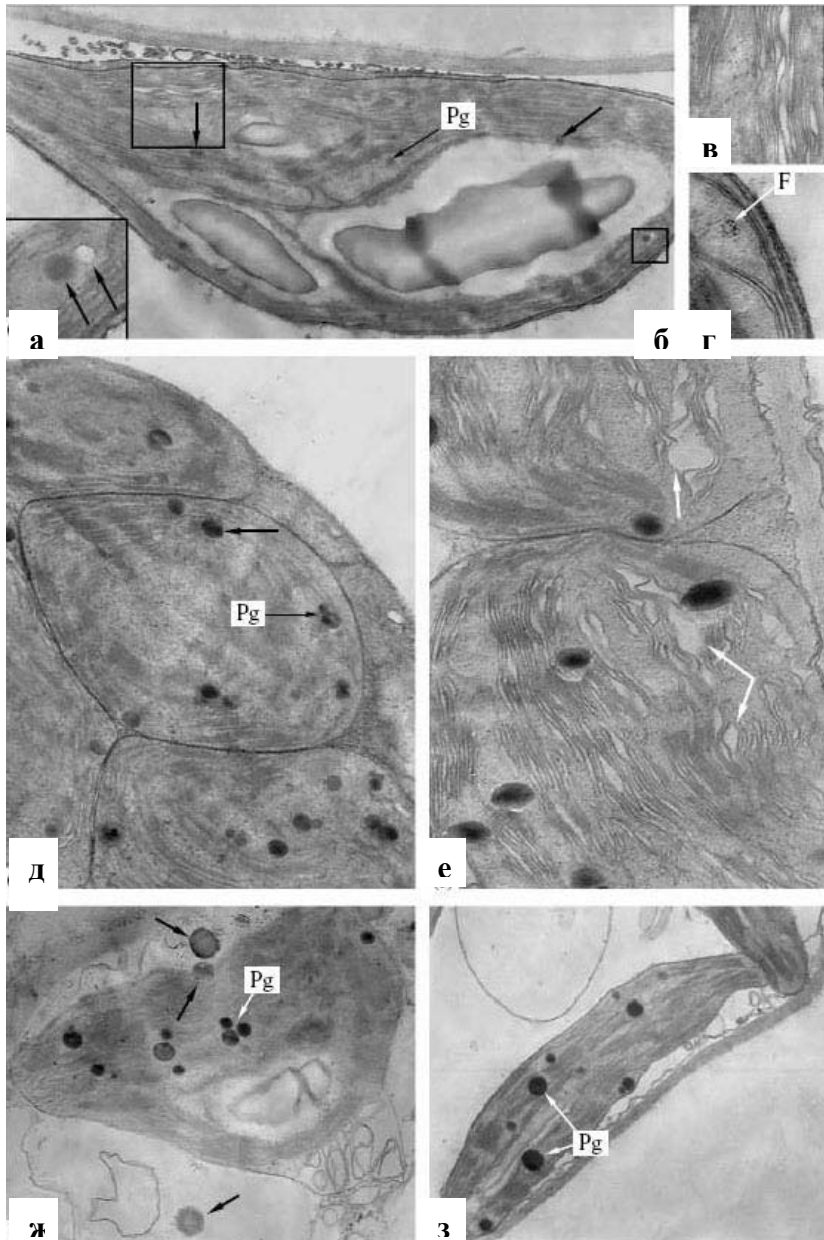


Рис. 11. Хлоропласты в вариантах с NaCl: а-г в контроле; д, е в варианте с дефицитом железа; ж, з – в варианте с избытком железа. а – увеличенный фрагмент из «б», стрелкой показана пластоглобулы, одна из которых лизирована (увеличение 94000); б – в хлоропласте стрелками показаны мелкие пластоглобулы, отмечаются крупные крахмальные зерна, (увеличение 27000); в – другой увеличенный фрагмент из «б», в тилакоидах гран отмечается набухание (увеличение 94000); г – в хлоропласте показана группа гранул ферритина (увеличение 90000); д – в хлоропластах стрелкой показаны пластоглобулы, крахмальные зерна отсутствуют, (увеличение 16000); е – в хлоропластах стрелками показаны сильно набухшие тилакоиды гран (увеличение 60000); ж, з – в хлоропластах при избытке железа на фоне засоления отмечались пластоглобулы (светлые стрелки), крахмальные зерна; темные стрелки указывают на липидные глобулы в цитоплазме, тилакоиды гран в нормальном состоянии (увеличение 15000).

У растений, произраставших в присутствии в 3 раза более низкой дозы Fe (6 мкмоль Fe<sup>3+</sup>) в контрольных условиях отложения ферритина в пластидах были обнаружены (рис. 11г), а пластоглобулы присутствовали в меньшем количестве, чем в случае совместного действия засоления и более высокой дозы железа (18 мкМ Fe<sup>3+</sup>-ЭДТА). Таким образом, в условиях засоления проявляется регуляция как поступления железа в листья (рис. 6), так и регуляция интенсивности образования ферритина (рис. 10, 11).

### Влияние окислительного стресса на экспрессию генов и содержание белка ферритина

Идентификация мРНК генов ферритина в листьях *Mesembrianthemum crystallinum* L. Гены ферритина у галофита *M. crystallinum* L. не были секвенированы.



Поэтому на первом этапе был проведен анализ (с помощью метода ОТ-ПЦР) транскриптов мРНК генов ферритина в листьях *M. crystallinum*. Для этой цели были подобраны праймеры по консервативным участкам генов ферритинов других растений. После оптимизации ПЦР, необходимо было удостовериться в том, что мы действительно работаем с этими генами. Для решения этой задачи, было проведено секвенирование нуклеотидной последовательности синтезируемого ампликона.

Для сравнения секвенированного ампликона с консервативными участками других генов использовали нуклеотидные последовательности генов ферритина следующих растений из базы данных NCBI:

|               |           |  |
|---------------|-----------|--|
| <i>BnFer</i>  | U68217    | ( <i>Brassicaceae; Brassica napus</i> )                  |
| <i>CbFerB</i> | DQ234389  | ( <i>Brassicaceae; Chorispora. Chorispora bungeana</i> ) |
| <i>BjFer</i>  | ACM47495  | ( <i>Brassicaceae; Brassica juncea</i> )                 |
| <i>AtFer1</i> | AT5G01600 | ( <i>Brassicaceae; Arabidopsis thaliana</i> )            |
| <i>AtFer2</i> | AT3G11050 | ( <i>Brassicaceae; Arabidopsis thaliana</i> )            |
| <i>AtFer3</i> | AT3G56090 | ( <i>Brassicaceae; Arabidopsis thaliana</i> )            |
| <i>AtFer4</i> | AT2G40300 | ( <i>Brassicaceae; Arabidopsis thaliana</i> )            |

Анализ секвенированных последовательностей показал идентичность исследуемого ампликона с консервативными участками генов ферритинов других растений 67%, в листьях хрустальной травки экспрессируются не менее двух генов ферритина (*McFer*) и наибольшее сходство одного из генов наблюдается с геном *AtFer1 A.thaliana*, экспрессия которого было также обнаружено в листьях.

Изменение экспрессии генов в листьях при дефиците железа и его избытке. Так как, железо необходимо для образования ферритина, была изучена экспрессия мРНК и содержание белка в зависимости от уровня железа в среде культивирования.

Двухнедельный дефицит железа в питании растений приводил к задержке роста и развития, что наблюдалось по внешнему виду растений (пожелтение листьев, хлороз). Содержание железа в таких растениях уменьшилось. Как и предполагалось, дефицит железа в питании приводил к тому, что синтез мРНК в листьях не происходило (рис. 12) и содержание белка было незначительным (в следовых количествах).

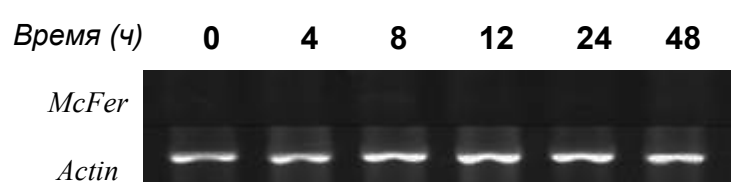


Рис. 12. Отсутствие экспрессии генов ферритина в листьях при дефиците железа в питательном растворе.

В листьях хрустальной травки после переноса растений из Fe-дефицитных условий на среду с 18 мкМ Fe<sup>3+</sup>-ЭДТА уровень мРНК возрастал уже в первые часы экспозиции растений. Максимальное количество наблюдалось к 8 ч.

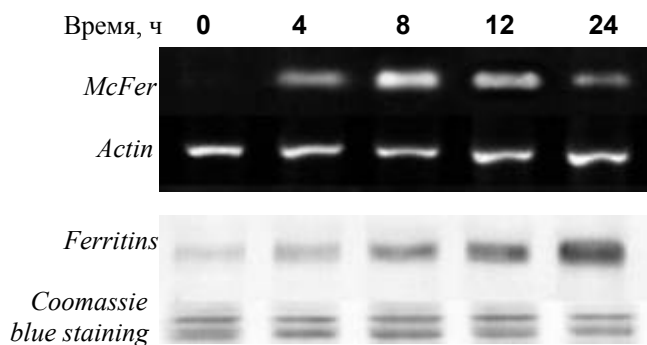


Рис. 13. Экспрессия генов *McFer* и содержание ферритина при экспозиции листьев после перенесения Fe-дефицитных растений на питательную среду с 18 мкМ Fe<sup>+3</sup>-ЭДТА

После 12 ч уровень мРНК снижался к 24 ч, к концу эксперимента. Увеличение в содержании ферритина происходило к 8ч и в 24ч наблюдалось наибольшее количество (рис. 13).

Таким образом, после переноса из дефицитных условий на 18 мкМ Fe в листьях хрустальной травки происходило увеличение уровня мРНК генов ферритина. Содержание самого белка увеличивалось в более поздние временные рамки. Механизмы регуляции биосинтеза ферритина интенсивно исследуются. Главным фактором, влияющим на метаболизм ферритина, является количество железа в организме. У животных и человека основным является посттранскрипционный механизм контроля. Судя по полученным нами данным, можно предположить, что регуляция образования ферритина в листьях хрустальной травки происходила на транскрипционном уровне.

Влияние про-оксиданта параквата на экспрессию генов ферритина. Исходя из роли ферритина не только как запасного пула железа в клетке, но и как «ловушки» токсичной формы железа (Fe<sup>2+</sup>) необходимо было изучить сигнальную роль АФК в регуляции образования ферритина. Нами были проведены опыты с обработкой листьев хрустальной травки паракватом–индуктором супероксидного стресса в пластидах (Радюкина и др., 2008; Шевякова и др., 2009).

Механизм развития окислительного стресса при действии параквата заключается во взаимодействии на свету фотосистемы I с ди-катионом параквата и образованием моно-катион радикала, который, в свою очередь, вызывает восстановление молекулярного кислорода до супероксид радикала (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Листья взрослых растений в возрасте 8-9 недель после наступления темного периода обрабатывали раствором PQ (100 мкМ) в Твине-80 (0,05%). После наступления светового дня проводили отбор проб с интервалом в 4 ч. Известно, что PQ, распределяясь в клетке, окисляется на свету именно в пластидах с образованием супероксид аниона, который дисмутирует в присутствии СОД в перекись водорода. Как следует из рисунка 14б активность СОД,

в обработанных PQ листьях, увеличивалась к 8ч экспозиции, что соответствовало максимуму экспрессии генов (рис. 14а). В последующем активность СОД снижалась и стабилизировалась после 12 ч, но на более высоком по сравнению с контролем уровне.

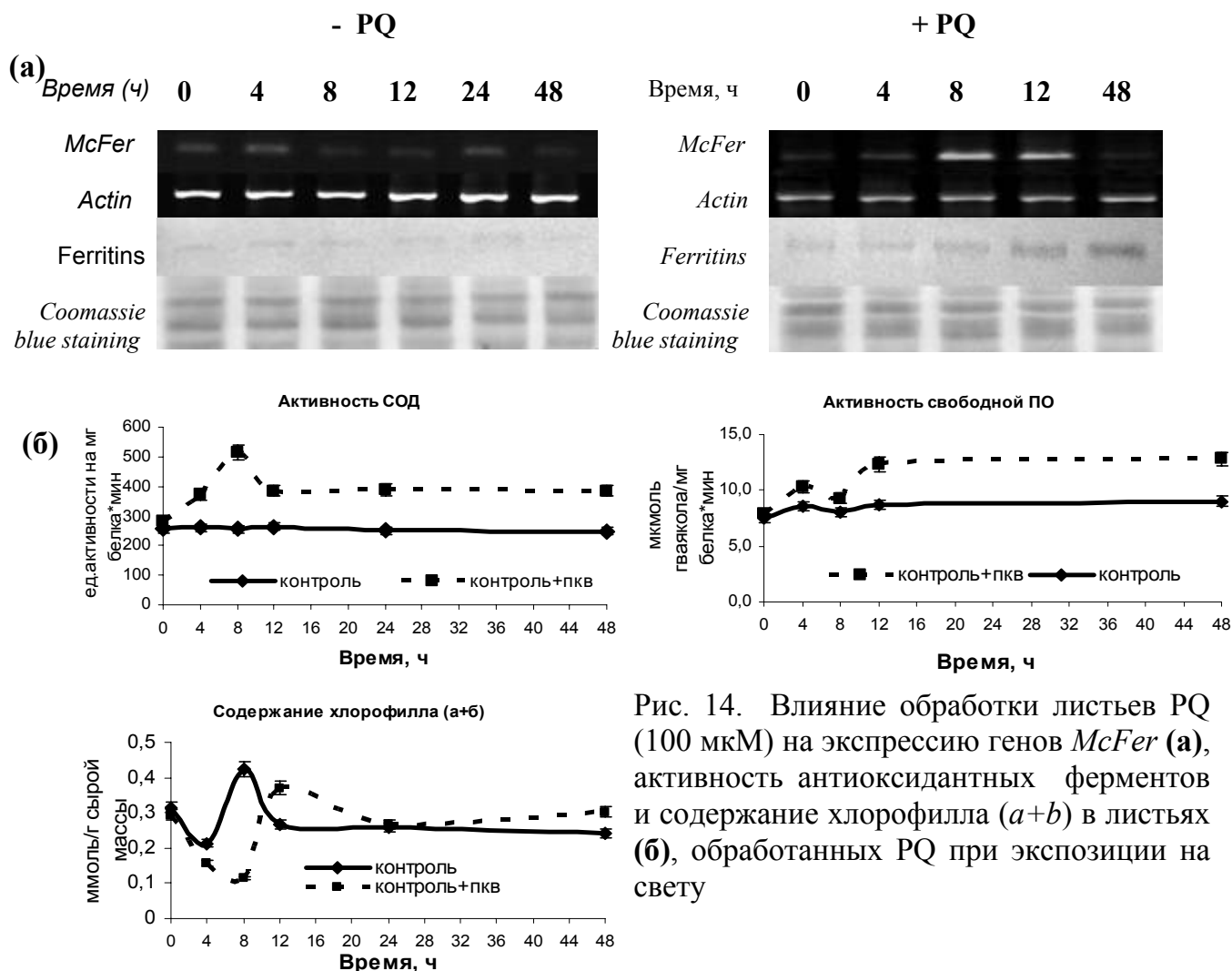


Рис. 14. Влияние обработки листьев PQ (100 мкМ) на экспрессию генов *McFer* (а), активность антиоксидантных ферментов и содержание хлорофилла (а+б) в листьях (б), обработанных PQ при экспозиции на свету

Активность свободной пероксидазы, которая является вторым звеном в каскаде реакций по детоксикации АФК увеличивалась к 12 часам действия света, а затем выходила на плато, сохраняя при этом более высокий уровень по сравнению с контролем. Эти данные демонстрировали динамику продуцирования паракватом  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ , которая совпадала с динамикой активации экспрессии мРНК генов (рис. 14а). Содержание белка увеличивалось после 8 ч экспозиции и наибольшее содержание наблюдалось к концу эксперимента.

Что касается снижения содержания хлорофилла в течение первых 8 часов света, а затем стабилизации к концу экспозиции, то в данном случае эти изменения следует объяснить разрушением хлорофилла (Matysik et al., 2002).

Таким образом, действие параквата, который повышает в клетках окислительный статус, индуцировало усиленный синтез мРНК и увеличивало содержание ферритина в листьях.

Поскольку хрустальная травка является солеустойчивым растением, предстояло выяснить, какие происходят изменения в экспрессии генов ферритина при действии параквата на растения, адаптированных к засолению. В связи с этим растения до обработки паракватом в течение 2-х недель выращивали в условиях засоления (300 мМ NaCl). Отбор проб проводили, как и в предыдущем опыте.

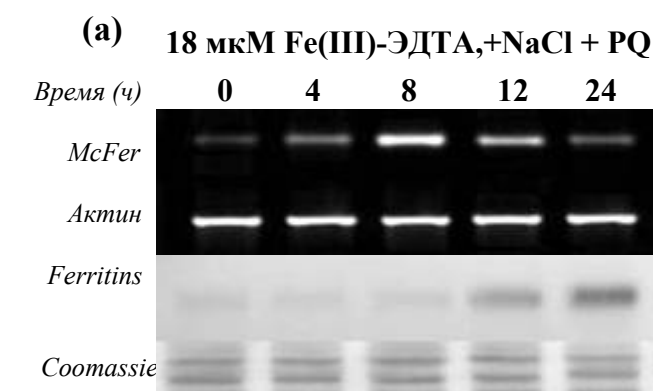
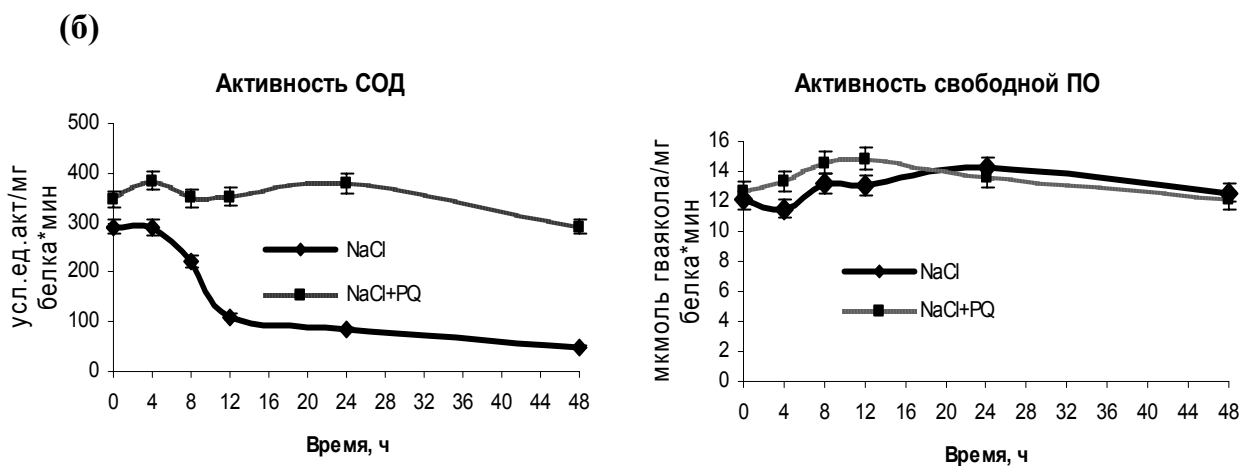


Рис. 15. Влияние обработки PQ листьев растений хрустальной травки, адаптированных к засолению, на экспрессию генов и содержание белка ферритина (а) и активность антиоксидантных ферментов (б).



Как видно из рисунка 15а изменения в экспрессии мРНК, наблюдаемые при действии параквата в условиях предварительной адаптации к хлоридному засолению демонстрировали увеличение ее уровня уже к 4 ч экспозиции на свету. Причем, наибольшее накопление наблюдалось к 8 ч. Можно предположить, что к этому времени происходили более быстрые изменения в ответной реакции листьев на индуцируемый паракватом окислительный стресс, но они были выражены в меньшей степени, чем в контрольных условиях. На это указывает изменения в активности антиоксидантных ферментов (рис. 15б). Общей тенденцией в изменении активности СОД и свободной гваяколовой пероксидазы было временное совпадение максимумов

с наибольшим уровнем экспрессии генов ферритина. При этом содержание ферритина повышалось после индукции синтеза мРНК и наибольшее его содержание было найдено в 24 ч экспозиции на свету.

Таким образом, индукция синтеза мРНК при действии параквата на растения хрустальной травки, предварительно произраставшие в условиях засоления, происходила в более ранние временные сроки.

Влияние обработки листьев спермидином на экспрессию генов ферритина.

Одним из косвенных доказательств действия АФК как индуктора включения биосинтеза ферритина может служить снижение экспрессии генов ферритина при обработке листьев антиоксидантами. Одним из таких антиоксидантов являются полиамины (Kuznetsov, Shevyakova, 2007; 2010).

В опытах применялась обработка листьев спермидином, как наиболее эффективного антиоксиданта из семьи полиаминов. На рис. 16а представлен характер изменения экспрессии генов ферритина в листьях хрустальной травки, предварительно выращенных в условиях различного снабжения железом, а затем обработанных 1мМ спермидином в 0,05% водном растворе Твин-80 перед наступлением ночного периода. Взятие проб для молекулярных и биохимических анализов осуществлялось на следующий день.

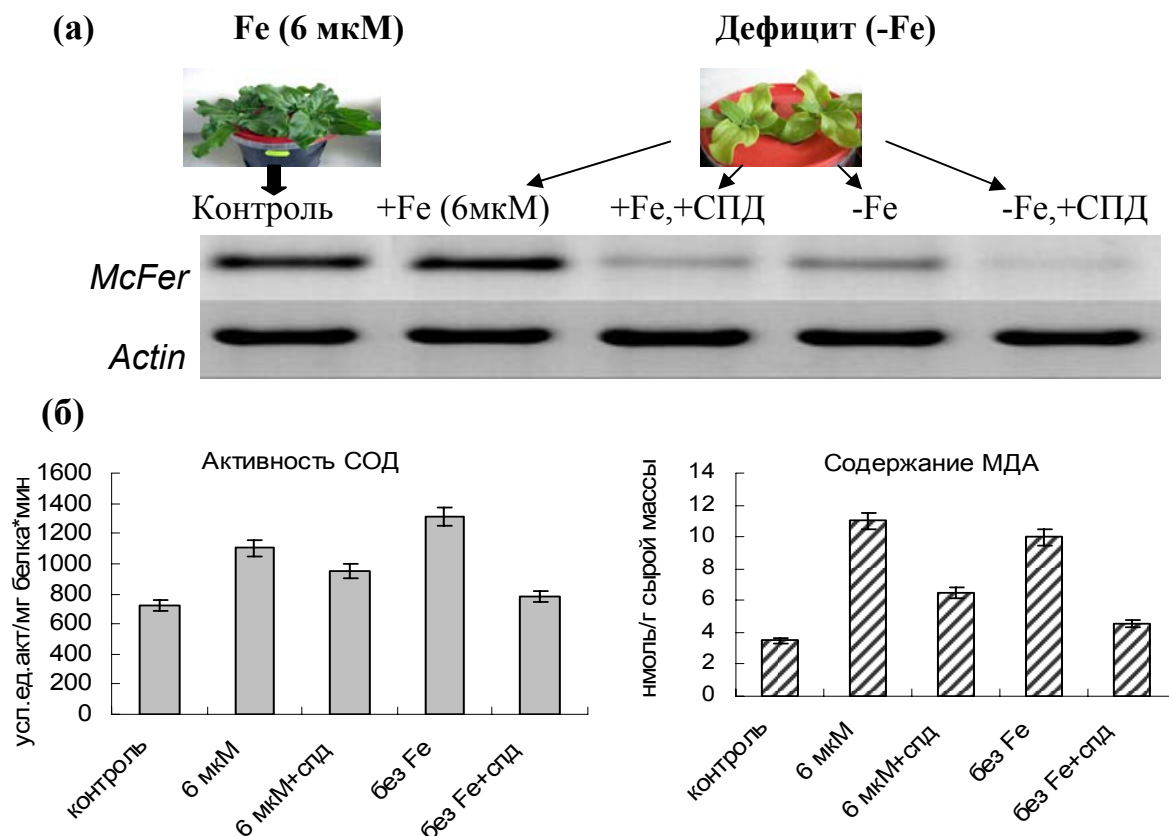


Рис. 16. Влияние спермидина на экспрессию генов ферритина (а) и состояние окислительного стресса (б) в листьях хрустальной травки с различным статусом железа.

Как видно из рисунка 16а в отсутствии железа экспрессия мРНК ферритина была минимальна. В то же время у растений, перенесенных на 2-е недели с Fe-дефицитных условий на норму Fe, уровень матриц мРНК был максимальным. Обработка спермидином растений, произраставших как в условиях дефицита, так и после переноса на нормальное снабжение железом, экспрессия генов ферритина резко снижалась. Данные биохимических анализов, представленные на рисунке 16б, показали, что обработка листьев спермидином понизила в них степень окислительных повреждений (ПОЛ) и активность СОД, что указывало на снижение уровня окислительных реакций.

Полученные результаты по торможению экспрессии мРНК ферритина при действии спермидина как “ловушки“ АФК свидетельствуют о том, что у хрустальной травки окислительный стресс служит сигналом для ускорения образования в листьях отложений ферритина. Исходя из этих данных, можно считать, в условиях окислительного стресса ферритин может выступать защитным фактором, предотвращая накопление в клетках восстановленной формы железа ( $Fe^{2+}$ )– катализатора образования  $OH^\circ$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Способность Fe, важного для жизнедеятельности растений эссенциального металла, в восстановленной форме ( $Fe^{2+}$ ) вступать в реакции с кислородом с образованием гидроксил радикала ( $OH^\circ$ ), создает необходимость, поддерживать в клетках гомеостаз железа, не допускающий накопления этой формы. Такое нарушение гомеостаза железа у растений может возникать в стрессорных условиях, индуцирующих окислительный стресс, и в условиях загрязнения железом.

Одним из уникальных механизмов, препятствующих проявлению токсичности  $Fe^{2+}$  при его избыточном образовании в клетках, может являться функционирование желесодержащего белка негеминовой природы ферритина, запасующего Fe в окисленной нетоксичной форме ( $Fe^{3+}$ ).

В проведенных исследованиях изучали зависимость накопления ферритина в листьях галофита *Mesembryanthemum crystallinum* L. от содержания железа, развития окислительного стресса у растений в условиях засоления и моделирования интенсивности окислительного стресса с помощью про-оксиданта параквата (PQ) и антиоксиданта спермидина.

Установили, что усиление образования супероксид-радикала и перекиси водорода при обработке листьев PQ повышало экспрессию мРНК генов и содержание белка ферритина, а “тушение“ АФК обработкой спермидином подавляло. Впервые

установлено, что ферритин, связывая токсичную форму железа в условиях активации в растениях окислительного стресса и поступления избыточного железа, препятствует накоплению в клетках  $Fe^{2+}$  – катализатора образования  $OH^\circ$ , т.е. выступает как защитный фактор.

Впервые показано также, что внесение NaCl (300 мМ) в питательную среду резко снижало поступление железа ( $Fe^{3+}$ -ЭДТА) в растения и предотвращало появление симптомов токсичности при его избытке (750-1000 мкМ). Этот эффект можно рассматривать как проявление механизма **кросс-адаптации**, обнаруженного ранее (Кузнецов, 1990). В данном случае этот эффект проявился как адаптация галофита хрустальной травки к двум отрицательным факторам: засолению и высокой концентрации железа.

### ВЫВОДЫ

1. Различное количество доступной формы  $Fe^{3+}$  в питательной среде положительно коррелировало с содержанием железа в листьях и корнях молодых растений *Mesembryanthemum crystallinum* L. и изменяло в них интенсивность окислительного стресса, о чем судили по активности СОД, гваяколовой ПО, содержанию МДА,  $H_2O_2$ , хлорофилла и пролина.
2. Предварительное засоление NaCl (300 мМ) в течение двух недель повышало устойчивость взрослых растений к действию высоких концентраций железа (200-1000 мкМ  $Fe^{3+}$ -ЭДТА) путем ингибирования поступления  $Fe^{3+}$  в листья, что свидетельствует о проявлении кросс-адаптации к двум стресс-факторам.
3. Установлено, что в листьях *M. crystallinum* экспрессируется не менее двух генов ферритина, один из них, вероятно, является ортологом гена *AtFer1* арабидопсиса.
4. Установлено, что уровень мРНК генов ферритина в листьях снижается при дефиците Fe и резко увеличивается при восстановлении питания растений железом. Увеличение содержания белка прямо пропорционально увеличению уровня мРНК, но сдвинуто по времени на несколько часов.
5. Обработка листьев паракватом (100 мкМ) повышала экспрессию генов ферритина и содержание белка, а обработка спермидином (1 мМ) снижала уровень мРНК как на фоне дефицита Fe, так и при возобновлении питания растений Fe.
6. Полученные результаты по действию параквата, как индуктора окислительного стресса, на экспрессию генов ферритина и спермидина, как антиоксиданта, свидетельствуют в пользу проявления ферритином свойств “ловушки“ токсичной формы железа.

**По материалам диссертации опубликованы следующие работы:**

1. Шевякова Н.И., **Ешинимаева Б.Ц.**, Парамонова Н.В. (2008). «Уровень ферритина в пластидах хрустальной травки определяется содержанием железа и интенсивностью окислительного стресса» // Материалы Международной конференции «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений» (Екатеринбург, 06-11 октября 2008г.), Екатеринбург. 2008. С. 437 – 439.
2. Парамонова Н.В., **Ешинимаева Б.Ц.** (2008). «Электронно-микроскопическое исследование пластоглобул в хлоропластах *Mesembryanthemum crystallinum L.* при различном статусе железа в условиях засоления» // Материалы Международной конференции «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений» (Екатеринбург, 06-11 октября 2008г.), Екатеринбург. 2008. С. 322 – 323.
3. Шевякова Н.И., **Ешинимаева Б.Ц.**, Парамонова Н.В., Кузнецов Вл.В. (2009). «Влияние различных доз железа на развитие окислительного стресса и образование ферритина у растений *Mesembryanthemum crystallinum L.*» // Физиология растений, 2009 г., том 56, №4, стр.518-529.
4. **Ешинимаева Б.Ц.**, Шевякова Н.И., Кузнецов Вл.В. (2009). «Исследование взаимосвязи экспрессии гена ферритина и окислительного стресса у *Mesembryanthemum crystallinum L.*» // Международная конференция «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях крайнего Севера», Апатиты, Мурманская область, 7-11 июня 2009 г., стр. 122-123.
5. Парамонова Н.В., **Ешинимаева Б.Ц.**, Шевякова Н.И. (2009). «Влияние NaCl на содержание крахмала в хлоропластах *Mesembryanthemum crystallinum L.*, при различном статусе железа» // Международная конференция «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях крайнего Севера», Апатиты, Мурманская область, 7-11 июня 2009 г., стр. 259-260.
6. **Ешинимаева Б.Ц.**, Шевякова Н.И., Парамонова Н.В., Кузнецов Вл.В. (2009) «Развитие окислительного стресса и образование ферритина у *Mesembryanthemum crystallinum L.* при действии засоления и различных доз железа» // Всероссийская конференция «Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды», Иркутск, 24-28- августа 2009 г., стр. 154-157.