

На правах рукописи



Иванов Юрий Валерьевич

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА
ПОЛИАМИНОВ У ГАЛОФИТОВ И ГЛИКОФИТОВ
ПРИ ЗАСОЛЕНИИ И УФ-В ОБЛУЧЕНИИ**

03.00.12 – Физиология и биохимия растений

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва – 2008

Работа выполнена в лаборатории молекулярных и физиологических механизмов адаптации Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН и в Институте сельскохозяйственной биологии и биотехнологии Национального совета по научным исследованиям Италии (Италия, Милан)

Научный руководитель:

кандидат биологических наук Радюкина Наталия Львовна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Кириченко Евгений Борисович

кандидат биологических наук, доцент Пильщикова Наталия Владимировна

Ведущая организация: Вологодский государственный педагогический университет

Защита состоится «17» июня 2008 г. в 13.00 ч на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Институте 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

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан «15» мая 2008 года.

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



Азаркович М.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В результате интенсивной хозяйственной деятельности человека в последнее время произошло увеличение воздействия на растения неблагоприятных факторов среды. Особенно масштабным стало действие таких факторов как засоление, тяжёлые металлы, усиление ультрафиолетового излучения, химические загрязнители. Засоление, ультрафиолетовая радиация, совместное их действие приводит к значительному снижению выхода сельскохозяйственной продукции и большим экономическим потерям. Исследование механизмов адаптации растений к действию абиотических факторов занимает ключевое положение в современной науке.

Общим характерным признаком действия стрессоров, является усиление генерации активных форм кислорода, связанное, в первую очередь, с нарушением структуры и функций клеточных мембран, органелл клетки. В условиях окислительного стресса антиоксидантные ферменты могут быстро инактивироваться активным кислородом, и для индукции их синтеза *de novo* требуется определённое время. Возможно, по этой причине в антиоксидантной системе защиты принимают участие и низкомолекулярные антиоксиданты, к которым относят и полиамины (путресцин, спермидин, спермин и кадаверин).

К настоящему времени роль полиаминов в растениях при действии различных видов стресса остаётся до конца не выясненной. Большинство работ о роли полиаминов при стрессе, было выполнено на ограниченном числе модельных объектов. В связи с этим представляются важным изучение и оценка потенциала устойчивости растений различных экологических групп при действии индивидуальных абиотических факторов, и их комплекса и вклада полиаминов в формирование защитного ответа. Такие исследования позволяют расширить понимание механизмов кросс-адаптации, что открывает большие перспективы для сельского хозяйства и сохранения биоразнообразия.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось сравнительное исследование дифференциальной экспрессии генов ферментов биосинтеза полиаминов на фоне изменения их эндогенного уровня у галофитов и гликофитов при действии засоления и облучении ультрафиолетом В.

Задачи исследования:

1. Сравнить потенциал устойчивости исследуемых растений (*Thellungiella halophila* Mey., *Plantago major* L., *Geum urbanum* L.) к действию хлорида натрия и ультрафиолета В.

2. Изучить особенности изменений в содержании и спектре свободных полиаминов семейства путресцина при действии на растения NaCl.

3. Провести анализ профиля экспрессии генов биосинтеза полиаминов при действии NaCl у растений *Thellungiella halophila* Mey. и *Plantago major* L.

4. Изучить особенности изменений в содержании и спектре свободных полиаминов семейства путресцина при действии на растения ультрафиолета.

5. Провести анализ профиля экспрессии генов биосинтеза полиаминов при действии ультрафиолета у растений *Thellungiella halophila* Mey. и *Plantago major* L.

6. Исследовать содержание кадаверина и экспрессию гена лизиндекарбоксилазы при действии NaCl и УФ-В у *Thellungiella halophila* и *Plantago major*.

Научная новизна. Впервые изучена динамика стресс-зависимой экспрессии генов ферментов биосинтеза полиаминов у контрастных по устойчивости к ультрафиолету и засолению дикорастущих видов растений. Выявлены существенные различия в изменении содержания полиаминов и экспрессии генов ферментов их биосинтеза у одного и того же вида растения при действии различных стрессовых факторов. Впервые показано, что в отличие от засоления действие УФ-В облучения индуцирует органоспецифичный синтез кадаверина у *Thellungiella halophila* Mey. в листьях и у *Plantago major* L. в корнях.

Практическая значимость. Полученные данные об изменении содержания и спектра полиаминов при действии засоления и УФ-В, а также изменение

экспрессии генов их биосинтеза под действием этих факторов имеют большое значение для понимания формирования адаптивных процессов у галофитов и гликофитов. Полученные данные могут быть использованы в практике растениеводства, а теоретические обобщения – для разработки курсов лекций для студентов биологических специальностей.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на 10-й Пушкинской школе-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2006); I (IX) Международной конференции молодых ботаников (Санкт-Петербург, 2006); VI Международной конференции молодых учёных Леса Евразии – Венгерский лес (Венгрия, Шопрон); V международной школе-семинаре по экологии (Пушино, 2006); VII Международной конференции молодых учёных Леса Евразии – Русский север (Петрозаводск, 2007).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано и направлено в печать 18 печатных работ, из которых 3 – статьи в основном журнале по специальности «Физиология и биохимия растений» - «Физиология растений».

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Материалы диссертации изложены на 122 страницах машинописного текста и содержат 3 таблицы, 14 формул и 53 рисунка. Список цитируемой литературы включает 230 наименований, в т.ч. 215 иностранных.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования: *Thellungiella halophila* – представитель семейства *Brassicaceae*, обладает высокой устойчивостью к различным видам абиотического стресса: к низкой влажности воздуха, к замораживанию и высокой засолённости. Благодаря малому размеру генома и родству с *Arabidopsis thaliana*, является модельным объектом для изучения устойчивости к абиотическим стрессам (Zhu, 2000; Bressan et al., 2001; Volkov et al., 2004; Gong et al.,

2005; Griffith et al., 2007).

Plantago major. Подорожник большой – представитель семейства *Plantaginaceae*, растет почти на всех типах почв, характеризуется устойчивостью к действию высокогорной ультрафиолетовой радиации (Hong-Xu Ren et al., 1999; Samuelsen, 2000; Vicente et al., 2004).

Geum urbanum. Гравилат городской – многолетнее травянистое растение семейства *Rosaceae*, к условиям произрастания малотребователен, зимостоек и засухоустойчив, к действию засоления слабоустойчив (Радюкина, Иванов и др., 2007a).

В условиях водной культуры растения выращивали в камере фитотрона при 12-часовом световом периоде и мощности освещения 37,6 Вт/м² люминесцентных ламп Philips (F36W/54). Температура воздуха – 23±1°C/15±1°C, относительная влажность воздуха – 55/70% день/ночь.

Условия проведения опытов. Растения переносили на питательный раствор, содержащий хлорид натрия в концентрации 100 мМ и выращивали в течение 4-х сут. Пробы листьев и корней интактных растений отбирали через 12, 18, 24, 48, 72, 96 ч экспозиции растений в присутствии 100 мМ NaCl, фиксировали жидким азотом и хранили при температуре -70°C до проведения анализов.

Растения при обработке УФ-В переносили в камеру с ультрафиолетовыми лампами и облучали в течение 10, 20, 30 мин (дозы облучения 12,3 кДж/м², 24,5 и 36,8 кДж/м²). После облучения растения помещали в камеру фитотрона для фотореактивации и через 24 ч отбирали пробы листьев и корней интактных растений, фиксировали жидким азотом и хранили при -70°C.

Свободные полиамины в растительной ткани определяли в виде их бензоильных производных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (Flores and Galston, 1982).

Оценку уровня экспрессии генов ферментов биосинтеза полиаминов проводили методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Общую РНК выделяли из растительного материала с использовани-

ем RNaseasy Plant Mini Kit («Qiagen», Германия). Синтез кДНК проводили методом обратной транскрипции с использованием ферментов и реактивов фирмы «Fermentas». ПЦР проводили в амплификаторе модели PTC1160 («BioRad», США). Для оценки результатов ПЦР проводили электрофорез нуклеиновых кислот в 1,3% агарозном геле в присутствии бромистого этидия.

Специфические праймеры для проведения ПЦР генов биосинтеза полиаминов конструировали с использованием кДНК последовательностей соответствующих генов *A. thaliana*, *Th. halophila* и *P. major* базы данных Национального Центра биотехнологической информации США, Национальной медицинской библиотеки (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) в среде Vector NTI 9.0.0, InforMax.

Определение количества **перекиси водорода** проводили колориметрическим методом, основанном на образовании окрашенного комплексного соединения – пероксида титана (Brennan, Frenkel, 1977). **Активность каталазы** определял методом Maehly and Chance (1954). Общую активность **супероксиддисмутазы** определяли по методу Beauchamp, Fridovich (1971). В качестве конкурента СОД за супероксид радикалы использовали нитросиний тетразолий.

Эксперименты проводили в 3-х кратной биологической повторности. Результаты обрабатывали общепринятыми методами статистики (Вольф, 1966; Зайцев, 1984).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Действие хлорида натрия

Для определения устойчивости растений к действию NaCl и выявлению летальных концентраций был проведен ряд экспериментов (Радюкина, Иванов и др, 2007а, 2007б), в которых установлено, что концентрация 100 мМ NaCl является стрессовой для всех исследуемых растений.

Thellungiella halophila

Исследование ферментов антиоксидантной защиты показало снижение активности супероксиддисмутазы (СОД) в корнях на фоне увеличения экспрессии гена *Cu-Zn/СОД*, что возможно связано с ингибированием фермента при действии NaCl (M'rah et al., 2006). В листьях, напротив, отмечается значительное увеличение активности СОД в течение 24 ч действия NaCl. Увеличение активности коррелировало с увеличением экспрессии гена *Cu-Zn/СОД* за 18 ч.

Динамика активности СОД и каталазы в растениях *Th. halophila* согласуется с галофитной природой данного растения и указывает, что данная концентрация 100 мМ является стрессовой.

Действие 100 мМ NaCl на растения *Th. halophila* вызывало увеличение общего содержания свободных полиаминов в корнях и листьях в первые сутки эксперимента (рис. 1). В последующие 48 ч в этих частях растений содержание свободных полиаминов снижалось, причём наиболее интенсивно в корнях.

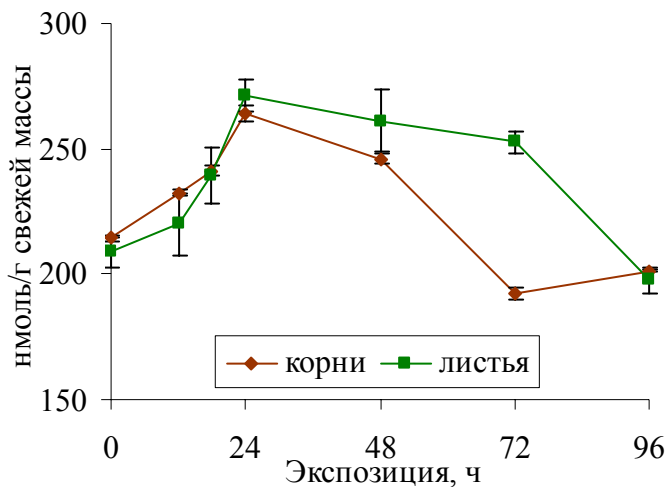


Рисунок 1 – Общее содержание свободных полиаминов в растениях *Th. halophila* при действии 100 мМ NaCl

В динамику общего содержания свободных ПА в корнях и листьях наибольший вклад вносило изменение содержания спермидина (Спд). Хотя уровень путресцина (Пут) был низким, в течение первых суток воздействия происходило увеличение его содержания, особенно заметное в листьях (рис. 2).

Увеличение содержания Пут коррелировало с усилением экспрессии гена аргининдекарбоксилазы (особенно в листьях) через 12 ч действия NaCl (рис. 3).

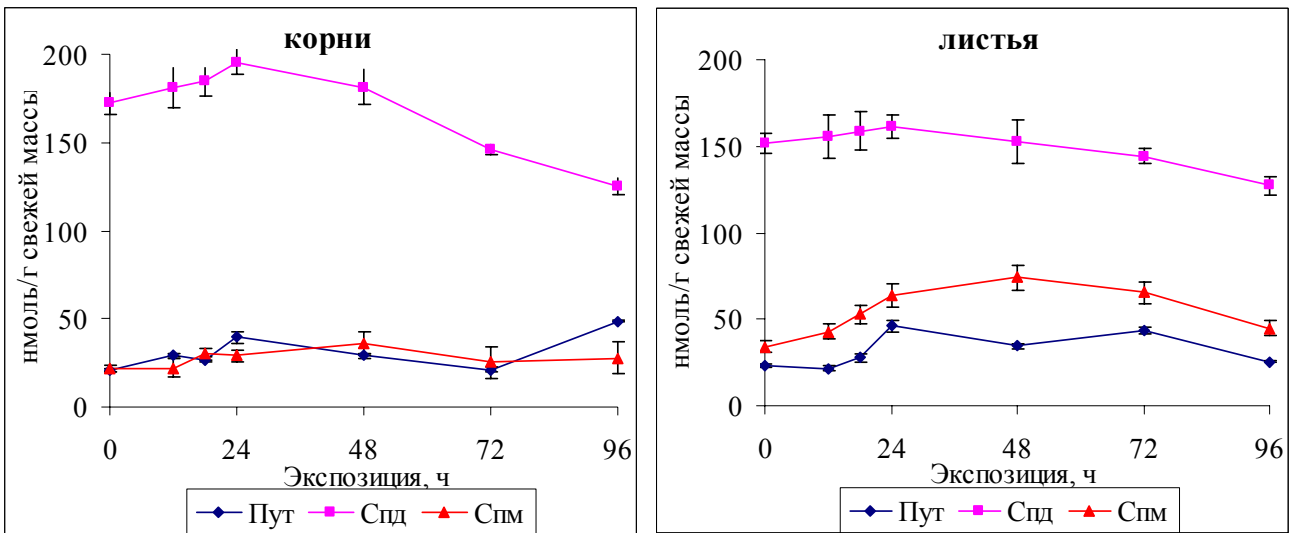


Рисунок 2 – Спектр свободных ПА в растениях *Th. halophila* при действии 100 мМ NaCl

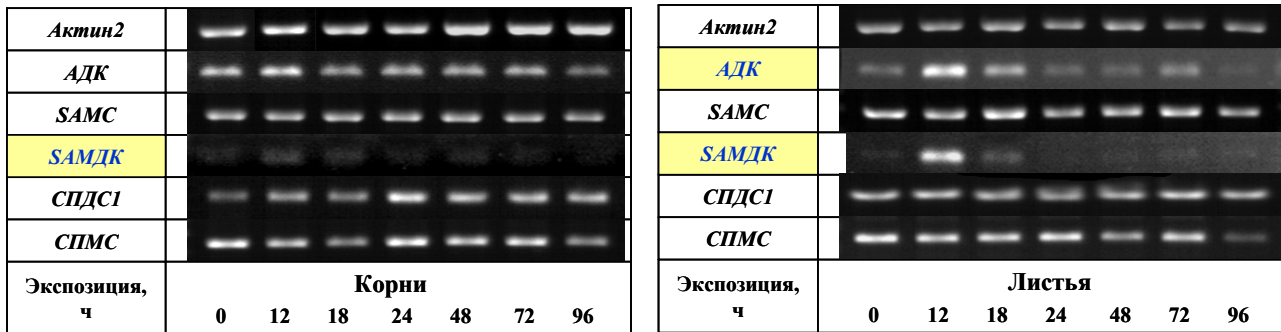


Рисунок 3 – Профили экспрессии генов ферментов биосинтеза ПА в растениях *Th. halophila* при действии 100 мМ NaCl

Исследование экспрессии генов, кодирующих ферменты следующих этапов биосинтеза ПА показало, что через 12 ч после начала действия засоления увеличивается уровень транскрипта гена S-аденозилметиониндекарбоксилазы (*SAMДК*) – ключевого фермента биосинтеза ПА. Особенно заметно это увеличение в листьях растений.

Наблюдаемое в течение первых суток действия NaCl в корнях и листьях увеличение содержания эндогенного Спд коррелировало с увеличением экспрессии гена *СПДС1*, кодирующего фермент спермидинсинтазу (рис. 3). Причиной наблюдаемого снижения содержания Спд в корнях после 24 ч действия засоления на фоне стабильно высокой экспрессии гена *СПДС1*, кодирующего его синтез, было увеличение окислительной деградации полиаминов, что под-

тверждалось увеличением содержания диаминопропана (ДАП) в корнях растений. ДАП является продуктом окислительной деградации Спд. В листьях наблюдалось лишь незначительное увеличение содержания ДАП.

Полученные данные свидетельствуют, что регуляция содержания свободных ПА в растениях *Th. halophila* при действии NaCl происходила как на уровне экспрессии генов ферментов их биосинтеза, так и на уровне катаболизма (окислительная деградация). Действие стресса приводило к увеличению содержания свободных ПА в первые сутки и снижению их содержания в дальнейшем. Снижение содержания Спд через 48 ч действия засоления на фоне стабильно высокой экспрессии генов ферментов его биосинтеза обусловлено интенсивным синтезом Спм и повышением окислительной деградации.

Анализ экспрессии генов ферментов биосинтеза показал, что действие засоления индуцировало два ключевых гена – *АДК* и *САМДК*. Уровень экспрессии остальных исследованных генов биосинтеза ПА при действии засоления оставался на стабильно высоком уровне. Полученные данные показали, что в первые сутки действия засоления ПА активно участвовали в защитном ответе растения. При этом расхождение их индуцировало увеличение уровня транскриптов ключевых генов биосинтеза ПА.

Plantago major

Растения *Plantago major* относятся к гликофитному ряду, и для них концентрация 100 мМ NaCl является стрессом средней силы. Функционирование антиоксидантных ферментов в растениях *P. major* свидетельствовало: 1) антиоксидантные защитные системы у данного растения органоспецифичны; 2) активность их в корнях, по-видимому, определяла солеустойчивость всего растения, что иллюстрировалось высокой конститутивной и стресс-зависимой активностью СОД в корнях.

В отличие от растений *Th. halophila* действие засоления на растения *P. major* приводило к снижению общего содержания свободных ПА в корнях и

листьях в течение 18 ч. В последующем изменение содержания ПА носило волнообразный характер (рис. 4), что может свидетельствовать об интенсивном расходовании ПА и синтезе *de novo*.

Преобладающим ПА в обоих органах, как и у растений *Th. halophila*, являлся Спд. Отмеченные колебания в общем содержании свободных ПА, как у *Th. halophila*, обусловлены изменением уровня Спд (рис. 5). Динамика изменения содержания Спд в корнях была сходна с таковой в листьях, различия касались лишь количества данного ПА. На этом фоне изменения в содержании других исследованных ПА практически не происходило. Подобная динамика содержания свободных ПА позволяет заключить, что растения *Pl. major* являются достаточно устойчивыми к действию NaCl (Kuznetsov, Shevyakova, 2007).

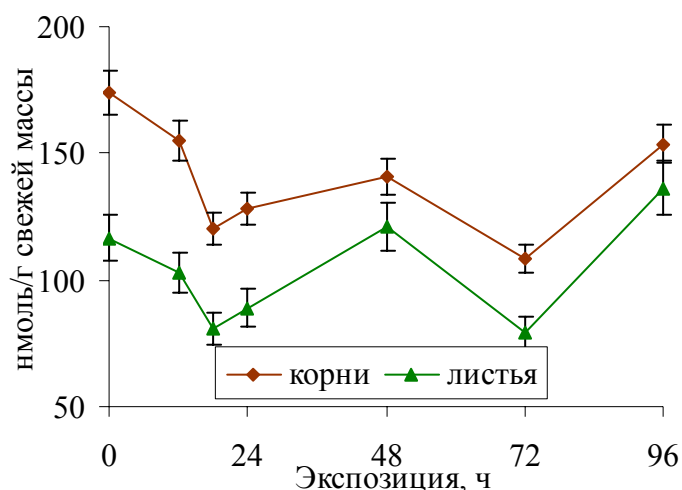


Рисунок 4 – Общее содержание свободных ПА в растениях *P. major* при действии 100 мМ NaCl

При действии засоления у растений *P. major* наблюдались изменения уровней экспрессии генов метионинсинтазы (*MetC*) и S-аденозилметионинсинтазы (*SAMC*) в обоих органах, однако уровень экспрессии ключевого фермента биосинтеза ПА – *SAMDK* изменялся только в листьях (рис. 6). По сравнению с *Th. halophila* увеличение экспрессии гена *SAMDK* у *P. major* наблюдается на 6–12 ч позднее, что согласно литературным данным (Li, Chen, 2000), свидетельствует о меньшей устойчивости *P. major* к действию засоления.

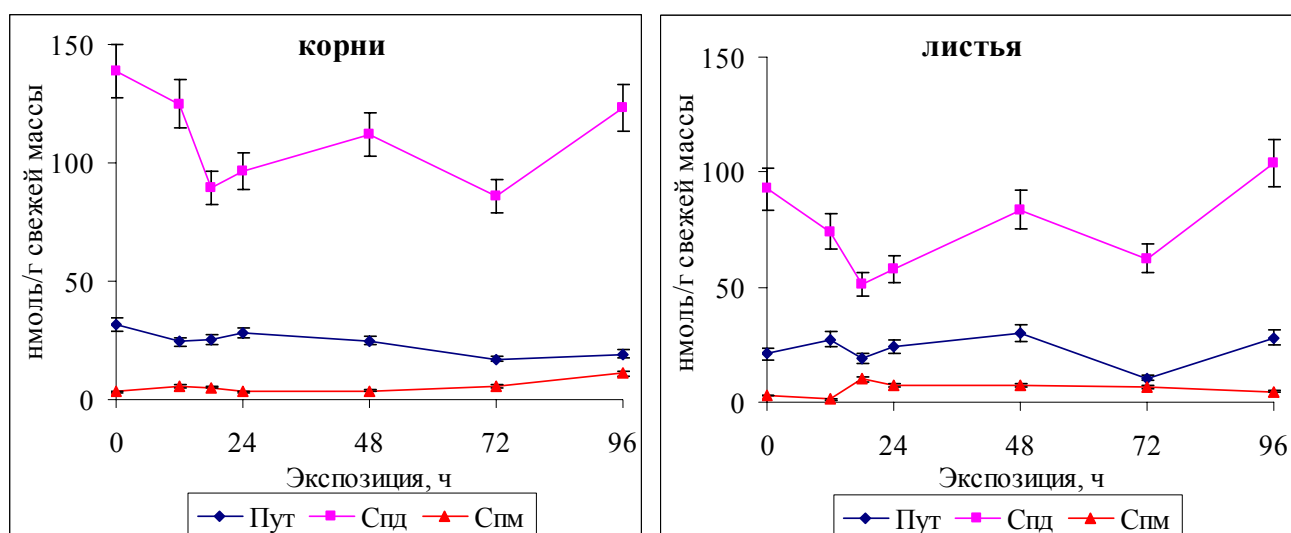


Рисунок 5 – Спектр свободных ПА в растениях *P. major* при 100 мМ NaCl

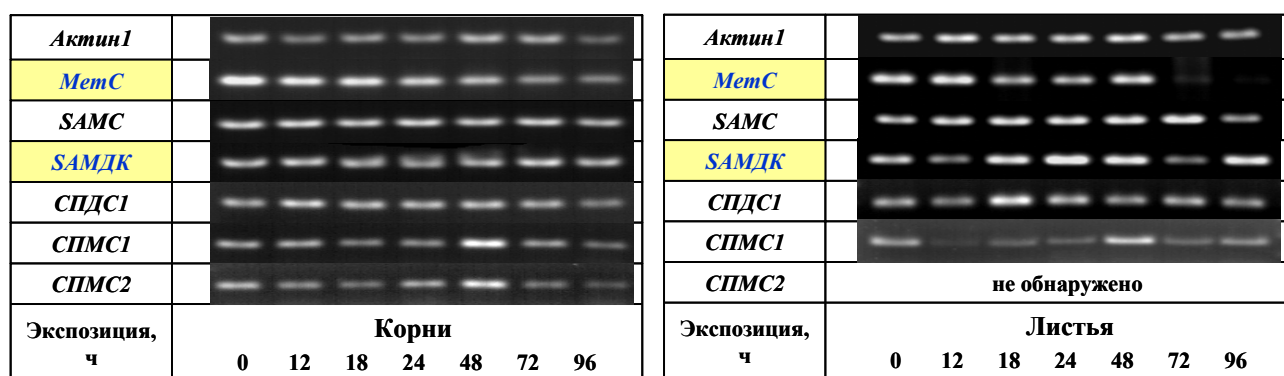


Рисунок 6 – Профили экспрессии генов ферментов биосинтеза ПА в растениях *P. major* при действии 100 мМ NaCl

Снижение содержания Спд в обеих частях растений происходило на фоне стабильной экспрессии гена *СПДС1* в корнях и листьях, что отчасти объясняется повышением синтеза Спм. В корнях растений экспрессия генов сперминсинтазы (*СПМС1* и *СПМС2*) оставалась стабильной в течение эксперимента с выраженным увеличением через 48 ч, что сопровождалось транзитным увеличением Спм.

Увеличения содержания продукта окислительной деградации полиаминов – ДАП, характерного для растений *Th. halophila*, у растений *P. major* не наблюдалось, что может свидетельствовать или о недостаточно активном процессе окислительной деградации или о быстром включении ДАП в последующие метаболические реакции, что, возможно, является особенностью данного вида.

Таким образом, действие засоления в первые сутки вызывало разнонаправленные изменения в общем содержании свободных ПА у растений *P. major* и у *Th. halophila*. В последующие 48 ч у этих растений общее содержание свободных ПА снижалось. Однако действие стресса вызывало изменения в уровне экспрессии ключевых генов биосинтеза ПА, что свидетельствует о необходимости поддержания пула ПА на определенном уровне для преодоления стрессорного воздействия.

Geum urbanum

Среди исследованных растений *G. urbanum* оказался наименее устойчивым к действию NaCl. На протяжении 2-х сут. воздействия происходило снижение активности СОД. После 2-х сут. активность СОД восстанавливалась в корнях и листьях. Действие NaCl приводило к повышению содержания H_2O_2 в корнях и листьях уже через 24 ч, выявлена прямая коррелятивная связь динамики активности каталазы и содержания пероксида водорода. Наблюдаемые изменения в активности антиоксидантных ферментов, особенно в первые сутки, свидетельствовали о нарушении нативной структуры белка в результате пассивного поступления ионов натрия (Радюкина, Иванов и др., 2007а).

Действие 100 мМ NaCl вызвало незначительное повышение содержания ПА в течение первых суток и стремительное его падение уже через 48 ч (рис. 7). Такая динамика была характерна как для корней, так и для листьев. При этом корни обладали более высоким уровнем ПА по сравнению с листьями.

Доминирующим ПА в обеих частях растений, и особенно в корнях, являлся Пут, что отличает *G. urbanum* от других исследованных растений. Снижение общего уровня ПА обусловлено именно снижением содержания Пут. На этом фоне в этих частях растений также наблюдалось снижение содержания Спд, причём в корнях более значительно, чем в листьях (рис. 8).

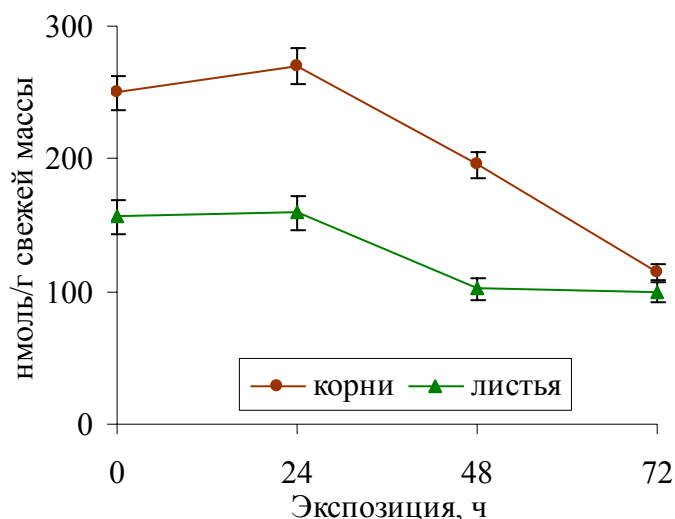


Рисунок 7 – Общее содержание свободных ПА в растениях *G. urbanum* при действии 100 мМ NaCl

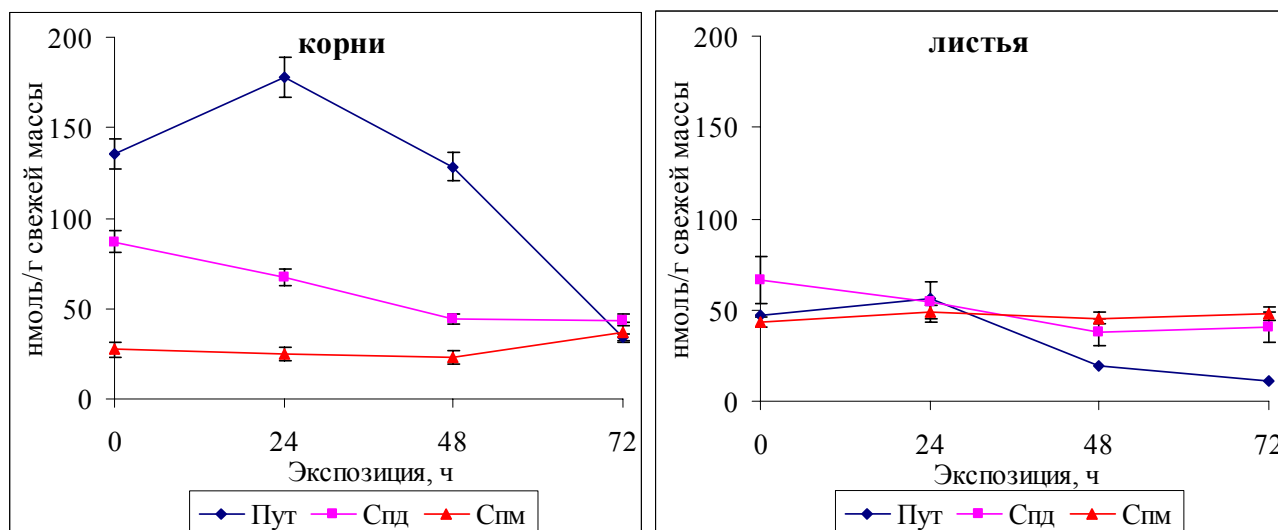


Рисунок 8 – Содержание свободных ПА в растениях *G. urbanum* при действии 100 мМ NaCl

Динамику содержания Пут, по-видимому, можно объяснить интенсивным синтезом Спд и Спм и их расходом для устранения повреждающих эффектов NaCl.

Воздействие УФ-В

Thellungiella halophila

Действие УФ-облучения приводило к повышению активности СОД в листьях на фоне усиления экспрессии генов *Cu-Zn/СОД* и *Mn/СОД* и снижению её активности в корнях при снижении количества транскриптов. При всех иссле-

дованных дозах облучения значительно возрастало содержание H_2O_2 в корнях, что возможно связано с его транспортом из листьев и выполнением им сигнальной роли (Cheesman, 2006). Уровень активности каталазы в корнях при всех исследованных экспозициях к УФ-В оставался практически неизменным.

Действие УФ-В облучения приводило к резкому увеличению содержания свободных ПА в листьях *Th. halophila* и незначительному снижению содержания ПА в корнях (рис. 9). Анализ спектра свободных ПА показал, что изменение общего содержания ПА определялось дозависимым накоплением Пут в листьях (рис. 10).

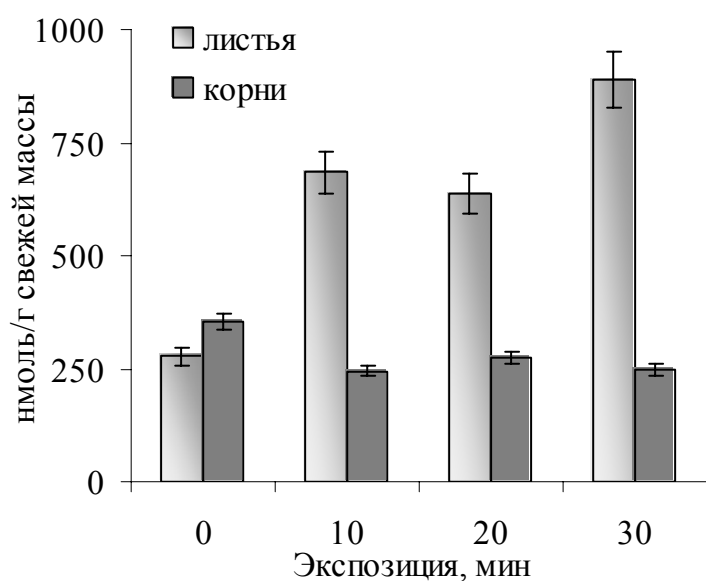


Рисунок 9 – Общее содержание ПА в растениях *Th. halophila* при УФ-В облучении

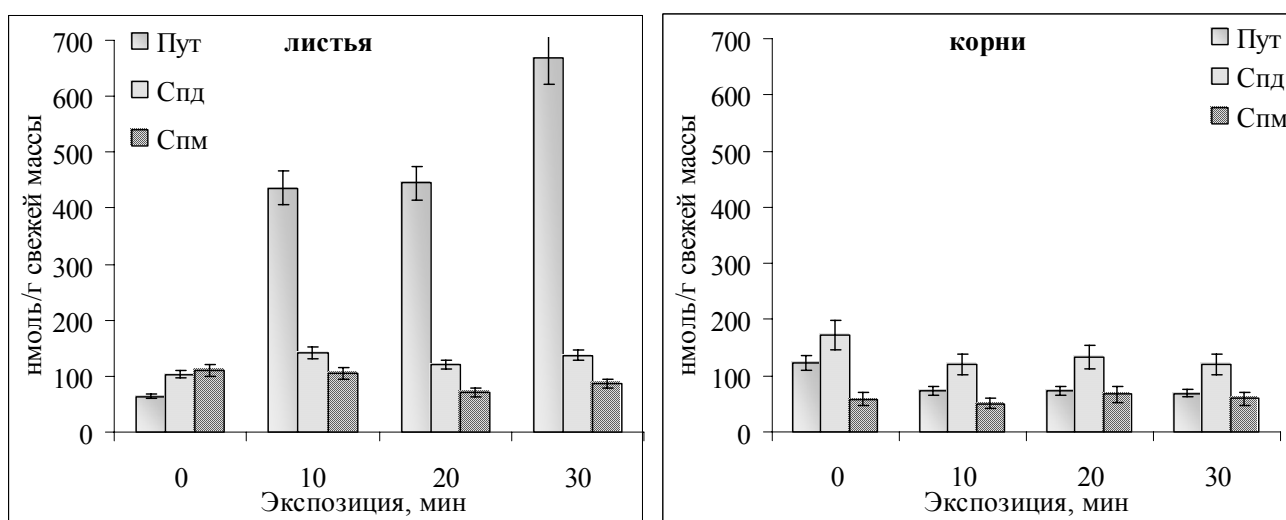


Рисунок 10 – Спектр свободных ПА в растениях *Th. halophila* при УФ-В облучении

Действие всех исследованных доз УФ-В облучения приводило к незначительному усилению экспрессии гена *АДК* в листьях (рис. 11), которое не могло определять значительное (в 4-7 раз) накопление Пут (рис. 10).

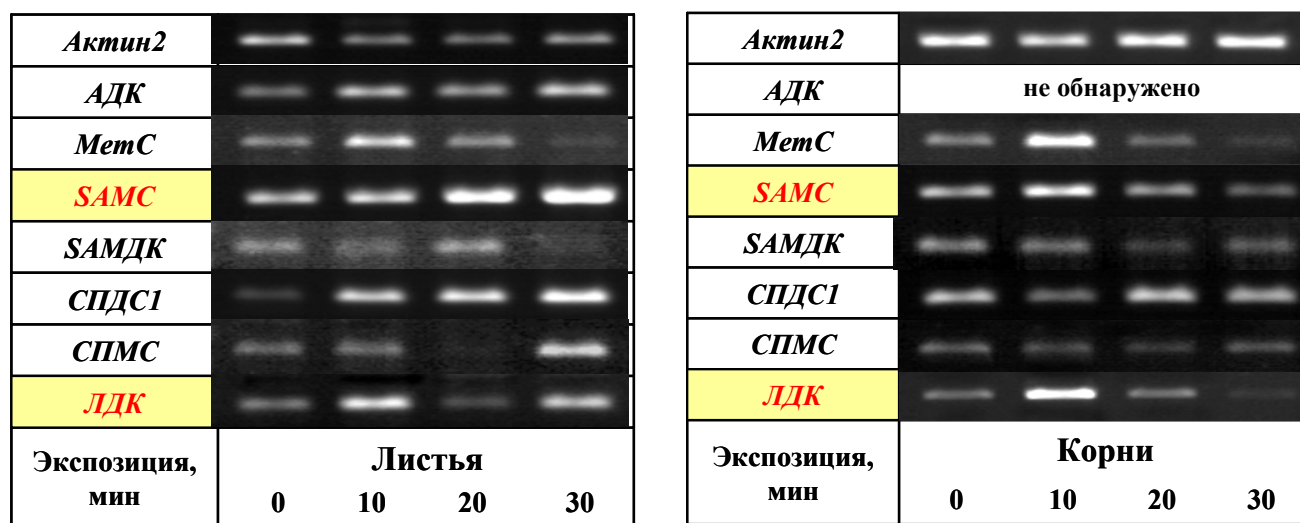


Рисунок 11 – Профили экспрессии генов ферментов биосинтеза ПА в растениях *Th. halophila* при УФ-В облучении

При действии УФ-В в листьях наблюдалась устойчивая экспрессия гена *МетС*, снижающаяся лишь при максимальной дозе воздействия. Отмечено дозозависимое увеличение числа матриц *САМС*. При действии малой и средней доз УФ-В наблюдалась стабильная экспрессия гена *САМДК*, что свидетельствовало о достаточном уровне аминокпропила, участвующего в синтезе Спд и Спм. Наблюдаемое усиление экспрессии гена *СПДС1* в листьях при действии УФ-В не приводило к увеличению содержания Спд. В то же время изменения в экспрессии гена *СПМС* коррелировали с изменениями в содержании свободного Спм.

В отличие от действия засоления УФ-В облучение в листьях вызывало стресс-индуцируемый синтез кадаверина (рис. 12) и усиление экспрессии гена лизиндекарбоксилазы (*ЛДК*) (рис. 11). В корнях наблюдалось транзитное повышение экспрессии гена *ЛДК*, однако самого кадаверина в данном эксперименте не обнаружено, что вероятно, связано с транспортом кадаверина в листья, как это было показано на других растениях (Кузнецов и др. 2003).

Действие малой и средней доз УФ-В облучения практически не вызывало окислительной деградации ПА, о чём свидетельствует лишь незначительное

увеличение содержания ДАП.

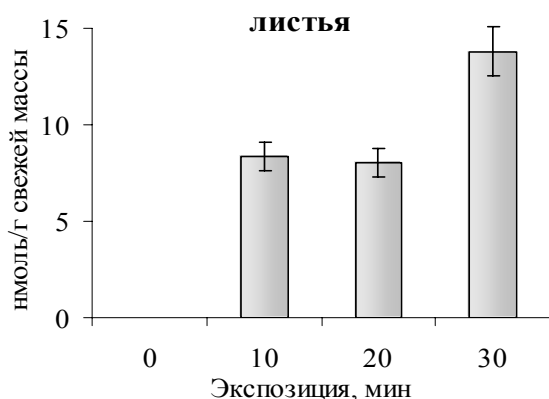


Рисунок 12 – Содержание кадаверина в растениях *Th. halophila* при УФ-В облучении

Наблюдаемое стресс-зависимое накопление Пут в листьях *Th. halophila* можно объяснить блокированием путей синтеза Спд и Спм на посттранскрипционном уровне образующимся этиленом, о чём косвенно свидетельствует образование кадаверина. Таким образом, при действии УФ-В *Th. halophila* использует защитные механизмы, эволюционно выработанные для защиты от действия засоления. Метаболизм ПА при этом виде стресса существенным образом меняется: ингибируется синтез ПА путресцинового ряда на посттранскрипционном уровне и синтезируется кадаверин.

Plantago major

В отличие от *Th. halophila*, действие всех исследованных доз УФ-В облучения приводило к снижению активности СОД в листьях и корнях. Это снижение не зависело от мощности облучения и происходило на фоне усиливающейся экспрессии гена *Cu-Zn/СОД* в листьях, и снижения уровня транскриптов в корнях. На фоне стабильного содержания H_2O_2 в листьях растений, в корнях отмечено дозозависимое повышение содержания пероксида водорода, обусловленное, по всей видимости, активацией дыхания, вызванного стрессом.

Действие малой и средней доз УФ-В облучения вызывало снижение уровня свободных ПА в листьях *P. major* ниже уровня в контроле. Только при максимальной экспозиции к УФ-В общее содержание свободных ПА в листьях приближалось к значениям в контроле (рис. 13). Это существенно отличало *P.*

major от *Th. halophila*. Однако в корнях *P. major* действие малых доз УФ-В приводило к увеличению общего содержания ПА, а высоких доз – к его снижению.

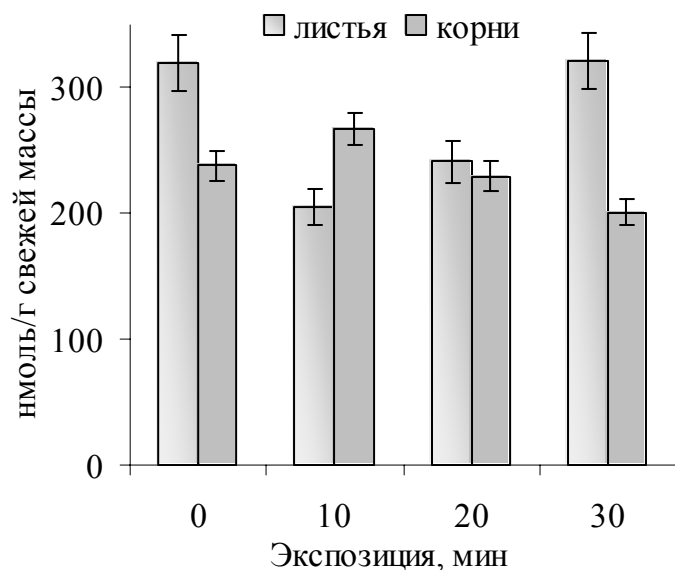


Рисунок 13 – Общее содержание ПА в растениях *P. major* при УФ-В облучении

В отличие от *Th. halophila*, при малой и средней дозах облучения в растениях *P. major* происходило снижение эндогенного уровня Пут (рис. 14).

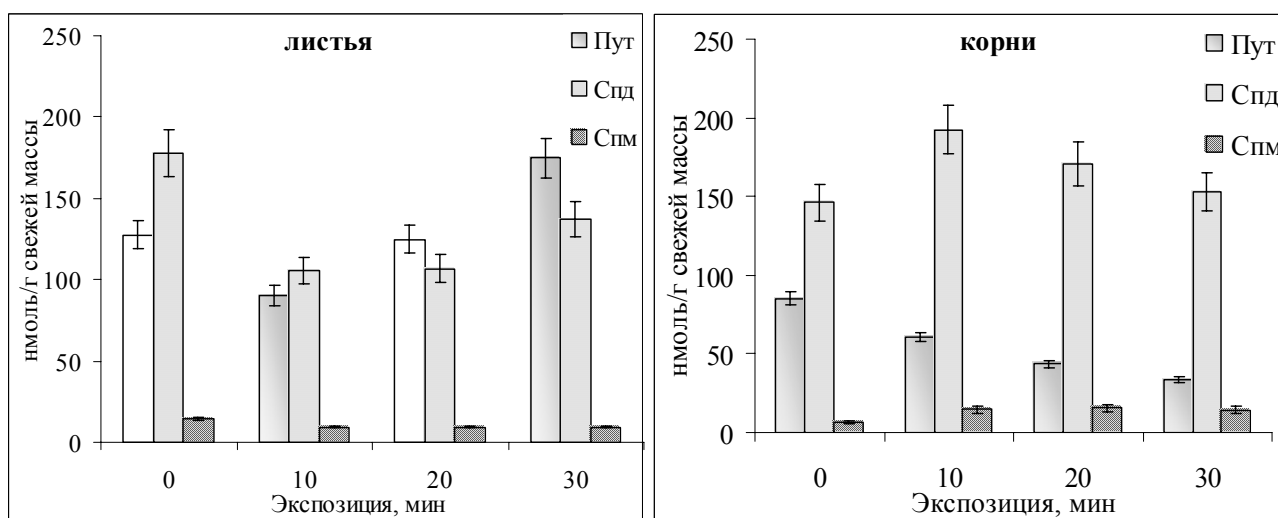


Рисунок 14 – Спектр свободных ПА в растениях *P. major* при УФ-В облучении

В листьях *P. major* наблюдалось дозависимое увеличение экспрессии всех исследованных генов биосинтеза ПА (рис. 15). В отличие от растений *Th. halophila*, у *P. major* даже при максимальной экспозиции к УФ-В наблюдалось усиление экспрессии гена *SAMDК* в листьях. Наблюдалась устойчивая дозависимая экспрессия генов *MetC* и *SAMC*. Однако, усиление экспрессии генов, в

том числе и генов *СПДС1* и *СПМС1* не приводило к увеличению эндогенного содержания Спд и Спм (рис. 14).



Рисунок 15 – Профили экспрессии генов ферментов биосинтеза ПА в растениях *Plantago major* при УФ-В облучении

В корнях *P. major*, в отличие от листьев, наблюдалось понижение экспрессии всех исследованных генов ферментов биосинтеза ПА (рис. 15). Отмечено понижение экспрессии гена ключевого фермента – *SAMДК*, а также понижение экспрессии генов *МемС* и *SAMC*. На фоне понижения экспрессии генов *СПДС1*, *СПМС1* и *СПМС2* в корнях *P. major*, тем не менее происходило увеличение содержания эндогенных Спд и Спм (рис. 14, 15).

В отличие от *Th. halophila* действие УФ-В на растения *P. major*, приводило к стресс-зависимому накоплению кадаверина в корнях (рис. 16).

Снижение содержания Спд в корнях при средней и сильной дозах облучения УФ-В, возможно связано с повышенной окислительной деградацией, о чём свидетельствует дозозависимое увеличение содержания диаминопропана.

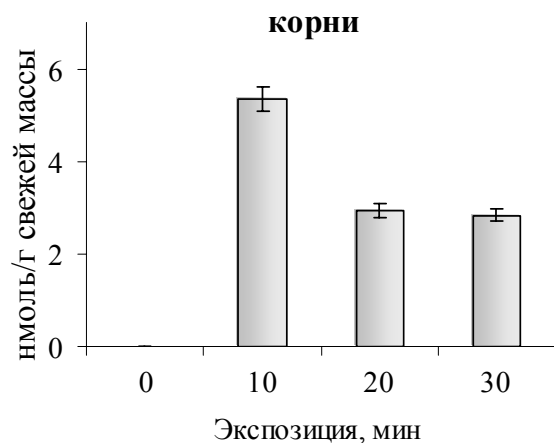


Рисунок 16 – Содержание кадаверина в растениях *P. major* при УФ-В облучении

Наблюдаемые незначительные изменения в содержании ПА в листьях, на фоне повышения экспрессии генов биосинтеза, свидетельствуют об интенсивном расходовании ПА для устранения повреждающих эффектов УФ-В облучения. В корнях снижение общего содержания ПА проходило на фоне снижения экспрессии генов биосинтеза. При этом незначительное увеличение содержания Спд и Спм не вносило существенного вклада в изменение общего пула ПА. Действие УФ-В на растения *P. major* в отличие от засоления индуцировало синтез кадаверина в корнях. У растений *Th. halophila* синтез кадаверина при действии УФ-В инициировался в листьях.

Geum urbanum

Действие УФ-В облучения приводило к повышению уровня СОД в листьях *G. urbanum* и практически не оказывало действия на изменение активности СОД в корнях. Содержание H_2O_2 увеличивалось при действии всех исследованных доз УФ-В. В корнях, напротив, наблюдалось практически дозозависимое снижение содержания H_2O_2 . Подобная динамика наблюдалась и в активности каталазы, что можно объяснить подавлением метаболических процессов во время адаптации растения к действующему стрессорному фактору.

Действие всех исследованных доз УФ-В облучения на *G. urbanum* приводит к накоплению свободных ПА в листьях, как и у *Th. halophila*. При этом увеличение общего содержания ПА в листьях не характеризуется дозовой зависимостью. На общее содержание ПА в корнях действие УФ-В облучения существенного влияния не оказывало (рис. 17).

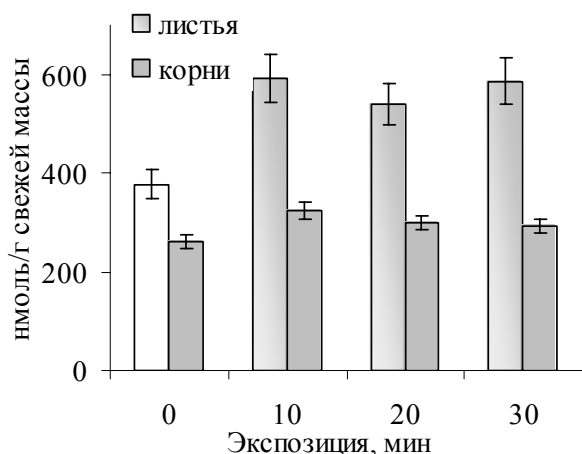


Рисунок 17 – Общее содержание ПА в растениях *G. urbanum* при действии УФ-В облучения

В листьях *G. urbanum* отмечено резкое увеличение содержания Пут при всех исследованных экспозициях к УФ-В (рис. 18). Существенных изменений в содержании Спд не выявлено. Тем не менее, уровень Спм увеличивался при средней и сильной степенях воздействия.

В корнях растений лишь при малой дозе воздействия наблюдалось увеличение содержания Пут. Уровень остальных ПА – Спд и Спм при всех исследованных дозах воздействия изменялся в пределах контроля.

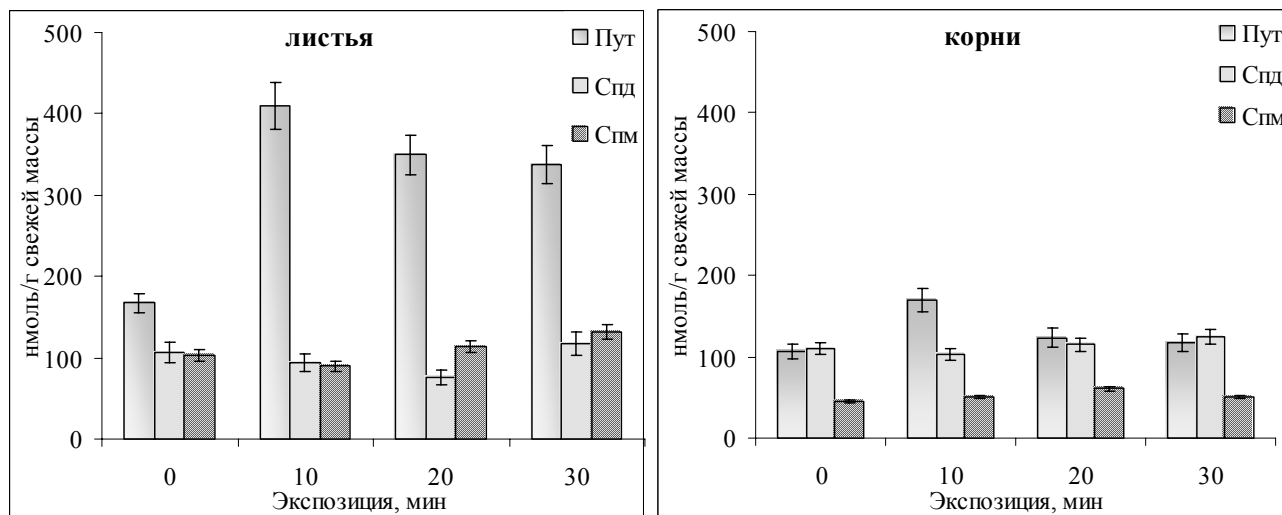


Рисунок 18 – Спектр свободных ПА в растениях *Geum urbanum* при действии УФ-В облучения

Действие всех исследованных доз УФ-В облучения приводило к накоплению ДАП в корнях растений, что может свидетельствовать о повышении окислительной деградации ПА. В то же время, в листьях растений стресс-зависимых изменений содержания ДАП не отмечено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что при действии двух видов стресса (NaCl и УФ-В) у исследованных видов растений наблюдались разнонаправленные изменения в содержании свободных ПА. Наиболее существенное повышение содержания свободных ПА, в основном Пут, наблюдалось при действии УФ-В.

Анализ экспрессии ключевых генов биосинтеза ПА у *Th. halophila* Mey и *P. major* L. показал существенные изменения в уровне их транскриптов при обоих видах стресса. При засолении повышение общего содержания ПА было заметно только в первые сутки в корнях и листьях *Th. halophila* Mey. Одновременно с этим, усиливалась экспрессия ключевых генов биосинтеза ПА – АДК и САМДК, экспрессия остальных генов этого пути оставалась высокой. Для *P. major* L. на фоне снижения общего содержания ПА увеличивался уровень транскриптов генов *MemC* и *САМДК*. Основным отличием в действии засоления и ультрафиолета был индуцируемый последним органоспецифичный синтез кадаверина в корнях *P. major* L. и листьях *Th. halophila* Mey.

Показано, что оба стресса вызывали изменения в содержании и спектре свободных ПА у всех изученных растений, что свидетельствует об участии этих низкомолекулярных соединений в защитном ответе растения и необходимости поддержания пула ПА на определенном уровне. Кроме того, изменение экспрессии генов при действии двух изученных стрессоров свидетельствует о транскрипционном контроле уровня свободных ПА. При этом более сильный окислительный стресс, вызываемый действием УФ-В, изменял и уровень экспрессии большего числа генов биосинтеза ПА.

Вторым возможным механизмом регуляции уровня свободных ПА является их окислительная деградация полиаминоксидазой и диаминоксидазой, о чём свидетельствовали изменения в содержании ДАП – продукта окислительной деградации ПА.

Исследования активности СОД, ключевого фермента антиоксидантной защиты выявили, зависящие от вида растения, органоспецифичные изменения при действии стрессоров. Функционирование СОД при действии засоления и УФ-В облучения было необходимым, но недостаточным условием, определяющим адаптационный потенциал исследованных растений. По этой причине увеличение пула ПА, как неферментативных антиоксидантов могло обеспечивать адаптацию растений к действию исследованных неблагоприятных факторов.

ВЫВОДЫ

1. Благодаря использованию дикорастущих травянистых растений (*Thellungiella halophila* Mey., *Plantago major* L., *Geum urbanum* L.) расширен спектр модельных объектов для выявления участия полиаминов в адаптации растений к стрессорным факторам (NaCl, УФ-В).

2. Показано, что изменения в уровнях свободных полиаминов при действии NaCl и УФ-В разнонаправлены, органоспецифичны и зависят от вида растений.

3. Действие засоления на галофит *Thellungiella halophila* существенно изменяли экспрессию *SAMДК* – ключевого гена биосинтеза полиаминов, как в листьях, так и в корнях.

4. Установлено, что изменения в экспрессии генов биосинтеза Спд (*СПДС*) и Спм (*СПМС*) при засолении не коррелировали с изменением эндогенного уровня этих полиаминов у *Thellungiella halophila* и *Plantago major*, что свидетельствует о регуляции их биосинтеза на посттранскрипционном уровне.

5. У среднеустойчивого к засолению *Plantago major*, по сравнению с галофитом *Thellungiella halophila*, этот вид стресса вызывал изменения в экспрессии большего числа генов биосинтеза полиаминов: *СПМС1* и *СПМС2* в корнях, и генов *SAMДК1*, *SAMС*, *СПДС1* и *СПМС1* – в листьях.

6. Действие исследованных доз УФ-В вызывало усиление экспрессии всех генов биосинтеза полиаминов в листьях *Thellungiella halophila* и *Plantago major*, но не приводило к накоплению свободных Спд и Спм.

7. Особенностью действия УФ-В на растения *Thellungiella halophila* и *Plantago major* является стресс-индуцируемый органоспецифичный синтез кадаверина.

Список публикаций по теме диссертации

1. Карташов А.В., **Иванов Ю.В.**, Радюкина Н.Л., Шевякова Н.И., Кузнецов Вл.В. Активация некоторых защитных систем в растениях *Thellungiella halophila* при действии NaCl // Известия ПГПУ им. В.Г. Белинского. Естественные науки. №1(5). Выпуск посвящен 60-летию Естественно-географического факультета. Пенза. Изд-во ПГПУ, 2006. – С. 57-61.

2. **Иванов Ю.В.**, Карташов А.В., Радюкина Н.Л., Шевякова Н.И. Функционирование NaCl индуцированной защитной системы в растениях галофитного и гликофитного типов // БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА: 10-я Пущинская школа-конференция молодых ученых, посвященная 50-летию Пущинского научного центра РАН (Пущино, 17-21 апреля 2006 года).

3. Карташов А.В., **Иванов Ю.В.**, Радюкина Н.Л. Сравнительный анализ стресс-реакции растений гравилата городского (*Geum urbanum* L.), вызванной воздействием различных солей // Экология 2006: эстафета поколений. Материалы конференции V Пущинской международной школы-семинара по экологии. М.: ГОУ ВПО МГУЛ, 2008. – С. 12-15.

4. **Иванов Ю.В.**, Карташов А.В., Радюкина Н.Л., Шевякова Н.И., Кузнецов Вл.В. Действие различных концентраций NaCl на дикорастущие травянистые растения средней полосы России // Леса Евразии – Венгерский лес: Материалы VI Международной конференции молодых учёных. – М.: МГУЛ, 2006. – С. 67-68

5. Kuznetsov V.I., Rakitin V.Yu., Radukina N.L., **Ivanov Yu.V.**, Shevyakova N.I.// Stress-accelerated spermine production in leaves of *Thellungiella halophila* is not controlled at the level of expression of *SPDS* gene. An.meeting of ASPB, Boston

2006, Abstracts, p.278.

6. **Иванов Ю.В.**, Карташов А.В., Радюкина Н.Л., Шевякова Н.И., Кузнецов Вл.В. Индукция защитной системы в растениях гравилата городского под действием NaCl // Актуальные проблемы лесного комплекса/ Под ред. Е.А. Памфилова. Сб. науч. тр. по итогам междунар. науч.-техн. конф. Вып. 13. – Брянск: БГИТА, 2006. – С. 181-183

7. **Иванов Ю.В.**, Радюкина Н.Л., Кузнецов Вл.В. The defense response of *Thellungiella halophila* for NaCl stress // Материалы I (IX) Международной Конференции молодых ботаников в Санкт-Петербурге (21-26 мая 2006). – СПб. Издательство ГЭТУ, 2006. – С. 151-152.

8. Радюкина Н.Л., **Иванов Ю.В.**, Карташов А.В., Шевякова Н.И., Ракитин В.Ю, Хрянин В.Н., Кузнецов Вл. В. Изучение индуцибельных и конститутивных механизмов устойчивости к солевому стрессу у гравилата городского // Физиология растений, 2007, Т.54, 692-698.

9. Радюкина Н.Л., Карташов А.В., **Иванов Ю.В.**, Шевякова Н.И., Кузнецов Вл. В. Сравнительный анализ функционирования защитных систем у представителей галофитной и гликофитной флоры в условиях засоления // Физиология растений, 2007, Т.54, 902-912.

10. Карташов А.В., **Иванов Ю.В.**, Радюкина Н.Л. Системы стресс-толерантности подорожника большого (*Plantago major* L.) // Леса Евразии - Русский север: Материалы VII Международной конференции молодых ученых. - М.: ГОУ ВПО МГУЛ, 2007. - 100-101.

11. Радюкина Н.Л., **Иванов Ю.В.**, Карташов А.В., Окислительный стресс у растений // Леса Евразии - Русский север: Материалы VII Международной конференции молодых ученых. - М.: ГОУ ВПО МГУЛ, 2007. - 120-121.

12. Радюкина Н.Л., **Иванов Ю.В.**, Карташов А.В., Окислительный стресс у растений при действии неблагоприятных факторов окружающей среды // Экология почвы. Круговорот элементов в экосистемах и почвах. Материалы XV Всероссийской школы. Программа краткое содержание докладов. Пущино: ОНТИ ПНЦ РАН. 2007. С. 41.

13. S. Mapelli, I. Brambilla, **Y. Ivanov**, N. Radukina, Vl. Kuznetsov. UV-B Radiation and Salt Stress Interaction on Biochemical and Physiological Events in Ice Plant // Современная физиология растений: от молекул до экосистем: Материалы докладов международной конференции (в трех частях). Часть 2. (Сыктыв-

кар, 18-24 июня 2007 г.). - Сыктывкар, 2007. - С. 5-6

14. Карташов А.В., **Иванов Ю.В.**, Пашковский П.П., Радюкина Н.Л., Кузнецов Вл.В. Исследование ранней индукции защитных систем растений подорожника большого (*Plantago major* L.) под действием NaCl // Современная физиология растений: от молекул до экосистем: Материалы докладов международной конференции (в трех частях). Часть 2. (Сыктывкар, 18-24 июня 2007 г.). - Сыктывкар, 2007. - С. 176-177.

15. **Иванов Ю.В.**, Карташов А.В., Радюкина Н.Л., Кузнецов Вл.В. Изменение содержания свободных полиаминов в растениях *Thellungiella halophila* Meу. при прогрессирующем засолении NaCl // Современная физиология растений: от молекул до экосистем: Материалы докладов международной конференции (в трех частях). Часть 2. (Сыктывкар, 18-24 июня 2007 г.). - Сыктывкар, 2007. - С. 158-159.

16. **Ivanov Y.V.**, Radukina N.L., Kuznetsov V.I.V. Investigation of polyamines content and composition in *Geum urbanum* L. under salt stress // 2-nd International Symposium: Plant Growth Substances: Intracellular Hormonal Signaling and Applying in Agriculture. Abstracts 8-12 October 2007 Kyiv, Ukraine. P. 59.

17. Radukina N.L., **Ivanov Y.V.**, Kartashov A.V. Kuznetsov V.I.V. The Free Polyamines in Glycophyte *Plantago major* and Halophyte *Thellungiella halophila* under Salt Stress // 2-nd International Symposium: Plant Growth Substances: Intracellular Hormonal Signaling and Applying in Agriculture. Abstracts 8-12 October 2007 Kyiv, Ukraine. P. 109.

18. Карташов А.В., Радюкина Н.Л., **Иванов Ю.В.**, Пашковский П.П., Шевякова Н.И., Кузнецов Вл.В. Роль антиоксидантных систем при адаптации дикорастущих видов растений к солевому шоку // Физиология растений, 2008, Т. 55, в печати.