

На правах рукописи

**АЛОБАЙДИ**

**Халид Хашем Абдуль Монием**

**Физиологические механизмы устойчивости трёх видов растений рода  
*Brassica* к высоким концентрациям ионов меди**

Специальность 03.01.05 - физиология и биохимия растений

**АВТОРЕФЕРАТ**

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, и на кафедре ботаники, физиологии растений и агробиотехнологии Российского университета дружбы народов, Москва.

**Научный руководитель:** кандидат биологических наук

**Холодова Валентина Павловна**

**Научный консультант:** доктор биологических наук профессор, чл.-корр. РАН

**Кузнецов Владимир Васильевич**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии растений Российского государственного аграрного университета - МСХА имени К.А. Тимирязева

**Кондратьев Михаил Николаевич**

Доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой ботаники, физиологии и биохимии растений Пензенского государственного педагогического университета имени В.Г.Белинского

**Хрянин Виктор Николаевич**

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский педагогический государственный университет

Защита состоится 12 апреля 2013 г. в 15.30 на заседании диссертационного совета Д 501.001.46 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 12, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, аудитория \_\_\_\_\_.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
к.б.н. М.А. Гусаковская



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Техногенное загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами (ТМ) – одна из наиболее острых экологических проблем (Body et al., 1991). К тяжелым металлам относятся химические элементы, имеющие плотность больше  $5 \text{ г/см}^3$  и атомную массу более 40 Да (Кузнецов, Дмитриева, 2011; Кошкин, 2010). Они представляют собой серьезную угрозу, прежде всего, из-за их высокой токсичности (Paragiannis et al., 2004). Растения, растущие на загрязненной почве, могут поглощать ТМ, аккумулируя и передавая их животным и людям при употреблении растительных продуктов в пищу. Несмотря на то, что многие ТМ, такие, например, как медь, цинк, кобальт, железо являются эссенциальными элементами, т.е. элементами, в низких концентрациях жизненно необходимыми для нормального роста и развития организма (Kholodova et al., 2011), в высоких концентрациях они негативно влияют как на растения, так и на человека, накапливаясь в организме и вызывая различные нарушения, в частности, ингибирование роста и снижение урожая, торможение фотосинтеза и дыхания, нарушение синтеза белка и донорно-акцепторных отношений, инактивацию ключевых ферментов метаболизма, изменение водного и гормонального статуса и даже гибель организма (Титов и др., 2007; Kholodova et al., 2011).

Для очистки почв от загрязнения ТМ в настоящее время разрабатывают различные технологии, одной из которых является фиторемедиация - метод, в основе которого лежит использование растений для очистки загрязненных территорий (Кошкин et al., 2010; Буравцев, Крылова, 2005; Бричкова, 2003). Наиболее часто для этой цели используется метод фитоэкстракции, который основан на способности некоторых видов растений поглощать ТМ из почвы и аккумулировать их в надземных органах (Barbafieri et al., 2011; Koshkin, Vagun 2010; Chaney et al., 1997; Raskin et al., 1994). Эффективность процесса фитоэкстракции зависит от подбора тех видов растений, которые не только

накапливают в надземных органах ТМ, но и производят большое количество биомассы (Jadia and Fulekar, 2009; Das and Maiti, 2007; Raskin et al., 1994).

Растения, называемые «фиторемедиаторами» и растущие на загрязненных участках, прежде всего, должны быть устойчивыми к высоким концентрациям солей ТМ (Salt et al., 1995; Schmidt, 2003; Bricker et al., 2001). Помимо этого, они должны быстро расти и продуцировать большое количество биомассы, а также содержать вещества, предотвращающие поедание их травоядными животными для предотвращения попадания ТМ в пищевые цепи.

Отбор толерантных к тяжелым металлам видов растений является ключевым звеном при создании эффективной технологии фиторемедиации. В литературе имеются сведения, что наиболее устойчивыми растениями к повышенному содержанию ТМ в почве являются представители семейств крестоцветных, злаковых и бобовых (Prasad, Freitas, 1999).

Одним из наиболее токсичных металлов, загрязняющих почвы, являются соли меди. Тем не менее, в настоящее время не известно ни одного вида растений, которые накапливали бы этот ТМ в больших количествах, т.е. были бы гипераккумуляторами меди, хотя и имеются данные по изучению в качестве ремедиаторов меди растений *Azolla pinnata* (Азолла перистая), *Brassica juncea* (горчица), *Eichornia crassipes* (водный гиацинт), *Helianthus annuus* L. (подсолнечник), *Hydrocotyle umbellata* L. (Щитолистник зонтичный), *Lemna minor* L. (Ряска маленькая), *Zygochloa barbinervis* L. (Парнолистник обыкновенный) (Прасад, 2003).

### **Цель и задачи исследования**

В связи с выше сказанным весьма актуальной является проблема подбора растений, способных расти на загрязненных солями меди почвах. Цель нашего исследования заключалась в оценке устойчивости и способности к биоаккумуляции меди (Cu) растений трех видов рода *Brassica*, хорошо растущих на загрязненных ионами этого металла почвах Северного Ирака.

В соответствии с этой целью нами были поставлены следующие задачи:

(1) Сравнить устойчивость 3-х видов растений (*Brassica alba*, *Brassica juncea* и *Brassica nigra*) к повышенным концентрациям солей меди и их способность аккумулировать ионы этого металла.

(2) Исследовать влияние повышенных концентраций Cu на некоторые интегральные физиологические процессы у растений.

(3) Исследовать влияние Cu на функционирование отдельных компонентов антиоксидантных систем у выбранных видов растений.

(4) Исследовать экспрессию ряда генов, участвующих в детоксикации ионов меди.

**Научная новизна.** В работе впервые установлена сравнительно высокая устойчивость растений всех трех изученных видов р. *Brassica* – *B. alba*, *B. juncea* и *B. nigra* – к повышенному содержанию меди в среде и продемонстрировано, что все эти растения, прежде всего *B. alba*, являются потенциально пригодными в целях фиторемедиации умеренно загрязненных медью территорий. В опытах на растениях исследованных видов р. *Brassica* в гидропонной культуре и в почвенных экспериментах показано, что исследованные виды относятся к растениям-индикаторам. Установлено, что устойчивость исследованных растений к токсическому действию избыточного уровня меди определялась их способностью аккумулировать низкомолекулярные антиоксиданты, прежде всего, общие растворимые фенолы, флавоноиды и антоцианы, а также свободный пролин. Более высокая устойчивость растений *B. alba* к ионам меди подтверждалась также меньшим уровнем перекисного окисления липидов и более интенсивной экспрессией генов, продукты которых обеспечивают хелатирование ионов меди (гены *PCS*, *MT1* и *MT2*) и их перенос из цитозоля в апопласт (*HMA5*).

**Практическая ценность работы.** Полученные в процессе выполнения работы данные о механизмах адаптации растений трех видов рода *Brassica* к высоким концентрациям солей меди расширяют наши теоретические представления о стратегии выживания растений в экстремальных условиях. Сравнительный анализ устойчивости и фиторемедиационной способности исследованных 3-х видов растений

потенциально позволяет их использовать для фиторемедиации умеренно загрязненных медью территорий. Изученные растения *Brassica alba* могут быть использованы в селекционной практике в качестве исходных линий для создания новых сортов растений с повышенной устойчивостью к солям тяжелым металлам. Данные, полученные в настоящей работе и сделанные на их основе обобщения, могут быть использованы в курсах лекций по стресс-физиологии и трансгенезу для студентов различных учебных заведений.

**Апробация работы.** Результаты работы были представлены: на Всероссийском симпозиуме "Растение и стресс" (Москва. 2010), на семинаре Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (2011), а также на расширенных семинарах кафедры ботаники, физиологии растений и агробиотехнологии РУДН (2010, 2012).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано три работы, две из которых в изданиях из списка ВАК.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, 4 глав, выводов и списка цитированной литературы. Объем работы составляет 141 страниц. В диссертации содержится 14 рисунков, 18 таблиц. Список цитированной литературы содержит 275 источник, в том числе 235 – на иностранных языках.

## **ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Объект исследования.** В качестве объектов исследования были выбраны 3 вида растений семейства Brassicaceae: *Brássica júncea* L. (горчица сарептская), *Brassica alba* (L.) Schmidt (*Sinapis alba* L.) (горчица дикая или белая), *Brassica nigra* (L.) W.D.J. Koch (*Sinapis nigra* L.) (горчица черная или обыкновенная).

Семена *Brássica júncea* сорта Лера предоставлены Донским филиалом ВНИИМК Ростовской области. Семена *Brassica nigra* и *Brassica alba* дикого типа получены из Багдадского региона Ирака.

**Методы исследования.** Измерение содержания меди в тканях растений проводили с помощью атомно-адсорбционного спектрофотометра после мокрого озоления, содержание пигментов определяли по методу Шлыка (1971), содержание малонового диальдегида (МДА) определяли по методу Heath and Packer (1968). Содержание свободного пролина - по методу Bates et al. (1973). Определение

растворимых фенольных соединений проводили по методу Фолина-Дениса (Загоскина и др., 2003), содержание флавоноидов - по методу Gage (Gage, Wendei, 1950), содержание антоцианов - по методу Муравьевой (Муравьева и др., 1987). Тотальную ДНК выделяли методом Fulton (Fulton et al., 1995), обрабатывали ее РНКазой (Serva, Германия) и оценивали качество ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле. Тотальную РНК выделяли фенольным методом по Westhoff et al. (1981). Очистку ДНК от примесей, обратную транскрипцию и полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием реактивов фирм «Fermentas» (Литва) и «СибЭнзим» (Россия). Подбор праймеров осуществляли с помощью программ Oligo 6.71. Для ПЦР использовали праймеры, синтезированные фирмой «Литех» (Россия):

**Таблица 1**

**Последовательность праймеров, используемых в полимеразной-цепной реакции после обратной транскрипции**

| Название праймеров | Последовательность ((5'-3')                                |
|--------------------|--|
| <i>HMA5</i>        | s -GACAACGACGATTCTCTGAGTAA<br>as -ТААСАСААГСАГСАААГСАТ     |
| <i>MT1</i>         | s- GGCAGATTCTAACTGTGGATGT<br>as- CCCACAGCTGCAGTTTGAT       |
| <i>MT2</i>         | s- GTCTTGCTGTGGAGGGAAACTGT<br>as- GGGTTGCACTTGCAGTCAGAT    |
| <i>PCS</i>         | s- ATCAGACCACCATTGACGACTT<br>as- GAACTCACAAGACGAGGAACATCT  |
| <i>18SrRNA</i>     | s- GAGTGATGTGCCAGACCTAGGAATT<br>as- ATGCTGATCCGCGATТАCTAGC |

*Примечание:* s – прямой праймер; as - обратный праймер.

Все опыты были поставлены в трехкратной биологической повторности. Аналитическая повторность для каждой из них равна 3. Результаты обработаны с использованием пакета программ Windows Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Изучение действия повышенных концентраций $\text{CuSO}_4$ на прорастание семян и рост проростков растений 3-х видов *Brassica*

Дезинфицированные, как описано в разделе Материалы и методы, семена трех видов растений *B. alba*, *B. juncea* и *B. nigra* были выложены в чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную раствором  $\text{CuSO}_4$ . Использовали растворы в концентрации 10-300 мкМ, контролем служила вода. На 3 суток подсчитывали число проросших семян и измеряли длину корня проростков.

### Влияние $\text{CuSO}_4$ на прорастание семян 3-х видов *Brassica*

Повышенные концентрации меди негативно влияли на прорастание семян всех исследованных видов *Brassica*, полная потеря всхожести происходила при 300 мкМ  $\text{CuSO}_4$ . Различия между видами становились заметными уже при 10 мкМ – *B. alba* практически не отличалась от контроля, но прорастание *B. nigra* и *B. juncea* заметно подавлялось. Проведен пересчет действия меди по отношению к прорастанию в контрольном варианте каждого из видов (Рис. 1).

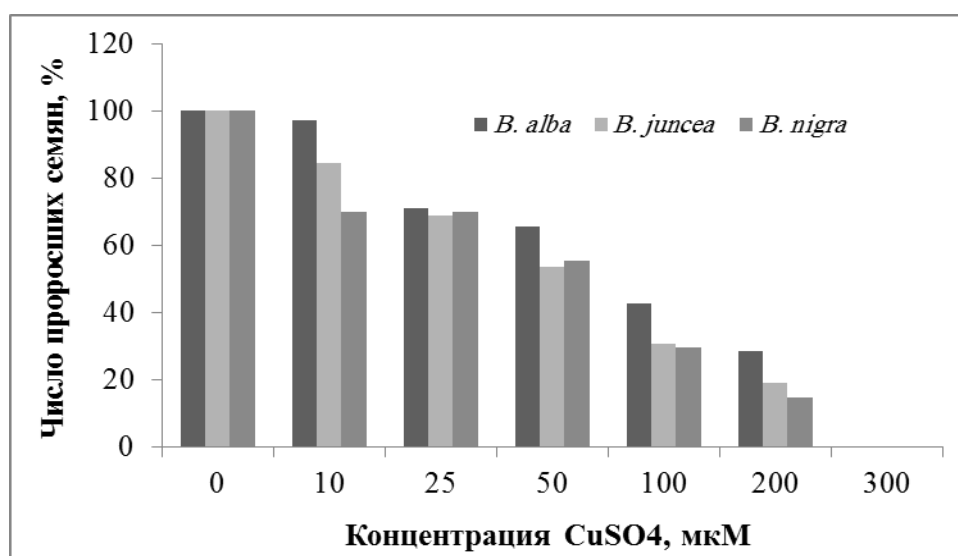


Рис. 1. Влияние  $\text{CuSO}_4$  на прорастание семян 3-х видов *Brassica*

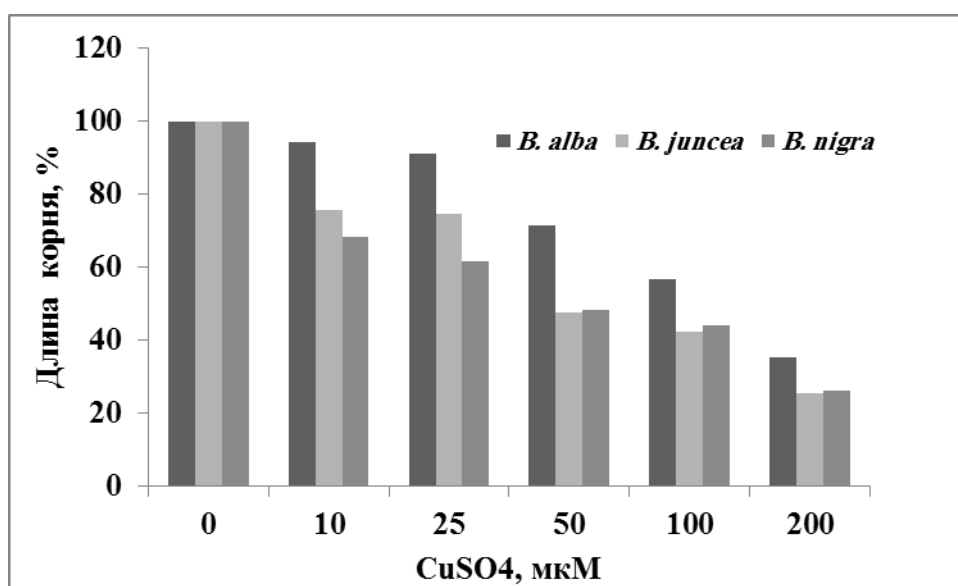
За 100% принимали число семян, проросших на  $\text{H}_2\text{O}$

Большая устойчивость *B. alba* хорошо видна не только при 10 мкМ, но и при 100 и 200 мкМ  $\text{CuSO}_4$ . *B. juncea* и *B. nigra* при умеренном воздействии меди (25 мкМ) не уступали по устойчивости *B. alba*, но 100-200 мкМ  $\text{CuSO}_4$  значительно меньше снижало прорастание *B. alba* в сравнении с двумя другими видами.



## Влияние $\text{CuSO}_4$ на рост корня при прорастании семян 3-х видов *Brassica*

Повышенные концентрации  $\text{CuSO}_4$  заметно снижали длину корней проростков всех трех видов. При этом, учитывая значительно более быстрый рост корней проростков *B. juncea* и *B. nigra* по отношению к *B. alba*. Менее всего торможение роста проявлялось на проростках *B. alba*, достоверное снижение роста которых начиналось только с 50 мкМ  $\text{CuSO}_4$  и даже при максимальной из использованных концентраций рост корня снизился до 40% от контроля, тогда как у *B. juncea* и *B. nigra* – не превышал 27% от контроля (Рис. 2).



**Рис.2.** Влияние  $\text{CuSO}_4$  на рост корней проростков растений 3-х видов *Brassica*  
За 100% принимали длину корней проростков, росших на воде.

Таким образом, представленные результаты позволяют заключить, что на начальном этапе онтогенеза растения *B. alba* по сравнению с *B. juncea* и *B. nigra* показали довольно хорошую устойчивость к высоким концентрациям  $\text{CuSO}_4$ .

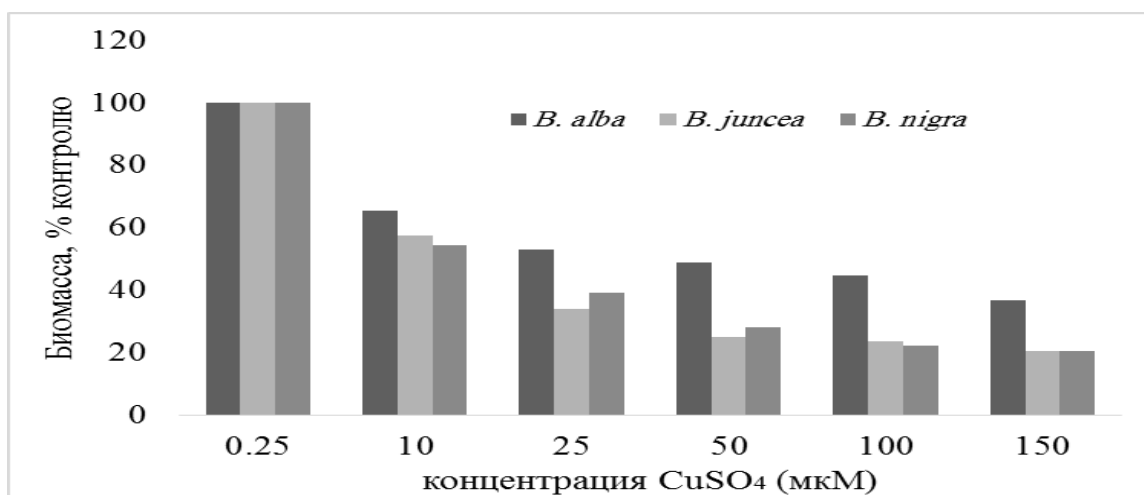
## Изучение действия повышенных концентраций $\text{CuSO}_4$ на молодые растения, растущие в водной культуре

10-12-дневные проростки растений всех 3-х видов, выбранных нами для изучения, пророщенные в перлите, пересаживали в сосуды со средой Хогланда-Снайдерс, на которой выдерживали в течение 3-4-х недель. Затем в сосудах заменяли стандартную среду на ту же среду, но дополненную различными концентрациями  $\text{CuSO}_4$  (от 10 до 150 мкМ). Через 10 дней растения вынимали из сосудов и взвешивали, определяя накопление сырой биомассы, и затем проводили изучение

физиологических параметров: аккумуляцию меди в листовой ткани и корнях, накопление пролина, содержание фотосинтетических пигментов, а также количество фенольных соединений. Контролем служили растения, выращиваемые на стандартной среде, содержащей 0,25 мкМ CuSO<sub>4</sub>.

### Аккумуляция биомассы

Растения всех трех видов лучше всего росли на стандартной среде, при этом наиболее высокой была биомасса *B. juncea* и *B. nigra*; в этих условиях биомасса растений *B. alba* была почти в 2 раза ниже, чем у растений других двух видов. Однако, если у *B. juncea* и *B. nigra* под действием самой высокой из проверенных нами концентраций сульфата меди наблюдалось снижение накопления биомассы почти в 5 раз.



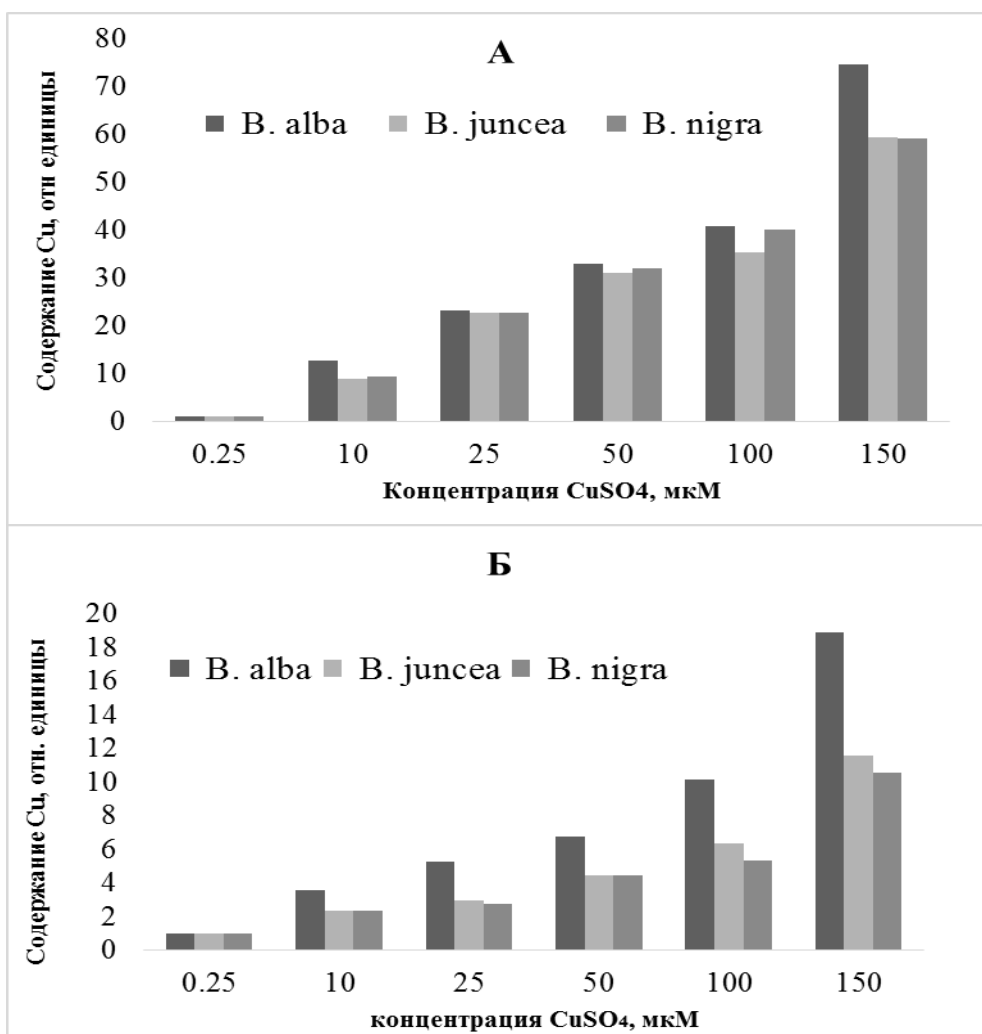
**Рис.3.** Накопление сырой биомассы у растений 3-х видов Brassica, растущих в водной культуре, 10 сут. при действии различных концентраций CuSO<sub>4</sub>

За 100% принимали биомассу растений, росших в стандартных условиях (*B. nigra* с 4.68 до 0.96; *B. juncea* с 4.42 до 0.91), то у растений *B. alba* накопление биомассы понизилось всего в 2.7 раза с увеличением содержания CuSO<sub>4</sub> в среде (с 2.55 до 0.94), что хорошо видно на диаграмме (рис.3).

### Аккумуляция меди в тканях растения

Одним из важнейших параметров, определяющих фиторемедиационный потенциал культуры, является аккумуляция тяжелых металлов в надземных органах растений. Было обнаружено, что при росте на стандартной среде, с содержанием 0,25 мкМ CuSO<sub>4</sub>, концентрация меди в органах молодых растений всех

трех изученных видов была практически идентична, находясь в диапазоне 28-31 мкг / г сухой биомассы для корней и 9-11 мкг / г сухой биомассы для листовой ткани.



**Рис.4.** Содержание Cu в листьях (А) и корнях (Б) 3-х видов растений *Brassica*. Содержание Cu в ткани контрольных растений принято за единицу.

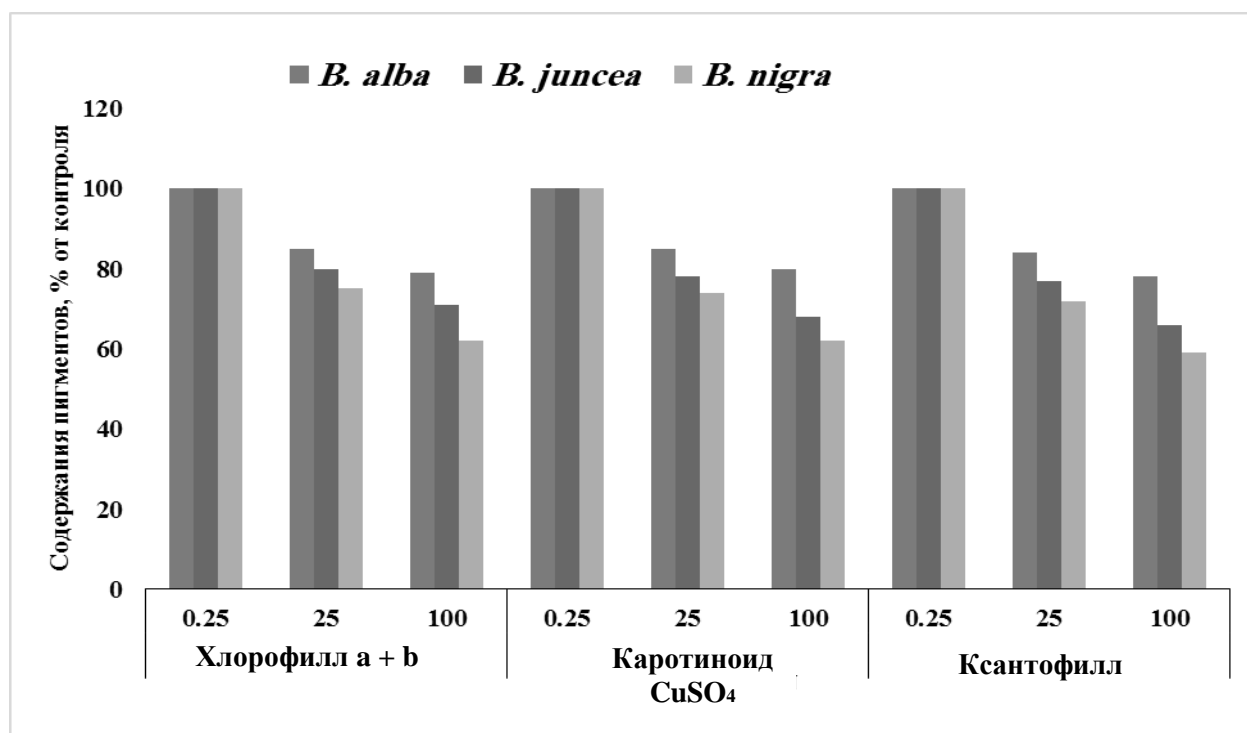
Содержание меди в листьях растений *B. alba* было значительно выше, чем у этих двух видов почти во всех вариантах опытов. Особенно наглядно проявлялось это при расчете по отношению к значениям для контрольного варианта того же вида. Так, максимальная концентрация накопленной в листьях меди превосходила соответствующее значение контрольного варианта у растений *B. alba* в 8.1 раза, у *B. juncea* в 6.4 раза и у *B. nigra* в 5.2 раза (Рис. 4).

Таким образом, из представленных данных четко видно, что с увеличением концентрации меди в питательном растворе происходило значительное накопление Cu в тканях растений. При этом у растений *B. alba* накопление было выше, чем у двух

других видов и в корнях меди содержалось во много раз больше, чем в листовой ткани.

### Влияние меди на содержание пигментов

Среди токсичных эффектов, вызванных действием меди в высоких концентрациях, было отмечено появление хлороза, что, вероятно, связано с изменением содержания фотосинтетических пигментов. Содержание всех исследованных пигментов уменьшалось при увеличении концентрации меди в среде, хотя и не очень сильно, что видно из результатов, представленных в таблице 9.



**Рис.5.** Влияние содержания в среде CuSO<sub>4</sub> на пигменты в растениях 3-х видов *Brassica*

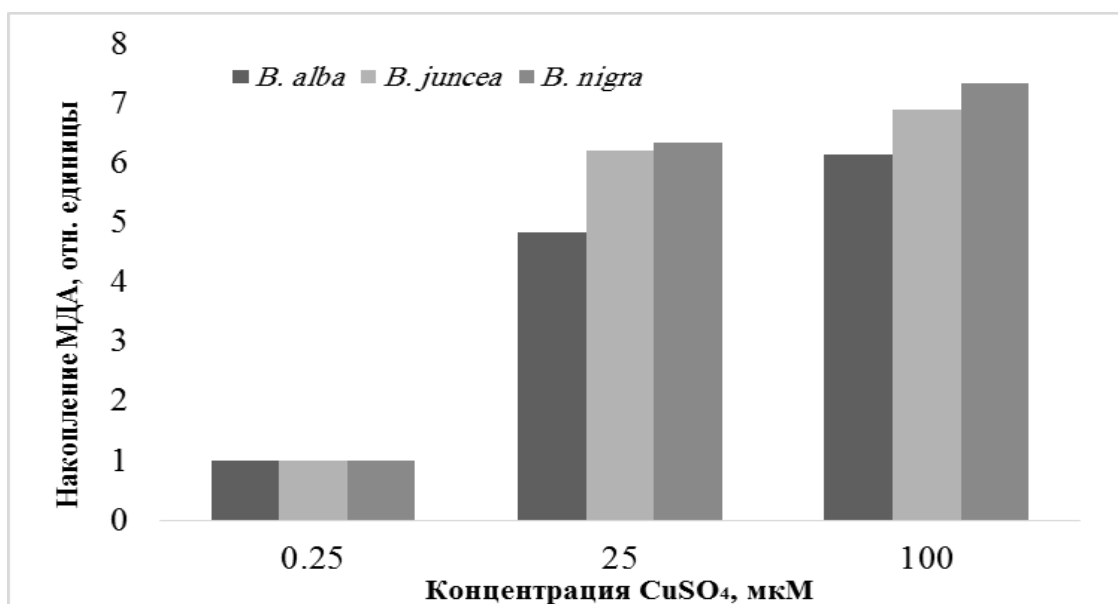
За 100% принято содержание пигмента в контрольных растениях.

При экспозиции на растворе меди в концентрации 25 мкМ содержание хлорофиллов и каротиноидов понизилось на 14-17% у *B. alba*, на 20-23% у *B. juncea* и 25-28% у *B. nigrа* по сравнению с контрольными показателями. При концентрации 100 мкМ наблюдалось уменьшение содержания хл *a*, хл *b* и каротиноидов на 20-22% у *B. alba*, на 28-34% у *B. juncea* и 38-41% у *B. nigrа* по сравнению с контрольными показателями.

Содержание каротиноидов и ксантофилла также при повышении концентрации  $\text{CuSO}_4$  уменьшалось у растений каждого вида. Интересно, что уменьшение количества пигментов менее всего происходило у растений *B. alba*, а растения двух других видов ведут себя примерно одинаково.

### Влияние меди на накопление МДА

Повышенное содержание в среде ионов меди вызывает перекисное окисление липидов мембран, об интенсивности которого может свидетельствовать накопление в тканях малонового диальдегида (МДА).



**Рис.6.** Влияние повышенных концентраций  $\text{CuSO}_4$  на аккумуляцию МДА.

Содержание МДА в тканях контрольных растений принято за единицу.

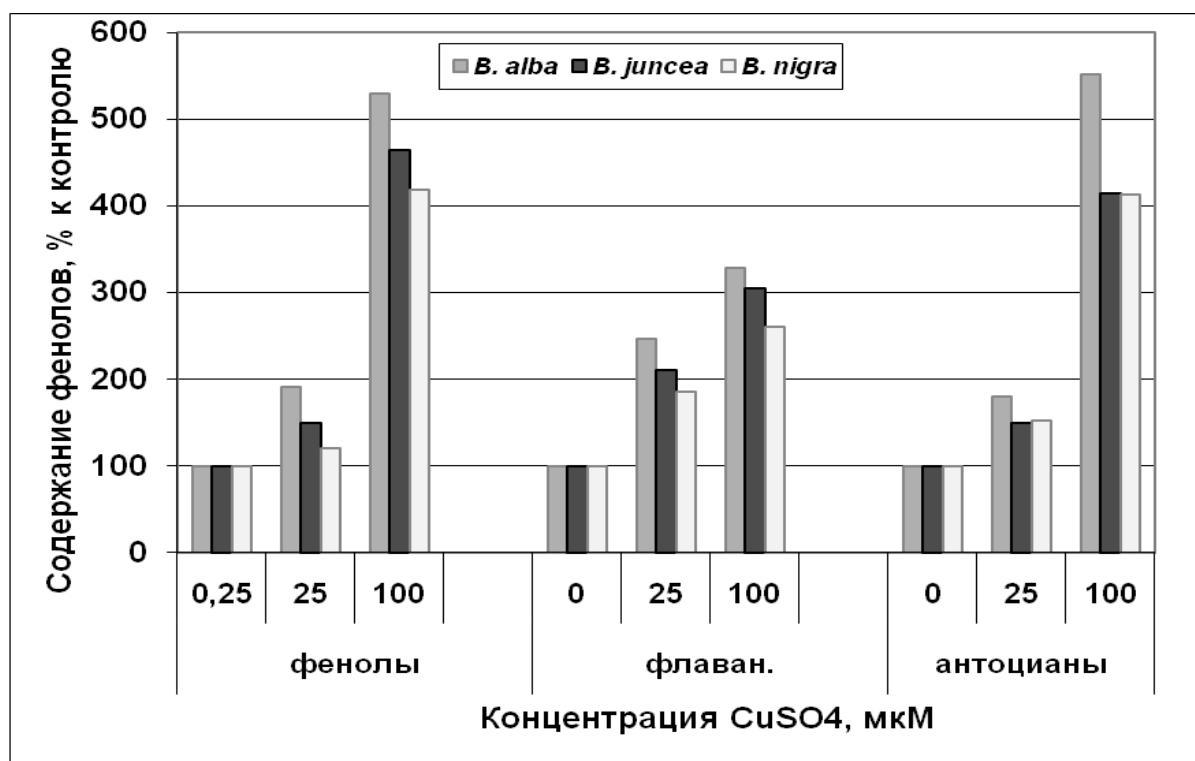
При росте растений на стандартной среде содержание МДА в тканях растений всех видов было равно. Повышение содержания  $\text{CuSO}_4$  в среде вызывало значительное увеличение накопления МДА у растений всех видов. Однако аккумуляция МДА в тканях *B. alba* происходила с меньшей интенсивностью, чем в тканях двух других видов растений (рис. 6).

### Влияние меди на содержание фенолов, флавоноидов и антоцианов

Аккумуляция МДА (рис.6) свидетельствует о том, что растения всех трех видов Brassica, подвергнутые действию избытка  $\text{CuSO}_4$ , испытывают окислительный стресс, на который растения отвечают, как правило, образованием антиоксидантных соединений, к которым относятся антиоксидантные ферменты, а также неферментные

соединения, такие как растворимые фенолы, флаваноиды и антоцианы, накопление которых было изучено.

Результаты, показывают, что содержание всех соединений у контрольных растений всех видов было примерно равно. При повышении концентрации  $\text{CuSO}_4$  в среде их количество резко возрастало, причем у растений *B. alba* увеличение было несколько выше. Растения *B. alba* реагировали на действие меди увеличением содержания общих фенолов в 1.7 при 25 мкМ  $\text{CuSO}_4$  и в 2.4 раза при 100 мкМ  $\text{CuSO}_4$ , а флаваноидов в 1.3- при 25 мкМ  $\text{CuSO}_4$  и в 1.6 раза при 100 мкМ  $\text{CuSO}_4$ . В то же время у *Brassica juncea* и *Brassica nigra* содержание общих фенолов увеличивалось в 1.3 и в 1.8 раза при 25 мкМ  $\text{CuSO}_4$  и 100 мкМ  $\text{CuSO}_4$  соответственно, а флаваноидов в 1.1-1.3 раза при 25 мкМ  $\text{CuSO}_4$  и 100 мкМ  $\text{CuSO}_4$  соответственно (Рис.7).



**Рис.7.** Влияние повышенных концентраций  $\text{CuSO}_4$  на содержание в тканях растений фенольных соединений

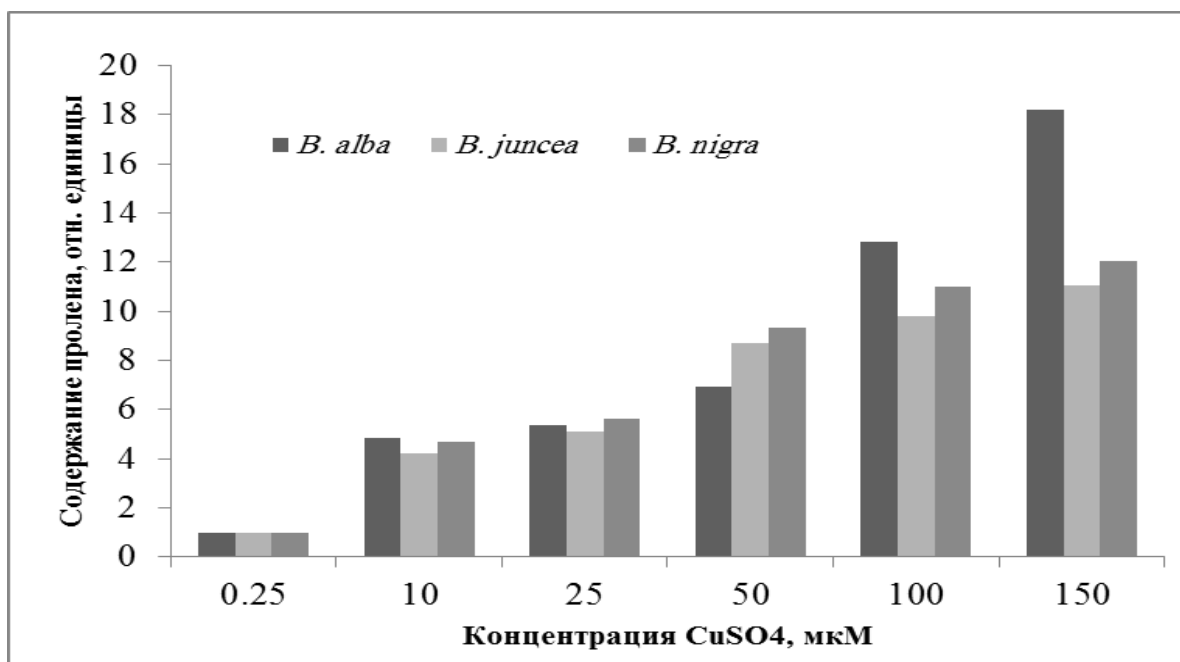
За 100% принято содержание пигментов в контрольных растениях

### **Влияние меди на содержание свободного пролина**

При исследовании возможных причин различий в устойчивости к избыточным концентрациям меди между растениями видов *Brassica* было проведено также

изучение влияния стрессорного фактора на содержание пролина в связи с его известной функцией в качестве химического шаперона и антиоксиданта.

Было обнаружено, что уровень пролина в листьях растений изученных видов довольно значительно различался. У растений *B. juncea* и *B. nigra* контрольного варианта концентрация пролина была близкой – 0.65-0.67 мкмоль/г сырой массы листьев, но у *B. alba* он составлял 0.92 мкмоль/г сырой массы, что на 40% выше значений для *B. juncea* и *B. nigra*.



**Рис.8.** Содержание пролина в листьях растений 3-х видов Brassica

Содержание пролина в листьях контрольных растений принято за единицу.

При всех вариантах стрессорного воздействия избытка меди концентрация пролина в листьях растений *B. alba* значительно - в 1.5-2.8 раз - превосходила соответствующие показатели у двух других видов. Максимальное накопление пролина - до 27.99 мкмоль/г сырой массы листьев было обнаружено в листьях растений *B. alba*, росших при 150 мкМ CuSO<sub>4</sub> (Рис.8).

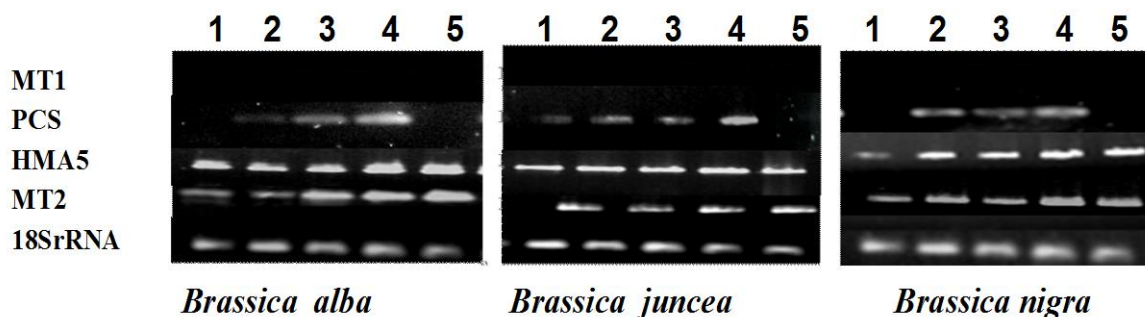
Эти результаты свидетельствуют о существенной роли пролина в адаптации изучаемых растений к токсическому действию высоких концентраций CuSO<sub>4</sub> в питательной среде и его особое значение в повышенной устойчивости растений *B. alba*.

## Влияние ТМ на экспрессию ряда генов, участвующих в транспорте и хелатировании металлов

Повышенная устойчивость растений *B. alba* к токсическому действию меди по сравнению с растениями *B. juncea* и *B. nigra*, кроме увеличения синтеза низкомолекулярных органических соединений с антиоксидантными свойствами – фенольных соединений и увеличения аккумуляции пролина, могла быть вызвана изменением экспрессии генов, вовлеченных в хелатирование ТМ или в регуляцию их внутриклеточного гомеостатирования.

Для проверки этого предположения изучали действие повышенных концентраций  $\text{CuSO}_4$  на экспрессию двух генов, кодирующих металлотионеины (*MT1*, *MT2*), гена фермента фитохелатинсинтазы (*PCS*), обеспечивающего синтез фитохелатинов, а также гена мембранного транспортера меди (*HMA5*).

С помощью метода ОТ-ПЦР оценивали активность экспрессии этих генов на уровне тотального содержания индивидуальных транскриптов через 5 и 10 сут. выращивания растений в водной культуре с повышенным содержанием  $\text{CuSO}_4$ . В качестве контроля была выбрана активность данных генов у растений, выращенных на стандартной среде. Пример активности генов *MT1*, *HMA5*, *PCS*, *MT2* и *18SrRNA* представлен на рисунке 9. В качестве внутреннего контроля использовали праймеры гена рибосомальной РНК.



**Рис.9.** Влияние избытка  $\text{CuSO}_4$  на транскрипцию генов *MT1*, *PCS*, *HMA5*, *MT2* в листьях растений 3-х видов *Brassica*

1 – контрольный вариант, 10 сут; 2 – 25 мкМ  $\text{CuSO}_4$ , 5 сут.; 3 - 100 мкМ  $\text{CuSO}_4$ , 5 сут.; 4 - 25 мкМ  $\text{CuSO}_4$ ; 10 сут.; 5 - 100 мкМ  $\text{CuSO}_4$ ; 10 сут.

*HMA5* - ген мембранного транспортера меди; *PCS* – ген фитохелатинсинтазы; *MT1* и *MT2* – гены металлотионеинов; *18SRNA* – ген рибосомальной РНК



Наблюдалась экспрессия всех исследуемых генов листьях растений изучаемых видов *Brassica* за исключением гена металлотионеина *MT1*, что соответствует данным о его преимущественной активности в корневой системе растений. Экспрессия другого гена металлотионеина *MT2* наблюдалась у всех видов растений при всех испытанных концентрациях. Особенно интенсивно экспрессировался этот ген в листьях растений *Brassica alba* при высокой концентрации  $\text{CuSO}_4$  (100 мкМ) и (или) длительном воздействии (10 суток) (варианты 3, 4 и 5). Ген фитохелатинсинтазы *PCS* является представителем другой группы хелаторов – фитохелатинов. Экспрессия этого гена наблюдалась преимущественно при низкой концентрации  $\text{CuSO}_4$  и (или) коротком времени воздействия (как бы в противофазе *MT2*). Постоянную активность проявлял ген мембранного транспортера *HMA5*, при этом его экспрессия заметно усиливалась при более продолжительном воздействии  $\text{CuSO}_4$  у *Brassica alba* (варианты 4 и 5).

Полученные результаты показали, что у растений всех 3-х видов различия в экспрессии исследованных генов невелики. В то же время, отчетливо проявляемая активность при избытке  $\text{CuSO}_4$  в среде подтверждает их участие в защитных реакциях исследованных растений. Это касается как хелатирования ионов меди при участии фитохелатинсинтазы (ген *PCS*) и металлотионеинов (ген *MT2*), так и транспортера (ген *HMA5*), осуществляющего перенос избытка меди из клетки во внеклеточное пространство (апопласт). Все это защищает растения от токсического действия повышенного содержания  $\text{CuSO}_4$  в среде. Более детальное изучение изменений уровня мРНК этих генов и кодируемых ими белков позволит в будущем дать более надежную информацию для растений 3-х исследованных нами видов *Brassica*.

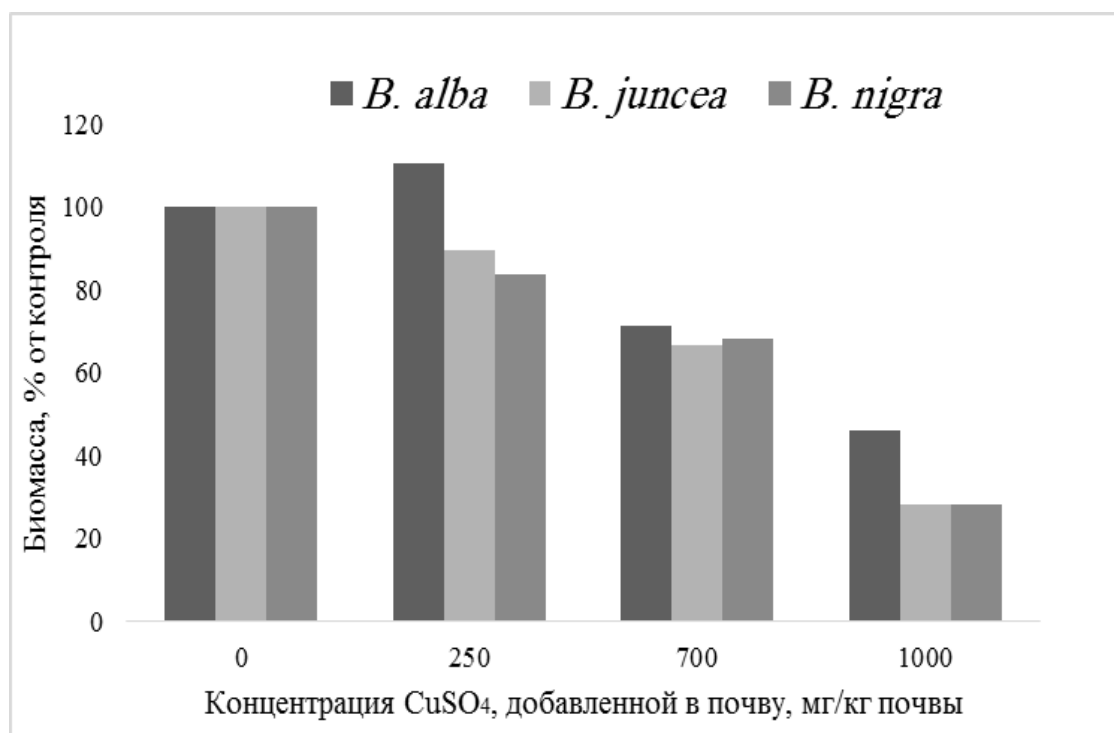
### **Изучение действия повышенных концентраций $\text{CuSO}_4$ на растения, растущие в почве**

При проведении опытов по воздействию избытка меди на растущие в почве растения, семена каждого вида растений проращивали в чашках Петри на воде и высаживали в сосуды с 5 кг смеси, состоящей из 6.67% песка, 33.33 % торфа и 60 % почвы. В каждом сосуде имелось по 3-5 растений. На 3ий день роста проростков в сосуды вносили растворенный в воде  $\text{CuSO}_4$  из расчета 250, 700 или

1000 мг  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  на 1 кг почвы, путем равномерного полива по всей поверхности сосуда. На 45 день опыта растения срезали и проводили изучение различных физиологических и биохимических параметров в надземной части растений.

### Влияние $\text{CuSO}_4$ на накопление биомассы

Увеличение содержания избыточного  $\text{CuSO}_4$  в почве вызывало ингибирование роста растений всех трех видов. Это видно по уменьшению накопления биомассы с увеличением содержания меди в почве. Особенно хорошо это видно при пересчете на проценты, если принимать за 100% биомассу растений, росших в стандартных условиях (Рис.10). Видно, что при добавлении  $\text{CuSO}_4$  в количестве 700 мг/кг почвы биомасса растений всех видов различается незначительно, но при 250 мг/кг растения *B. alba* накапливали биомассы в 1,4-1,6 раз больше, чем 2 других вида растений, а при самой высокой, испытанной нами концентрации  $\text{CuSO}_4$  (1000 мг  $\text{CuSO}_4$  на 1 кг почвы), растения *B. alba* накапливали биомассы, примерно, на 40% больше, чем 2 других вида растений.



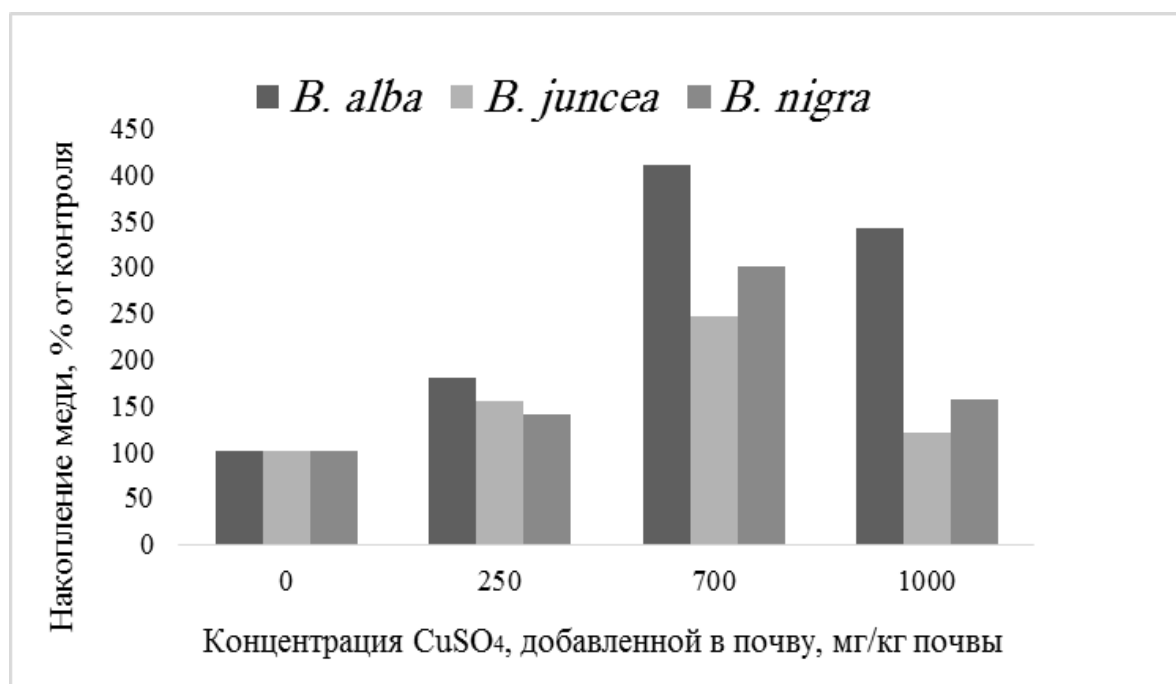
**Рис.10.** Влияние повышенных концентраций  $\text{CuSO}_4$  на накопление биомассы у растений 3-х видов Brassica, растущих в почве.

За 100% принимали биомассу растений, росших в почве без добавления  $\text{CuSO}_4$

### Влияние повышенных концентраций $\text{CuSO}_4$ на накопление меди у растений 3-х видов *Brassica*, растущих в почве

Добавление в почву 250 мг/кг почвы  $\text{CuSO}_4$  вызвало увеличение накопления металла, более значительный избыток меди (700 мг/кг) способствовал усилению ее накопления в растениях, но внесение максимального количества меди в почву (1000 мг  $\text{CuSO}_4$ /кг почвы) снизило ее содержание в биомассе растений (Рис.11).

Максимальное содержание меди составило 513,6 мг  $\text{CuSO}_4$  на растение у *Brassica alba* при 700 мг/кг  $\text{CuSO}_4$  в почве, что выше данных для растений 2-х других видов в 2,3 раза. Разница между видами еще более усилилась при самом высоком уровне меди в почве (1000 мг  $\text{CuSO}_4$ /кг почвы), превзойдя содержание меди в растениях других видов в - 3,7 -3,8 раза (табл.14). Однако, как видно из рисунка 12, при сравнении с контрольными вариантами для каждого вида эта разница сглаживалась. Так, при 700 мг/кг  $\text{CuSO}_4$  в почве накопление меди у *B. alba* возрастало на 342%, тогда как у *B. juncea* на 121%, а у *B. nigra* только на 157%.



**Рис.11.** Влияние повышенных концентраций  $\text{CuSO}_4$  на накопление меди у растений 3-х видов *Brassica*, растущих в почве.

За 100% принимали содержание металла у растений, росших в почве без добавления  $\text{CuSO}_4$

## Влияние избытка меди в почве на содержание пигментов

С увеличением концентрации  $\text{CuSO}_4$  в почве общее содержание пигментов уменьшалось у всех исследованных видов растений (табл. 2). Сумма фотосинтетических пигментов снижалась при самой большой исследованной концентрации  $\text{CuSO}_4$  примерно в 2 раза, оставаясь у *B. alba* на несколько более высоком уровне (примерно на 20%). Более значительная разница наблюдалась в соотношении хлорофиллов (a/b), которое является у *B. alba* меньшим, чем у *B. nigra* и *B. juncea*, свидетельствуя о большей устойчивости в листьях этого вида хлорофилла b. Содержание двух других исследованных пигментов – каротина и ксантофилла уменьшалось с увеличением концентрации  $\text{CuSO}_4$  примерно одинаково у растений всех исследованных видов (табл.2).

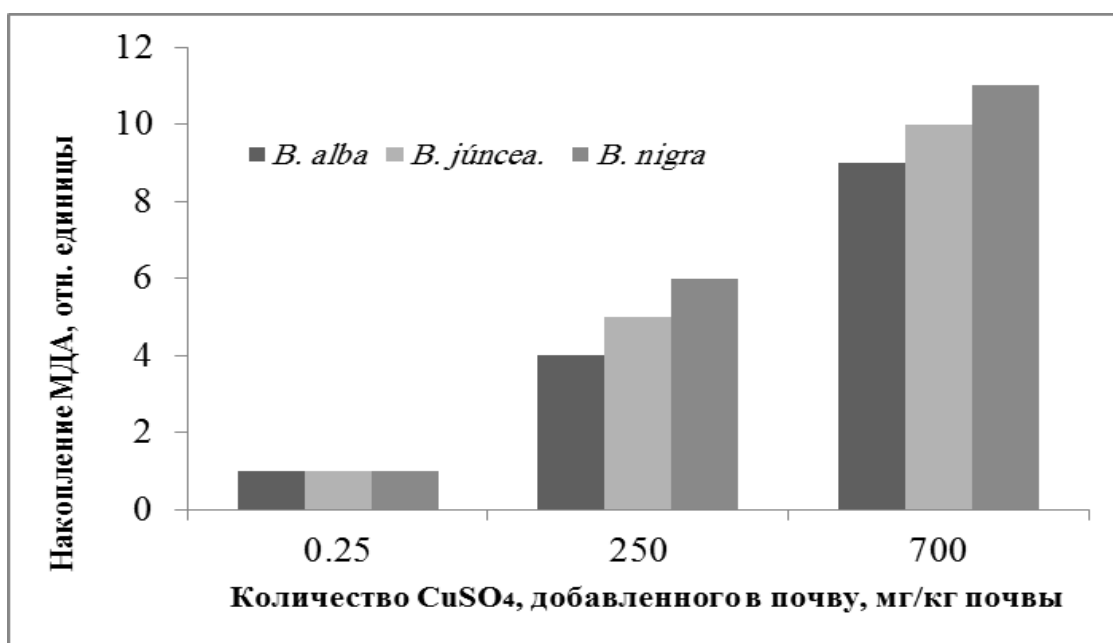
Таблица 2

## Влияние избытка $\text{CuSO}_4$ на содержание пигментов в листьях растений 3-х видов Brassica

| Количество добавленного $\text{CuSO}_4$ , мг/кг почвы | Количество пигментов (мг/г сыр.масс.) |       |       |       |       |       |
|---|---------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|   | <i>B. alba</i>                        |       |       |       |       |       |
|   | Хл a                                  | Хл b  | a+b   | a/b   | Кар   | Кс    |
| 0   | 1,04                                  | 0,54  | 1,58  | 1,91  | 0,43  | 0,46  |
| 250   | 0,97                                  | 0,44  | 1,41  | 2,21  | 0,33  | 0,44  |
| 700   | 0,51                                  | 0,22  | 0,73  | 2,33  | 0,13  | 0,27  |
|   | <i>B. juncea</i>                      |       |       |       |       |       |
|   | Хл a                                  | Хл b  | a+b   | a/b   | Кар   | Кс    |
| 0   | 1,06                                  | 0,52  | 1,58  | 2,06  | 0,43  | 0,45  |
| 250 мг  | 0,96                                  | 0,39  | 1,35  | 2,45  | 0,30  | 0,43  |
| 700 мг  | 0,47                                  | 0,18  | 0,65  | 2,65  | 0,11  | 0,23  |
|   | <i>B. nigra</i>                       |       |       |       |       |       |
|   | Хл a                                  | Хл b  | a+b   | a/b   | Кар   | Кс    |
| 0   | 1,026                                 | 0,535 | 1,561 | 1,916 | 0,428 | 0,451 |
| 250 мг  | 0,934                                 | 0,390 | 1,324 | 2,393 | 0,300 | 0,427 |
| 700 мг  | 0,434                                 | 0,172 | 0,606 | 2,521 | 0,106 | 0,226 |

### Влияние повышенных концентраций $\text{CuSO}_4$ на аккумуляцию МДА у растений 3-х видов *Brassica*, растущих в почве

Из данных, можно видеть, что с увеличением концентрации  $\text{CuSO}_4$  в почве происходило возрастание количества МДА в листьях растений всех 3-х видов, тогда как при росте в стандартных условиях оно было примерно одинаковым. Однако при росте на среде с избытком  $\text{CuSO}_4$  накопление МДА у растений *B. alba* было несколько ниже, чем у растений двух других видов. Особенно это хорошо заметно, если это увеличение представить в стандартных условиях принят за единицу к начальному уровню. На рис.12 видно, что менее всего повысилось содержание МДА у *B. alba* (8 раз от контроля), среднее значение было у растений *B. juncea* и, как и в других опытах, самое большое накопление МДА наблюдали для *B. nigra* (близко к 10 раз).



**Рис.12.** Накопление МДА в листьях растений 3-х видов *Brassica* в зависимости от добавления  $\text{CuSO}_4$

Количество МДА в листьях, находящихся в стандартных условиях принят за единицу.

### Влияние меди на содержание фенолов, флавоноидов и антоцианов

Из результатов, представленных в таблице 3, видно, что у растений, находящихся в стандартных условиях, содержание растворимых фенолов,

флаваноидов и антоцианов примерно равно у всех видов. При увеличении концентрации  $\text{CuSO}_4$  в почве происходит накопление всех этих соединений со значительным превышением их у растений *B. alba*. Содержание всех групп фенольных соединений у двух других видов приблизительно равно.

**Таблица 3.**

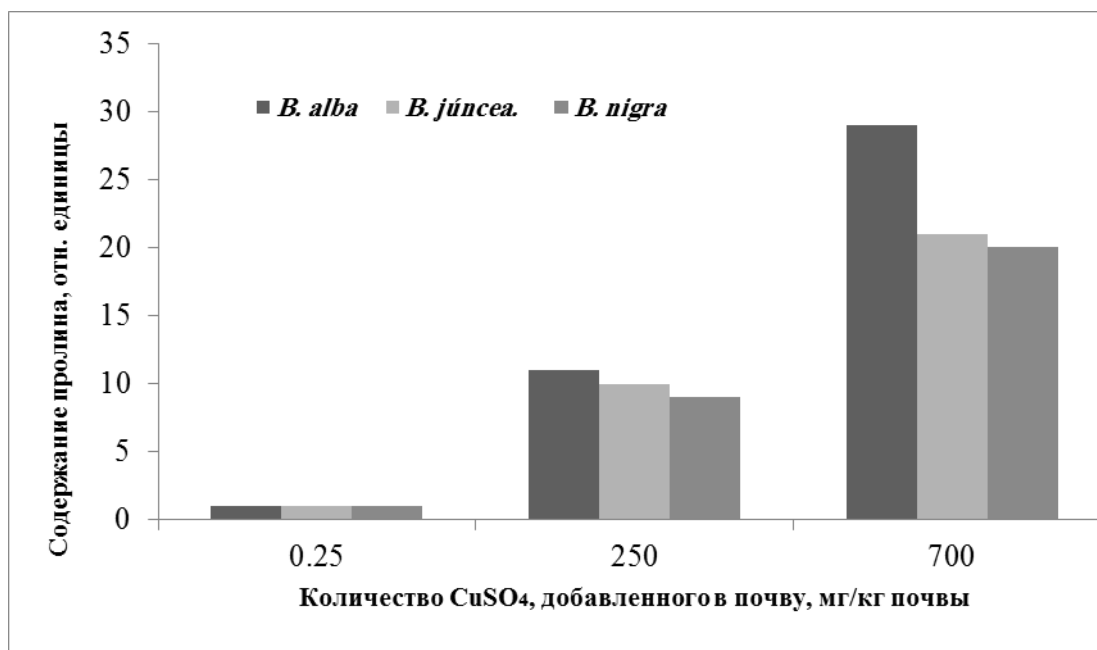
**Влияние избытка  $\text{CuSO}_4$  на накопление растворимых фенольных соединений в листьях растений 3-х видов *Brassica***

| Вид растения  | Содержание растворимых фенолов, мг/г сыр. биомассы            |            |            |
|---|---|------------|------------|
|   | Количество добавленного в почву $\text{CuSO}_4$ , мг/кг почвы |            |            |
|   | 0   | 250        | 700        |
| <b>Содержание растворимых фенолов, мг/г сыр. биомассы</b> |   |            |            |
| <i>B. alba</i>  | 7,74±0,01   | 27,12±0,28 | 38,81±0,38 |
| <i>B. juncea</i>  | 7,79±0,18   | 21,42±0,12 | 31,59±0,85 |
| <i>B. nigra</i>   | 7,93±0,2  | 19,81±0,39 | 30,59±0,11 |
| <b>Содержание флавоноидов, мг/г сыр. биомассы</b>         |   |            |            |
| <i>B. alba</i>  | 5,23±0,47   | 14,85±0,48 | 21,62±0,84 |
| <i>B. juncea</i>  | 5,35±0,71   | 11,52±0,47 | 16,99±0,24 |
| <i>B. nigra</i>   | 5,11±0,92   | 10,81±0,71 | 14,85±0,65 |
| <b>Содержание антоцианов, мг/г сыр. биомассы</b>          |   |            |            |
| <i>B. alba</i>  | 0,92±0,01   | 5,40±1,01  | 6,79±0,095 |
| <i>B. juncea</i>  | 0,82±0,045  | 4,33±0,45  | 4,99±0,11  |
| <i>B. nigra</i>   | 0,85±0,01   | 3,76±0,16  | 4,61±0,45  |

**Влияние повышенных концентраций  $\text{CuSO}_4$  на содержание свободного пролина у растений 3-х видов *Brassica*, растущих в почве**

Содержание пролина в растениях всех трех исследуемых видов, растущих в стандартных условиях, отличалось незначительно. Однако при внесении в почву избыточного количества меди происходило сильное накопление пролина в листьях растений, резко возрастающая при добавлении уже 250 мг  $\text{CuSO}_4$  на каждый кг почвы. При этом накопление пролина у растений *B. alba* было несколько выше, чем у двух других видов (на 70% выше, чем у *B. juncea* и на 200% выше, чем у *B. nigra*) (рис.13).

Наиболее значимые различия между растениями разных видов наблюдали при добавлении  $\text{CuSO}_4$  в количестве 700 мг/кг почвы. Наибольшее накопление пролина было, как и следовало ожидать из предыдущих результатов, у *B. alba*, где увеличение по сравнению с контролем было в 30 раз, тогда как у *B. juncea* и *B. nigra* было 20-ти кратным (рис.13).



**Рис.13.** Влияние повышенных концентраций  $\text{CuSO}_4$  на накопление пролина у растений 3-х видов Brassica, растущих в почве.

Количество пролина в листьях, находящихся в стандартных условиях принят за единицу.

### ВЫВОДЫ

1. Установлена довольно высокая устойчивость растений всех трех изученных видов р. *Brassica* – *B. alba*, *B. juncea* и *B. nigra* – к повышенному содержанию меди в среде, реализованная в способности растений завершить онтогенетический цикл (созревание семян) при содержании  $\text{CuSO}_4$  до 1000 мг/кг почвы.
2. Показано, что токсическое действие меди при ее повышенных концентрациях в среде проявлялось на растениях исследованных видов в снижении всхожести семян, торможении накопления биомассы как побега,

так в большей степени корня, снижении содержания фотосинтетических пигментов (хлорофиллов а и b, каротиноидов и ксантофиллов). По этим показателям растения *B. alba* обнаружили заметно большую устойчивость в сравнении с другими исследованными видами.

3. Установлено, что защита против токсического действия избыточного уровня меди у растений исследованных видов включала систему низкомолекулярных антиоксидантов - растворимых фенольных соединений, флавоноидов и антоцианов, а также свободный пролин. Повышение содержания этих соединений в ответ на действие избытка ионов меди достигало у растений *B. alba* 35, 16, 4 и 28 мкг/г сырой биомассы, превосходя от 1,5 до 3 раз те же показатели у растений других изученных видов. Более успешная защита у растений *B. alba* подтверждалась также меньшим уровнем перекисного окисления липидов (оценка по МДА).
4. При воздействии избытка меди установлено повышение экспрессии генов, участвующих в защите растений, обеспечивая возможность хелатирования ионов меди (гены *PCS* и *MT2*) и перенос ее из цитозоля в апопласт (*HMA5*), что наиболее заметно проявилось у растений *B. alba*.
5. В опытах на растениях исследованных видов р. *Brassica* в гидропонной культуре и в почвенных экспериментах показана пропорциональность накопления меди в органах растений ее содержанию в среде, что характерно для растений-индикаторов с преимущественной аккумуляцией меди в корнях по сравнению с побегом.
6. При выращивании на почве с высоким содержанием  $\text{CuSO}_4$  (250, 700 и 1000 мг/ кг почвы) растения *B. alba* накапливали в 2, 4 и 3 раза больше меди в единице сухой массы побега, соответственно, при значительно меньшем ингибировании роста (на 54 % против 72 %) в сравнении с другими изученными видами. В результате при внесении в почву 700 мг/кг  $\text{CuSO}_4$  общее ее содержание в растении *B. alba* составило 513,6 мкг/растение, тогда как для *B. juncea* 229,8, для *B. nigra* 219,8.



7. Полученные результаты характеризуют растения изученных видов, прежде всего, *B. alba*, как потенциально пригодные в целях фиторемедиации умеренно загрязненных медью территорий.

#### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. **Х. Х. Алобайди, Е. Б. Башмакова, В. П. Холодова, Вл.В Кузнецов (2010)** Устойчивость растений видов рода *Brassica* к повышенным концентрациям меди в питательной среде. Тезисы докладов Всероссийского симпозиума "Растение и стресс" Москва. С.35.
2. **Х. Х. Алобайди, Е. Б. Башмакова, В. П. Холодова (2011)** Сравнительный анализ устойчивости растений рода *Brassica* на начальном этапе онтогенеза к избытку меди // *Вестник Томского государственного университета. Биология.* № 4 (16). С. 197–201.
3. **М.М. Марей, Г.Н. Ралдугина, Х.Х. Алобайди (2012)** Сравнительный анализ устойчивости двух сортов ярового рапса к действию высоких концентраций  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  // *Вестник РУДН.* № 2. С. 62-68.