

На правах рукописи

РАДИОНОВ Никита Викторович



Физиологические и молекулярные ответные реакции растений рапса
на воздействие солей меди и цинка

03.00.12 – физиология и биохимия растений

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА – 2008

Работа выполнена в Лаборатории экспрессии генома растений Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор биологических наук Кузнецов Виктор Васильевич

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор биологических наук Носов Александр Владимирович

кандидат сельскохозяйственных наук,

профессор Семенов Олег Григорьевич

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН

Защита состоится « 20 » мая 2008 года в 11 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу 127 276, Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: +7 (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 «17» апреля 2008 года.

Ученый секретарь

Совета по защите докторских

и кандидатских диссертаций,

кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

ВВЕДЕНИЕ

Одним из факторов, уменьшающих площадь земель, пригодных для нужд сельского хозяйства, является их загрязнение высокими концентрациями тяжелых металлов (ТМ) вследствие активной промышленной деятельности человека (Ильин, 1991; Schuetzenduebel et al., 2002). Медь и цинк являются эссенциальными элементами, т.е. необходимыми в небольших количествах для нормальной деятельности всех живых организмов, однако их высокие концентрации негативно влияют на растения.

Различные виды растений обладают разной устойчивостью к действию ТМ. Это обеспечивается функционированием специализированных механизмов на различных уровнях организации. Основная задача всех этих механизмов – изоляция токсичных концентраций металлов от метаболически активных компартментов клетки. Глубокое понимание функционирования подобных механизмов будет способствовать расширению сферы применения растений для решения проблемы загрязнения почв ТМ.

Использование растений с целью восстановления загрязненных тяжелыми металлами почв называется фиторемедиацией (Chaney et al., 1997). Главным ее недостатком является относительно небольшая биомасса большинства растений гипераккумуляторов и низкая скорость роста. Поэтому особый интерес представляет изучение таких видов растений как, например, рапс, которые способны формировать значительную биомассу и накапливать в больших концентрациях ТМ.

Трансгенные растения представляют собой удобную модель для фундаментальной науки. Введение в геном быстрорастущих высокопродуктивных культур фрагментов генома растений гипераккумуляторов посредством методов молекулярной биологии позволит глубже проникнуть в суть механизмов, лежащих в основе адаптационного процесса (Brown et al., 1995).

В данной работе объектом агробактериальной трансформации был выбран рапс (*Brassica napus* L., сорт *Веспа*), благодаря хорошим

регенерационным свойствам и оптимизированной процедуре трансформации данного сорта. В качестве целевого был использован ген риса (*OsMyb4*), кодирующий транс-фактор MYB. Известно, что продукт данного гена увеличивает устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды, в том числе и к ТМ (Vannini et.al., 2004, Mattana et.al., 2005).

Цель и задачи исследования.

Цель диссертационной работы заключалась в изучении повреждающего действия на растения рапса сорта *Вестар* солей меди и цинка, в оценке роли некоторых генов системы защиты от их избытка и получении трансгенных растений этого сорта, несущих ген транс-фактора MYB4, способный обеспечить повышение устойчивости растений к этим ТМ.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

1. Установить диапазон концентраций солей меди и цинка, в пределах которых возможно прораствание семян и рост проростков рапса;
2. Оценить степень ингибирования тяжелыми металлами роста и накопления биомассы молодых растений рапса;
3. Изучить аккумуляцию ТМ в листьях рапса и выявить существенные звенья физиологических процессов, подверженных их негативному действию;
4. Изучить регуляцию экспрессии генов некоторых мембранных транспортеров и фермента синтеза фитохелатинов под действием ТМ;
5. Получить и проанализировать трансгенные растения рапса, содержащие ген транс-фактора риса *OsMyb4*, продукт которого способен увеличивать устойчивость растений к окислительному стрессу и, как результат, к негативному воздействию ТМ.

Научная новизна.

Примененный комплексный подход позволил не только оценить устойчивость рапса к действию ТМ по основным физиологическим показателям, но и проанализировать на уровне экспрессии генов участие отдельных звеньев клеточных механизмов в детоксикации ионов металлов.

Практическая значимость.

Рапс (*Brassica napus* L.), выбранный в данной работе в качестве объекта, является культурой универсального назначения. Это один из главных источников сырья для производства пищевого растительного масла, жмыхов, шротов, муки и зеленой массы для кормов, а рапсовое масло – важный резерв производства биотоплива.

Апробация результатов работы.

Основные положения работы доложены на Международной конференции «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия» (Вологда, 2005), на III Съезде Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (Москва, 2005), на VI Международном симпозиуме «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования» (Пушино, 2005), на Международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем» (Сыктывкар, 2007)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, а также выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 163 страницах машинописного текста, включая 20 таблиц и 36 рисунков. Список цитируемых литературных источников включает 216 наименований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объект исследований

В качестве объекта исследований был выбран рапс (*Brassica napus* L., сорт канадской селекции *Вестар*. Исследования проводили на проростках и 4-х недельных растениях, выращенных на водной культуре. В качестве питательной среды использовали среду Хогланда – Снайдерс (Третьяков с соавт., 1990).

Измерение физиологических параметров

Всхожесть семян рапса и рост корня проростков под влиянием тяжелых металлов оценивали на 3-й и 4-й день воздействия. Измерение свежей и сухой биомассы растений и отдельных органов – листьев, стеблей, побегов и корней – проводили стандартными общепринятыми методами (Пустовой и др., 1995). Осмотический потенциал клеточного сока листьев рапса измеряли на осмометре Osmomat 030 фирмы «Gonotec» (США). Перекисное окисление липидов определяли по методу Heath и Parker (1968), а содержание хлорофилла – по методу Шлыка (1971). Содержание свободного пролина определяли с помощью кислого нингидринового реактива по методу Bates et al. (1973). Определение содержания меди и цинка в тканях растений проводили по методу Голубкиной (1995).

Молекулярные методы анализа были проведены, главным образом, в соответствии с руководством Маниатис и др (1984). Реакцию обратной транскрипции проводили, как указано в руководстве фирмы Fermentas. После синтеза кДНК проводили ПЦР с подобранными праймерами – ZIP, ZAT 1, ZAT1(2), PCS. Полученные фотографии обрабатывали на компьютере с помощью программы Adobe Photoshop 7,0 (фирма «Adobe», США). Интенсивность пятен оценивалась с использованием программы 1D Scan Version 1.3 (фирма «CSP Inc», США). Представленные данные выражены в относительных единицах - процентах активности (экспрессии гена) опытных образцов на фоне контроля, который принимали за 100%.

Трансформацию рапса проводили методом совместного культивирования эксплантов рапса и почвенной агробактерии *Agrobacterium tumefaciense* (штамм *AGL0*). Для получения трансгенных растений использовали 2 генетические конструкции - COR15Myb4 и pGAMyb4 (Vannini et.al., 2004). В обеих конструкциях целевым является ген риса *OsMyb4*, кодирующий MYB транс-фактор.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние ТМ на прорастание семян и рост корня проростков рапса

Было обнаружено, что CuSO_4 не оказывает ингибирующего действия на прорастание семян рапса до концентрации 150 мкМ. Рост корня на 3 сутки тормозится только при воздействии 150 мкМ меди, а на 4-е сутки наблюдалось ингибирование роста корня проростков на 40 и 70 % при 100 и 150 мкМ сернокислой меди, соответственно.

Влияние цинка на прорастание проявляется, начиная с концентрации 1,5 мМ. Более заметное негативное действие ZnSO_4 оказывает на рост корня молодых растений. Достоверный ингибирующий эффект проявлялся при концентрации 500 мкМ, достигая 90% ингибирования роста корня при 1000 мкМ ZnSO_4 .

Таким образом, на стадии прорастания и начального роста рапс показал высокую устойчивость к солям меди и, особенно, цинка.

Влияние ТМ на рост и накопление биомассы растений рапса

CuSO_4 в концентрации 50-150 мкМ тормозила накопление биомассы в среднем на 40-60% (Рис. 1).

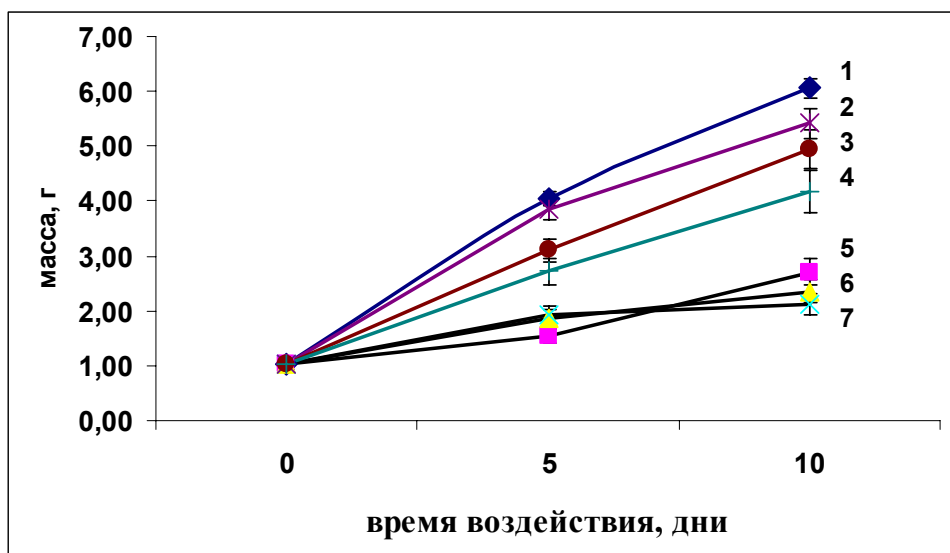


Рис. 1. Влияние солей тяжелых металлов на биомассу; 1 – контроль, 2 – ZnSO_4 500 мкМ, 3 – ZnSO_4 1000 мкМ, 4 – ZnSO_4 1500 мкМ, 5 – CuSO_4 50 мкМ, 6 – CuSO_4 100 мкМ, 7 – CuSO_4 150 мкМ.

При этом со временем ингибирующий эффект высоких концентраций усиливался. Несмотря на то, что концентрация $ZnSO_4$ в этих опытах превосходила концентрацию $CuSO_4$ в 10 раз, ингибирующий эффект цинка на накопление биомассы был значительно менее выражен. Не более чем на 1/3 снизилась биомасса растений рапса даже при концентрации цинка 1500 мкМ.

При оценке действия ТМ на рост отдельных органов (листьев и корней) оказалось, что эффект $CuSO_4$ был значительно сильнее, чем эффект $ZnSO_4$: биомасса листьев под влиянием меди увеличилась всего в 2-5 раз, тогда как за тот же период времени под воздействием в 10 раз больших концентраций $ZnSO_4$ биомасса листьев увеличилась в 6-9 раз. Масса листьев контрольных растений увеличилась за тот же период в 14 раз. Особенно сильно различалось действие цинка и меди на рост корневой системы. При концентрации цинка 1500 мкМ биомасса корней за 10 дней опыта увеличилась в 3 раза, тогда как в контроле – в 5 раз. При действии $CuSO_4$ прирост биомассы корня был практически полностью подавлен.

Таким образом, можно заключить, что чувствительность к меди молодых растений рапса гораздо выше, чем проростков. Разница в отрицательном влиянии цинка на проростки и молодые растения значительно меньше, чем у меди. Ингибирующее действие цинка на накопление биомассы молодых растений проявлялось с концентрации 500 мкМ, а избыточные концентрации (до 5 мМ) полностью останавливали рост листьев. Проведенный анализ позволил остановиться в дальнейших экспериментах на использовании солей меди в диапазоне концентраций 50-150 мкМ, а цинка на порядок выше – 500-1500 мкМ.

Аккумуляция ТМ в листьях растений рапса

Было обнаружено, что в норме растения рапса сорта *Вестар* содержат от 22 до 35 мкг меди в грамме сухих тканей листа. При добавлении в питательную среду соли меди в концентрации 50-150 мкМ даже после 10 дней не наблюдалось существенного накопления меди в листьях – максимальное значение превышало контрольный показатель в 4,5 раза (Табл. 1).

Таблица 1: Содержание меди в листьях рапса под влиянием различных концентраций CuSO_4 , мкг металла/ г сухого веса.

Вариант	5 дней	10 дней
контроль	22.3±2.3	34.2±3.5
Cu 50 мкМ	25.1±2.8	59.9±4.1
Cu 100 мкМ	44.3±4.7	101.4±5.3
Cu 150 мкМ	97.8±5.5	159.6±9.7

После 5 дней действия цинка в концентрации 2500 мкМ его содержание в опытных образцах превышало контрольные значения в 10 раз, а при концентрации 5 000 мкМ - более чем в 30 раз (рис. 2). Через 10 дней воздействия содержание цинка в опытных вариантах продолжало увеличиваться. После 15 дней воздействия сульфата цинка в концентрации 2500 мкМ содержание цинка в листьях рапса превышало контроль в 32 раза, а при 5000 мкМ – в 46 раз.

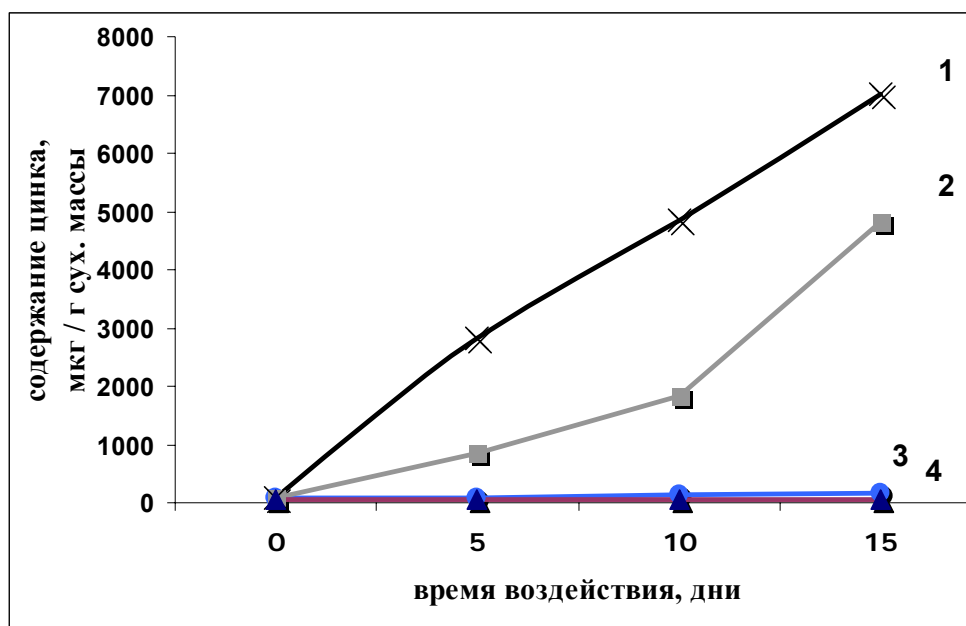


Рис. 2. Содержание цинка в листьях рапса под действием сульфата цинка; 1 – Zn 5000 мкМ, 2 – Zn 2500 мкМ, 3 – контроль, 4 – без Zn.

В концентрациях, токсический эффект которых был сходен с токсическим эффектом меди, цинк накапливался в значительно больших количествах. При чрезвычайно высоких концентрациях цинка (5 мМ),

превышающих уровень в питательной среде в 15 000 раз, рапс мог аккумулировать в тканях листьев до 7 000 мкг / г., что приближает растения рапса к растениям-гипераккумуляторам тяжелых металлов.

Влияние меди и цинка на оводненность листьев рапса

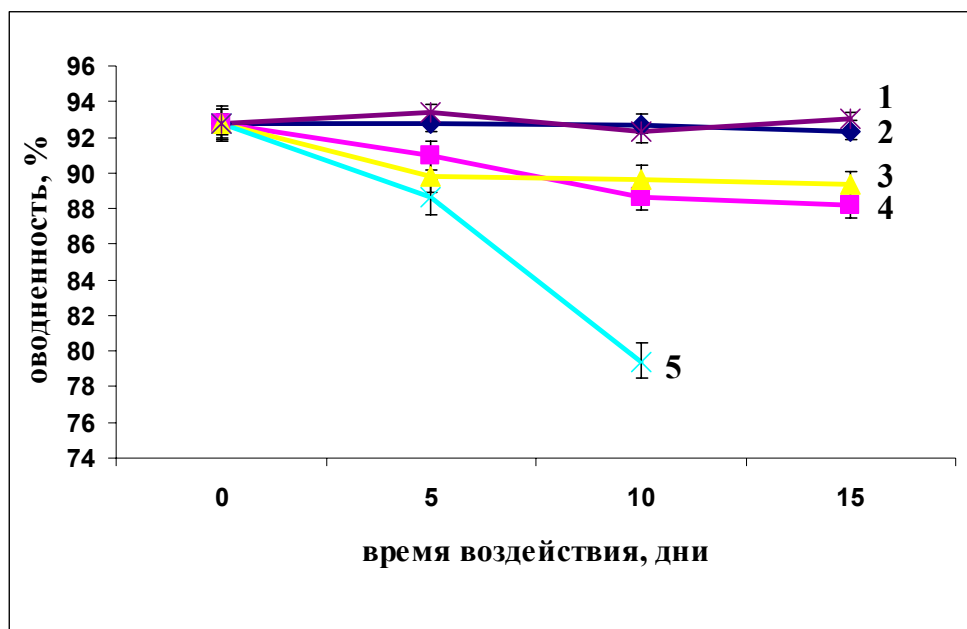


Рис. 3. Оводненность листьев рапса при влиянии раствора сульфата меди; 1 – NaCl 100 мМ, 2 – Контроль, 3 – Cu 50 мкМ, 4 – Cu 25 мкМ, 5 – Cu 100 мкМ.

Как показывают результаты, представленные на рис. 3, медь вызывает сильное изменение водного статуса рапса в концентрации 100 мкМ, а при концентрации 200 мкМ эффект меди становится летальным уже на 7-9 день.

Цинк, как менее токсичный для растений элемент обнаруживает действие в концентрациях, превышающих концентрации меди в 10-25 раз. Высокие концентрации – от 2500 мкМ – заметно уменьшают оводненность на 10й день (до 88% против 93% у контрольных растений), а концентрация 5000 мкМ близка к летальной и сказывается уже на 5й день (рис. 4). Умеренное засоление (100 мМ хлорида натрия) не оказывает заметного влияния на водный статус растения, даже при условии длительной инкубации.

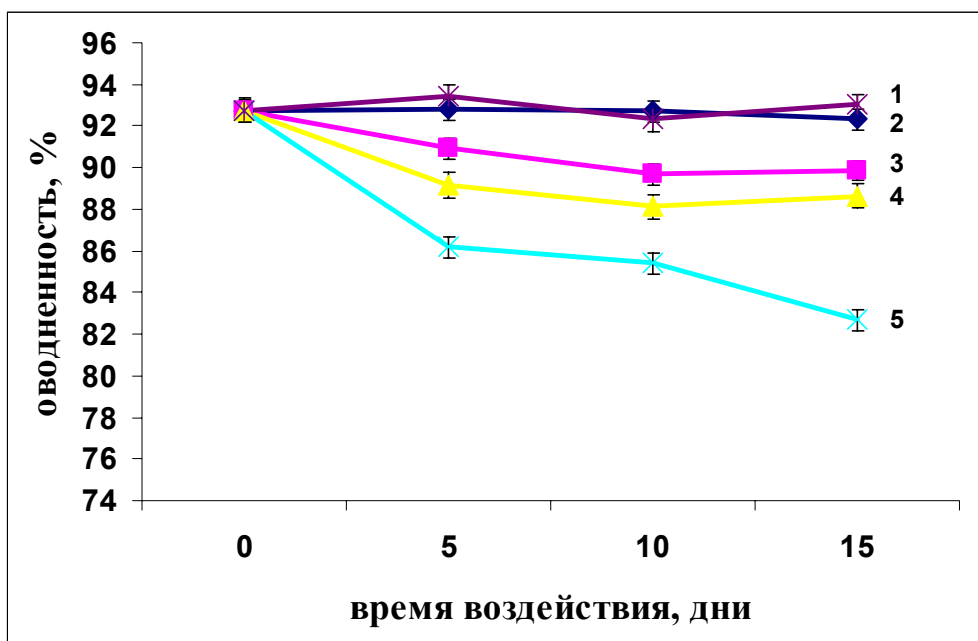


Рис. 4. Оводненность листьев рапса при воздействии сульфата цинка;

1 – NaCl 100 мМ, 2 – Контроль, 3 – Zn 1000 мкМ, 4 – Zn 2500 мкМ, 5 – Zn 5000 мкМ.

Влияние меди и цинка на осмотический потенциал

При действии 1000 и 2500 мкМ цинка на растения рапса осмотический потенциал снизился в среднем соответственно на 30 и 50% по отношению к контрольным растениям (Рис. 5).

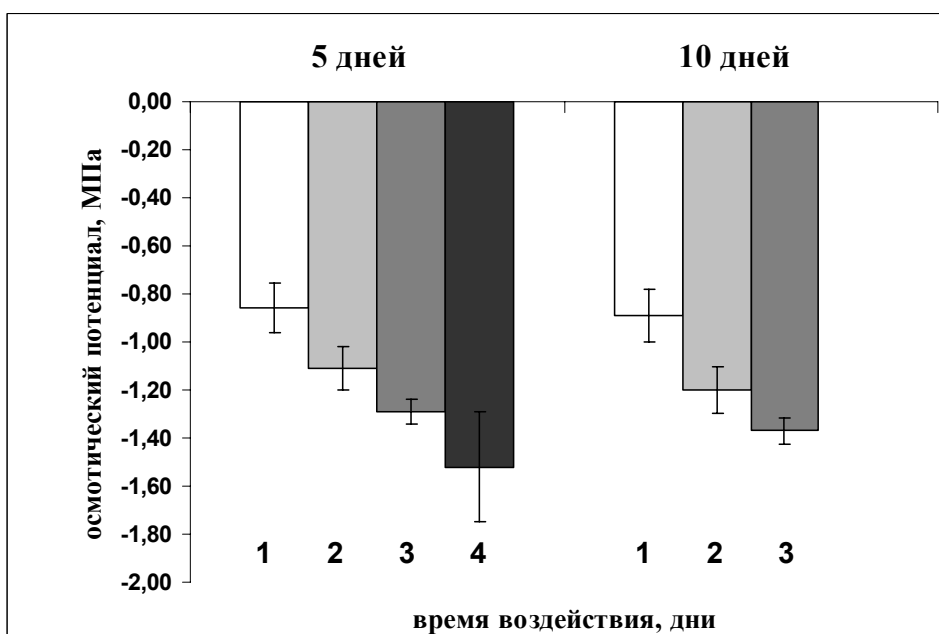


Рис. 5. Влияние ТМ на осмотический потенциал; 1 – Контроль, 2 – Zn

1000 мкМ, 3 – Zn 2500 мкМ, 4 – Zn 5000 мкМ.

Цинк в концентрации 5000 мкМ через 5 дней снижал потенциал на 77 %, а после 10 дней растения находились в таком состоянии, что определить осмотический потенциал не представлялось возможным.

Снижение осмотического потенциала при воздействии использованных концентраций меди и цинка могло происходить из-за повышения концентрации осмотически активных веществ за счет уменьшения объема клеток. Об этом свидетельствуют приведенные данные о снижении оводненности тканей листа. Не исключено, однако, что активная осморегуляция происходила также благодаря поступлению или синтезу осмотически активных веществ (низкомолекулярных неорганических ионов или органических соединений).

Изменение в содержании свободного пролина под действием ТМ

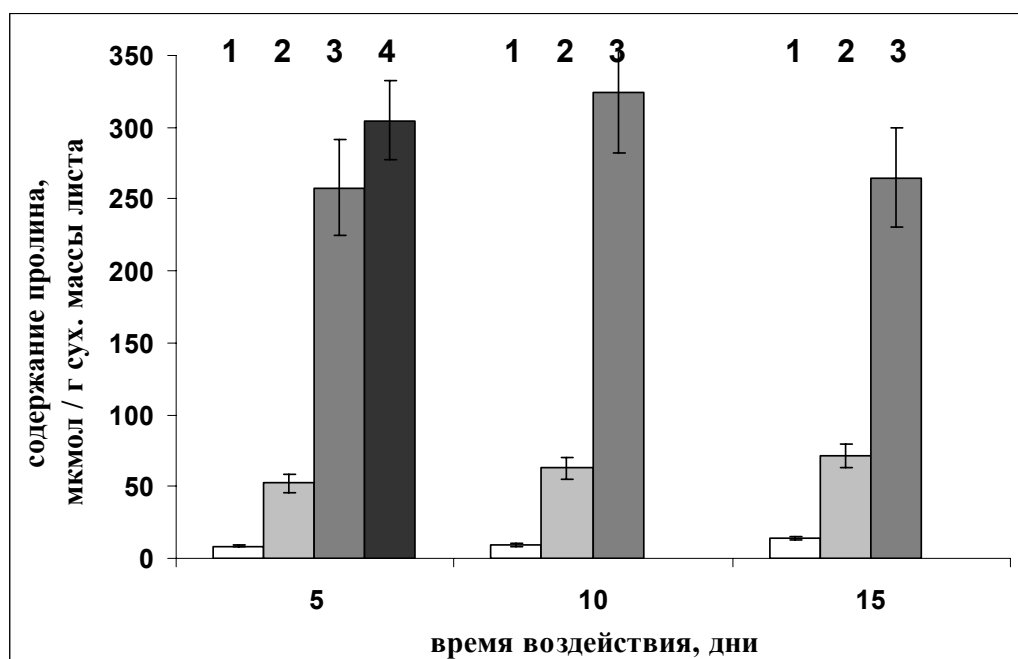


Рис. 6. Содержание свободного пролина в листьях рапса при действии солей меди; 1 – Контроль, 2 – NaCl 100 мМ, 3 – Cu 100 мкМ, 4 – Cu 200 мкМ.

Под действием меди в концентрации 100 мкМ в течение всего эксперимента содержание пролина в листьях рапса превышало контрольные значения в 25 – 30 раз (Рис. 6).

Под влиянием меди в концентрации 200 мкМ через 5 дней содержание пролина в листьях растений достигало 315 мкмол / г сух.массы. Однако более длительное воздействие этой концентрации меди вызвало гибель растений.

В отличие от меди, меньшая из использованных концентраций цинка (1000 мкМ) в течение 5 и 10 дней достоверно не изменяла содержание пролина (Рис. 7), однако после 15 дней количество пролина увеличивалось и превышало контроль в 5 раз.

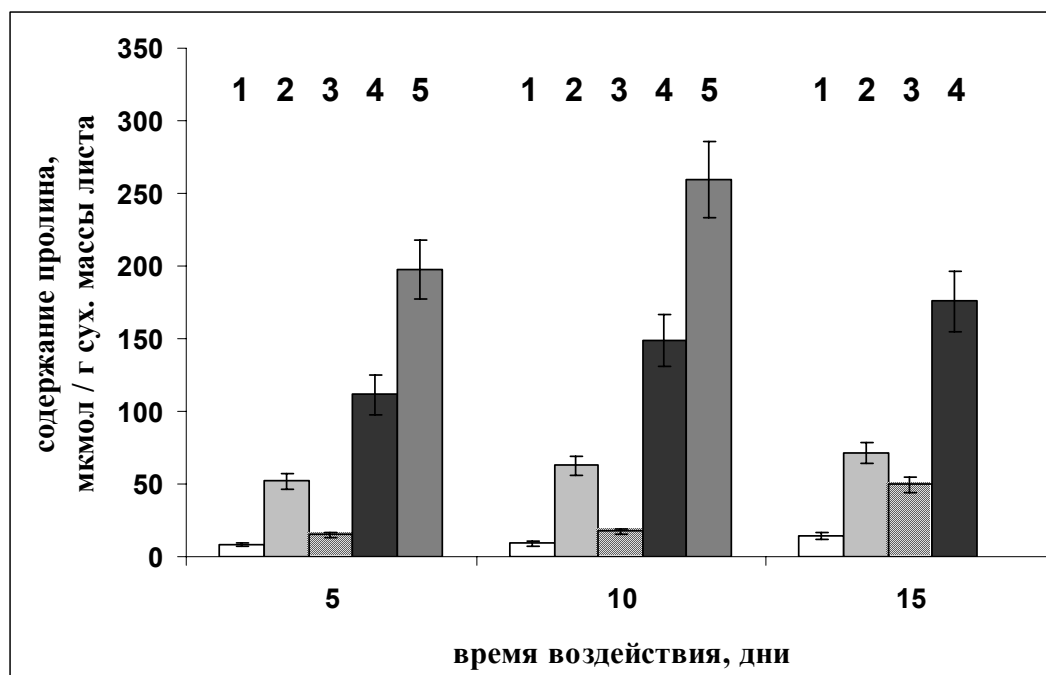


Рис. 7. Содержание свободного пролина в листьях рапса при действии солей цинка; 1 – Контроль, 2 – NaCl 100 мМ, 3 – Zn 1000 мкМ, 4 – Zn 2500 мкМ, 5 – Zn 5000 мкМ.

Более четкое стрессорное воздействие на растения рапса оказывал цинк в концентрации 2500 мкМ, при которой на 10й день уровень пролина превышал его содержание в контроле в 17 раз, а при концентрации ZnSO₄ 5000 мкМ - в 25 раз. Однако при действии этой концентрации цинка растения рапса погибали на 12й день.

Способность растений аккумулировать неорганические ионы и синтезировать совместимые осмолиты в ответ на действие ТМ может

рассматриваться в качестве одного из важных критериев их высокого адаптивного потенциала.

Влияние ТМ на перекисное окисление липидов

Перекисное окисление ненасыщенных липидов в биологических мембранах является заметным симптомом окислительного стресса у растений (Yamamoto et.al., 2001). При действии на растения сульфата меди в концентрации 50-150 мкМ в течение 5 дней уровень МДА увеличивался в среднем в 5-9 раз (Рис. 8), а при более длительном воздействии окислительный стресс, оцениваемый количеством МДА, усиливался. Максимальное накопление МДА наблюдалось при 10-дневном воздействии меди в концентрации 150 мкМ.

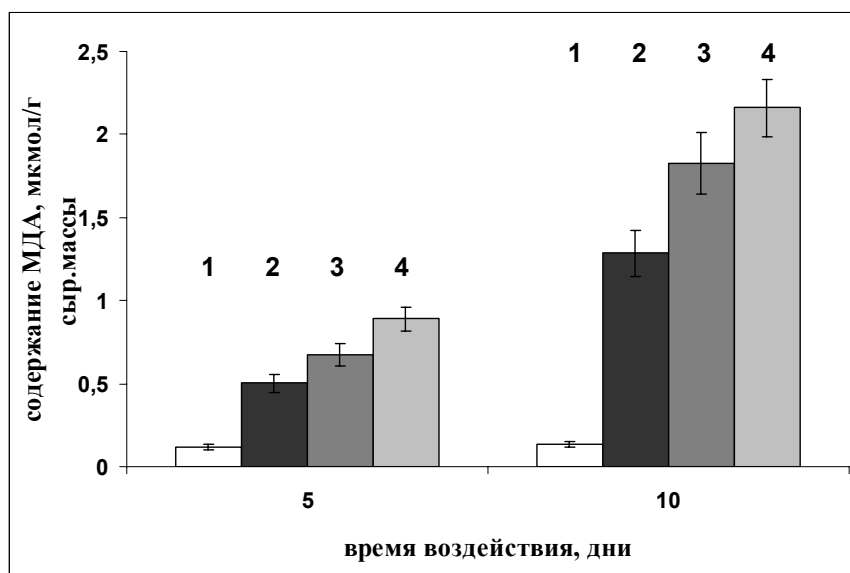


Рис. 8. Влияние солей меди на перекисное окисление липидов; 1 – Контроль, 2 – Cu 50 мкМ, 3 – Cu 100 мкМ, 4 – Cu 150 мкМ.

В другой серии опытов было показано, что недостаток цинка не вызывает повышение содержания МДА в листьях рапса, повышенные концентрации цинка (1000-2500 мкМ) заметно усиливают процесс перекисного окисления липидов биологических мембран. (Рис. 9).

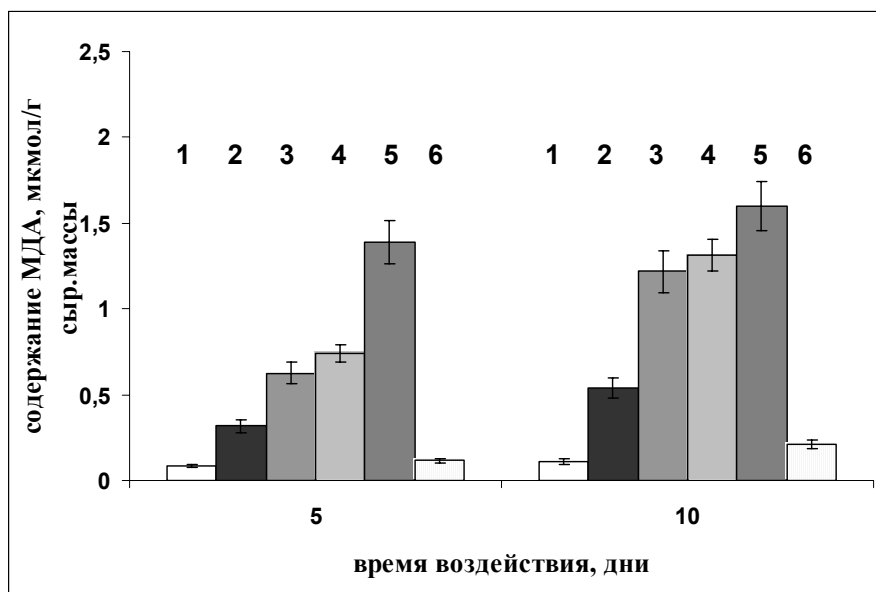


Рис. 9. Влияние солей цинка на перекисное окисление липидов;

1 – Контроль, 2 – Zn 500 мкМ, 3 – Zn 1000 мкМ, 4 – Zn 1500 мкМ, 5 – Zn 2500 мкМ, 6 – без Zn.

Таким образом, можно констатировать, что установлена сильная активация перекисного окисления липидов при действии солей меди и цинка. При этом, сравнимый по интенсивности эффект ТМ был достигнут при концентрации цинка в 10 раз более высокой, чем меди, что указывает на меньший токсический эффект солей цинка для рапса.

Влияние ТМ на содержание хлорофилла

Цинк и медь, являясь эссенциальными элементами, в повышенных концентрациях вызывают разрушение фотосинтетического аппарата и, тем самым, ингибируют процесс фотосинтеза. Под влиянием меди, особенно в концентрациях, превышающих 100 мкМ, происходит уменьшение содержания хлорофиллов *a* и *b* в листьях рапса (Табл. 2)

Наиболее яркое отрицательное действие меди наблюдается на уровне хлорофилла *b*.

Сернокислый цинк также, как и медь, оказывает негативное влияние на хлорофилл. В среднем содержание хлорофилла в опытных вариантах после 5 дней действия сульфата цинка в концентрациях 500-1500 мкМ было на 60%

ниже контрольного варианта. При этом данный эффект со временем только усиливался.

Таблица 2: Содержание хлорофилла в листьях рапса под влиянием солей цинка и меди в течение 5 дней, мг / г свеж. массы.

Вариант	Хлорофилл <i>a</i>	Хлорофилл <i>b</i>	Хл. <i>a+b</i>	Хл. <i>a/b</i>
Контроль	0,55±0,06	0,20±0,01	0,75	2,75
Cu 50 мкМ	0,44±0,08	0,12±0,02	0,56	3,66
Cu 100 мкМ	0,40±0,03	0,14±0,02	0,54	2,86
Cu 150 мкМ	0,31±0,06	0,07±0,01	0,38	4,42
Zn 500 мкМ	0,22±0,03	0,06±0,02	0,28	3,66
Zn 1000 мкМ	0,20±0,03	0,07±0,02	0,27	2,85
Zn 1500 мкМ	0,17±0,04	0,05±0,008	0,22	3,40
без Zn	0,48±0,04	0,22±0,03	0,70	2,18

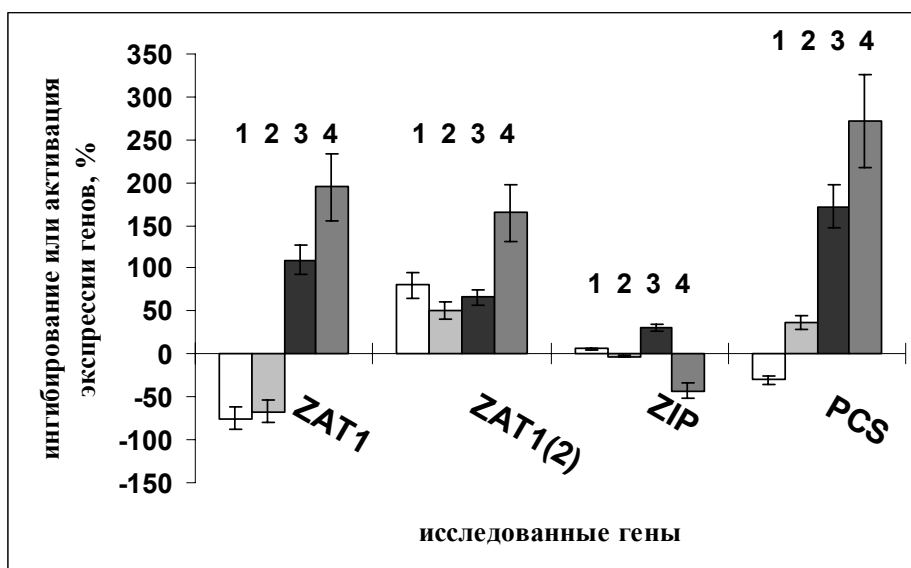
При выращивании рапса в отсутствие цинка общий уровень хлорофилла оказался на 7-14% ниже, чем у растений, выращенных в обычных условиях.

Как и в случае окислительного стресса, вызванного внесением ТМ (по накоплению МДА), сходный по интенсивности негативный эффект солей меди и цинка возникал при концентрациях цинка в 10 раз превышающих концентрацию меди.

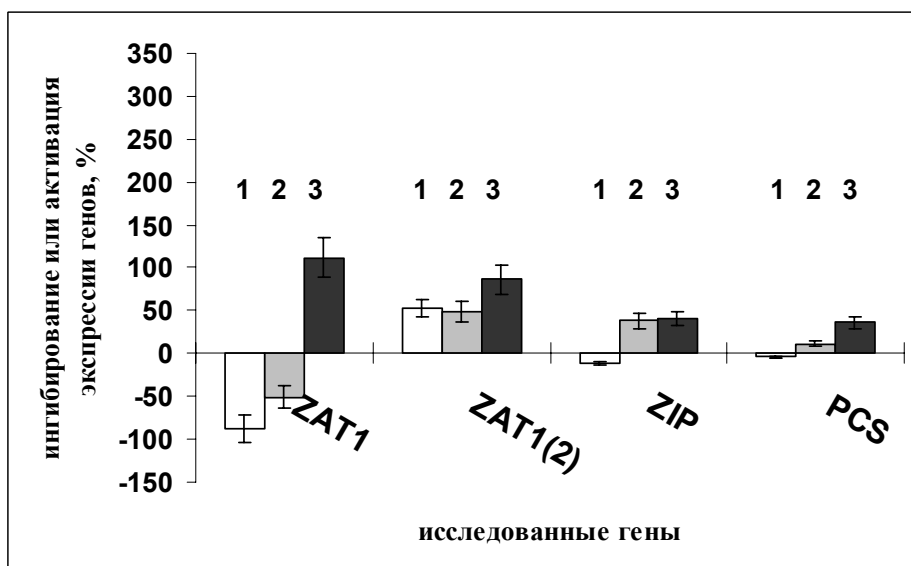
Влияние цинка на экспрессию генов системы его детоксикации

В данной части работы сделана попытка охарактеризовать на уровне экспрессии генов систему детоксикации ионов тяжелых металлов. Была исследована экспрессия 4 генов: *ZIP 10* (продукт – плазматический транспортер ионов), 2 гена *ZAT* (белок расположен в тонопласте) и *PCS* (его продукт – фермент, локализованный в цитозоле, осуществляет синтез в клетке фитохелатинов)

При избытке соли цинка в среде не происходило активации гена транспортера *ZIP 10*, локализованного в плазматической мембране (рис. 10 А,Б).



А.



Б.

Рис. 10. Экспрессия генов *ZAT1*, *ZAT1(2)*, *ZIP* и *PCS* после 5-дневной (А) и 10-дневной (Б) обработки растений рапса цинком; 1 – Zn 500 мкМ, 2 – Zn 1000 мкМ, 3 – Zn 2500 мкМ, 4 – Zn 5000 мкМ.

Вероятно, первой реакцией растения в ответ на избыток ТМ является ограничение поступления ионов цинка внутрь клетки. Однако действие только данного механизма явно недостаточно. Следующим звеном в сложной цепи процессов является активация гена *PCS* (рис. 10 А). Цель такой активации может заключаться в связывании в цитозоле избытка цинка. В данном варианте опыта обнаружено, что оба гена тонопластных транспортеров, особенно *ZAT1*,

активируются в ответ на избыток соли цинка в среде. Известно, что активное функционирование транспортеров в вакуолярной мембране – основа детоксикации избыточных концентраций ионов внутри клетки (Hall, 2002).

При более длительном воздействии цинка происходит снижение активности экспрессии гена *PCS* и отсутствие дальнейшей активации обеих форм гена *ZAT* после 10 дней воздействия избытка цинка (рис. 10 Б), что, возможно, отражает недостаточность исследованных нами отдельных элементов системы защиты на клеточном уровне от повышенных концентраций ТМ.

В условиях недостатка цинка в питательном растворе наблюдалась 10 кратная активация экспрессии гена транспортера плазматической мембраны *ZIP* (Табл. 3). Напротив, экспрессия тонопластных транспортеров цинка в листьях растений, выросших при недостатке цинка, была понижена. В корнях экспрессия этих генов достоверно не отличалась от контроля. Экспрессия *PCS* гена в отсутствии цинка была подавлена в корнях на 90%. Однако особенно сильно повлиял недостаток цинка на содержание в корнях мРНК гена транспортера плазмалеммы *ZIP* - уровень его экспрессии был активирован в 80 раз.

Таблица 3: Экспрессия генов *ZAT1*, *ZAT1(2)*, *ZIP* и *PCS* в условиях недостатка цинка

вариант	<i>ZAT1</i>	<i>ZAT1(2)</i>	<i>ZIP</i>	<i>PCS</i>
контроль	100	100	100	100
лист	32 ± 4	69 ± 4	1069 ± 146	21±4
корень	86 ± 7	91 ± 8	8196 ± 740	10 ± 3

Перенос растений в условия с резко повышенной концентрацией цинка изменяет картину экспрессии исследуемых генов. Уже через 24 часа экспрессия гена *ZIP 10* понижается не только по отношению к его уровню при недостатке цинка в среде, но и по отношению к контрольным значениям. Наоборот, активность гена *PCS* резко повысилась в листьях. Гены транспортеров,

локализованных в тонопласте – *ZAT1* и *ZAT1(2)* - экспрессируются примерно на уровне контроля как в корнях, так и в листьях (Табл. 4).

Таблица 4: Экспрессия генов *ZAT1*, *ZAT1(2)*, *ZIP* и *PCS* в условиях резкого повышения концентрации цинка до 1000 мкМ (Б).

вариант	<i>ZAT1</i>	<i>ZAT1(2)</i>	<i>ZIP</i>	<i>PCS</i>
контроль	100	100	100	100
лист	112 ± 10	105 ± 9	28 ± 4	1075 ± 46
корень	110 ± 8	118 ± 24	13 ± 2	16 ± 1

В дальнейшем было бы исключительно важно изучить влияние цинка не только на содержание индивидуальных мРНК, но и на содержание кодируемых ими белков, что может значительно углубить понимание механизма детоксикации тяжелых металлов в растениях.

Одним из последствий негативного действия меди и цинка в повышенных концентрациях на растения является активация окислительного стресса. Активные формы кислорода, образующиеся в клетке под действием ТМ, повреждают биологические мембраны, нарушают физиологические процессы (фотосинтез, дыхание, рост). Получение трансгенных растений с повышенной устойчивостью к возникающему окислительному стрессу (как неизбежному спутнику всех видов стресса) представляет собой перспективный научный подход для изучения механизмов адаптации растений к неблагоприятным факторам, в том числе и к действию ТМ. В связи с этим была проведена работа по получению трансгенных растений рапса с повышенной экспрессией гена транс-фактора риса *OsMyb4* способного увеличивать устойчивость данных растений к неблагоприятным факторам, в частности, к действию тяжелых металлов в высоких концентрациях.

Получение и анализ трансгенных растений рапса

Трансформация рапса осуществлялась с использованием метода совместной культивации эксплантов (семядольных листьев) и агробактерий, нанесенных газоном на поверхность агаризованной среды в чашке Петри. Нами

было проведено 7 трансформаций, в которых использовали около 3000 эксплантов. В конечном итоге было получено 450 регенерантов с учетом того, что трансформация осуществлялась двумя конструкциями. Из этих регенерантов около 130 оказалось жизнеспособными, при этом 96 были получены после трансформации конструкцией *COR15Myb4* и 34 после трансформации конструкцией *pGAMyb4*.

После первичного отбора регенерантов на канамицине, из их листьев была выделена ДНК. С помощью специфичных праймеров проверялось присутствие как целевого (*Myb4*), так и селективного (*nptII*) генов. Некоторые примеры наличия *OsMyb4* гена в геноме рапса после трансформации представлены на рисунке 11.

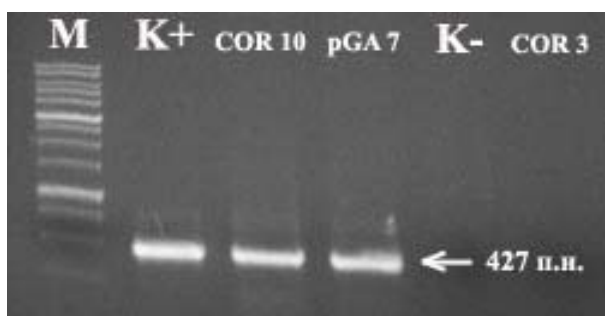


Рис. 11. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных при использовании праймеров *Myb*. «М» - маркер молекулярных весов (1Кб), «К+» - положительный контроль, «К-» - отрицательный контроль, COR 10, COR 3, pGA 7 – линии трансформированных растений. Продукт ПЦР размером 427 пар нуклеотидов.

Результаты анализа части растений на наличие в геноме встраиваемого селективного гена *nptII* изображены на рисунке 12. Из всех трансгенных линий, несущих ген *Myb4* под контролем промотора *cor15*, для дальнейшей работы была выбрана линия 10. С трансгенного растения линии 10 было получено около 600 семян. Из 40 семян были выращены растения, из листьев которых выделена ДНК и проведена полимеразная цепная реакция с использованием праймеров на целевой *Myb4* и селективный ген *nptII*. Из 40 проанализированных растений первого поколения в 11 были обнаружены встроенные *Myb4* и *nptII* гены.

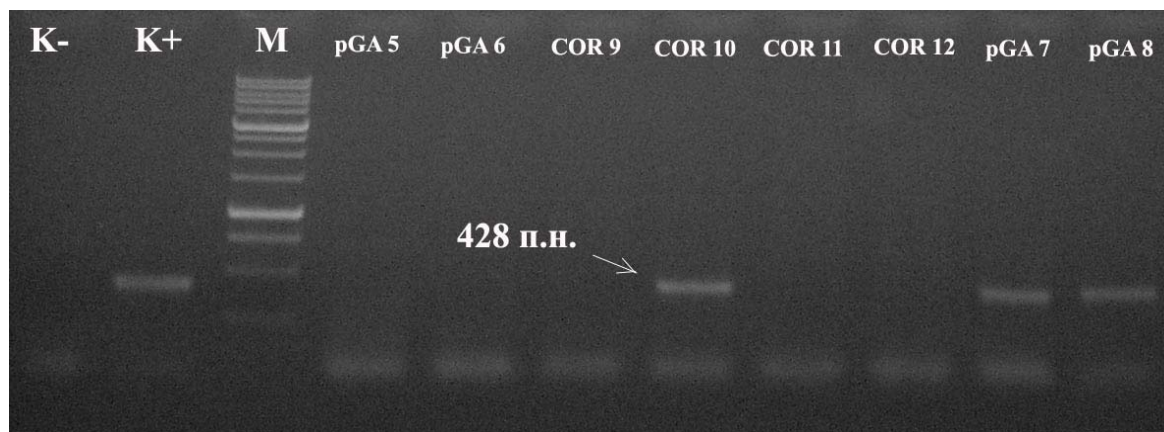


Рис. 12. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных при использовании праймеров Km. «М» - маркер молекулярных весов (1Kb), «К+» - положительный контроль, «К-» - отрицательный контроль, COR 9, COR 10, COR 11, COR 12, pGA 5, pGA 6, pGA 7, pGA8 – линии трансформированных растений. Продукт ПЦР размером 428 пар нуклеотдов.

Дальнейшая работа будет посвящена оценке влияния гиперэкспрессии гена *Myb4* на устойчивость трансгенных растений к ТМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе была сделана попытка оценить токсичность солей меди и цинка для растений рапса сорта *Вестар* и приступить к изучению механизмов адаптации рапса к действию повышенных концентраций тяжелых металлов.

Как показали проведенные эксперименты, медь представляет собой гораздо более токсичный химический элемент, чем цинк. Сернистая медь проявляет негативное действие на многочисленные исследованные физиологические параметры при значениях концентраций в среднем в 10 раз меньших, нежели концентрации цинка, оказывающих сходное ингибирующее действие.

Растения рапса накапливали медь в надземных органах лишь в ограниченных количествах. Напротив, накопление цинка происходило весьма активно. В отдельных экспериментах с сульфатом цинка растения рапса аккумулировали в листьях до 7 мг цинка / г сухой массы листа, что приближает рапс к гипераккумуляторам.

Токсичность исследованных ТМ проявляется в изменении водного статуса растений, в окислительном стрессе, выражающемся в усилении перекисного окисления липидов и деградации хлорофилла.

При действии ТМ на растения большое значение в процессах адаптации к стрессорным условиям имеет регуляция осмотического потенциала в клетках растений. Снижение осмотического потенциала при воздействии меди и цинка могло происходить из-за повышения концентрации осмотически активных веществ за счет уменьшения объема клеток. Об этом свидетельствует уменьшение оводненности тканей в листьях. Не исключено, однако, что активная осморегуляция происходила также благодаря поступлению или синтезу осмотически активных веществ. На этот механизм указывают данные о повышении содержания свободного пролина в клетках растений под действием избытка ТМ в среде.

В работе изучено влияние ТМ на экспрессию гена фермента синтеза фитохелатинов и некоторых мембранных транспортеров ионов металлов. Оказалось, что клеточные механизмы детоксикации избытка ионов направлены на сохранение базового уровня экспрессии гена *ZIP*, кодирующего плазматический транспортер ионов ТМ. Повышение поступления ионов цинка внутрь клетки ведет к пропорциональному увеличению уровня экспрессии гена, кодирующего фермент синтеза хелаторов ионов (*PCS*), а также генов транспортеров тонопласта (*ZAT*), определяющих секвестеризацию избытка ионов в вакуоли.

В ответ на недостаток цинка в среде наблюдается резкая активация гена *ZIP*, особенно в корнях. При этом снижается уровень экспрессии гена *PCS*. При недостаточном количестве цинка гены тонопластных транспортеров (*ZAT*) обнаруживают тенденцию к снижению экспрессии, что также отражает отсутствие необходимости компартментации ионов в вакуоли. При переносе растений, выращенных на питательной среде без цинка, в условия с его избытком, наблюдается сильное подавление уровня экспрессии гена *ZIP* на фоне активации гена *PCS*.

Таким образом, в условиях стресса (избытка цинка в среде) обнаруживается сложная и скоординированная регуляция экспрессии генов рапса, отвечающих за поступление и связывание ионов ТМ.

Поскольку соли меди и цинка вызывают у растений окислительный стресс, то нами были получены трансгенные растения рапса, несущие ген транс-фактора риса *OsMyb4*, который предотвращает негативный эффект окислительного стресса и, таким образом, может повысить устойчивость растений рапса к действию данных ТМ. В дальнейшем будет изучено влияние повышенной экспрессии *OsMyb4* гена на степень устойчивости трансгенных растений к неблагоприятным факторам среды, прежде всего, повышенным концентрациям тяжелых металлов.

ВЫВОДЫ

1. Для растений рапса установлена значительно более высокая токсичность сернокислой меди в сравнении с сернокислым цинком при действии этих ТМ на прорастание семян, рост проростков и молодых растений.
2. Растения рапса накапливают относительно небольшие количества меди в надземных органах, при этом способны аккумулировать в листьях до 7,5 мг цинка на 1 г сухой массы, что приближает рапс к группе растений-гипераккумуляторов.
3. Токсический эффект солей меди и цинка проявляется в нарушении водного статуса листьев рапса и в активации окислительного стресса.
4. В процессе адаптации к избытку ТМ существенная роль принадлежит регуляции осмотического потенциала и аккумуляции в клетках листьев рапса свободного пролина – совместимого осмолита и антиоксиданта.
5. У рапса клеточные механизмы детоксикации избытка цинка основаны на сбалансированной активации генов фитохелатинсинтазы (*PCS*) и транспортеров тонопласта (*ZAT1* и *ZAT1(2)*) при сохранении базового уровня экспрессии гена транспортера плазмалеммы (*ZIP*).

6. Ответом растений на недостаток цинка является резкая активация экспрессии гена плазматического транспортера (*ZIP*) при снижении экспрессии генов вакуолярных транспортеров (*ZAT1* и *ZAT1(2)*). При резком повышении содержания цинка в среде подавляется экспрессия гена транспортера плазмалеммы (*ZIP*) и активируется ген фитохелатинсинтазы (*PCS*), что ограничивает проникновение ионов цинка в клетку и обеспечивает связывание их избытка в цитозоле.

7. Получены и проанализированы трансгенные растения рапса, содержащие ген транс-фактора риса (*OsMyb4*), способного повышать устойчивость растений к ТМ, прежде всего, за счет снижения негативного эффекта на растения окислительного стресса.

Список работ по материалам диссертации

1. Радионов Н.В., Королева М.А., Холда О.А., Кузнецов В.В., Данилова С.А. Повышение активности фермента супероксиддисмутазы в трансгенных растениях ячменя (*Hordeum vulgare* L.), содержащих ген Fe-СОД из *Arabidopsis thaliana* // VI Международный симпозиум «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования». Пущино, 2005, с. 359-360.

2. Данилова С.А., Радионов Н.В., Холда О.А., Белозерова Н. С., Кузнецов В.В. Особенности применения селективного гена неомицинфосфотрансферазы II (*npt II*) для отбора трансгенных растений ячменя // Материалы III съезда Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Москва, 2005, с. 106-107.

3. Данилова С.А., Демиденко А.В., Радионов Н.В., Кузнецов В.В. Повышение устойчивости кукурузы (*Zea mays* L.) к окислительному стрессу за счет введения гена Fe-СОД из *Arabidopsis thaliana* // Сборник тезисов «Международная конференция Современная физиология растений: от молекул до экосистем». Сыктывкар, 2007, с. 182-183.

4. Радионов Н.В., Вагун И.В., Кислова У.Л., Юдин А.В., Холодова В.П., Кузнецов Вл.В. Устойчивость рапса к действию высоких концентраций солей

меди и цинка // Международная конференция «Современная физиология растений: от молекул до экосистем». Сыктывкар, 2007, с. 335-337.

5. Радионов Н.В., Вагун И.В., Паскарел Н.К., Кислова У.Л., Ралдугина Г.Н., Маттана М., Ваннини К., Кузнецов Вл.В. Трансформация рапса и табака геном транс-фактора (*OsMyb4*) с целью получения трансгенных растений, устойчивых к неблагоприятным факторам // Международная конференция «Современная физиология растений: от молекул до экосистем». Сыктывкар, 2007, с. 337-339.

6. Радионов Н.В., Волков К.С., Холодова В.П. Сравнительный анализ устойчивости растений рапса к повышенным концентрациям меди и цинка // Вестник РУДН, 2007, №4, с. 21-30.