

ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА *HvCAHX2* В КОРНЯХ ПРОРОСТКОВ ЯЧМЕНЯ

Казнина Н.М., Титов А.Ф., Топчиева Л.В., Батова Ю.В., Лайдинен Г.Ф.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии
Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Россия
E-mail: kaznina@krc.karelia.ru*

Изоляция кадмия в вакуолях клеток является важным механизмом устойчивости растений к данному металлу. При этом установлено, что транспорт ионов кадмия из цитоплазмы в вакуоль может осуществляться с помощью белков-переносчиков, расположенных на тонопласте, в том числе белка-транспортера *CAHX2* (Calcium Exchanger 2). Увеличение экспрессии гена *CAHX2*, контролирующего синтез этого белка, в присутствии кадмия обнаружено у ряда видов растений, но его роль в механизмах металлоустойчивости до сих пор не установлена. Целью нашего исследования явилось изучение влияния кадмия на экспрессию гена *HvCAHX2* в корнях проростков ячменя разного возраста, а также на рост корней и содержание в них металла.

Семена ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Зазерский 85 проращивали в песке. По достижении растениями возраста 3-х (фаза прорастания семян) и 7-и суток (фаза всходов), их переносили в контейнеры с половинным раствором Кнопа (контроль). В опытных вариантах к питательному раствору добавляли 100 мкМ кадмия (в форме сульфата). Спустя 4 маясут в корнях растений измеряли уровень экспрессии гена *HvCAHX2* с помощью полимеразной цепной реакции, а также определяли вольтамперометрическим методом содержание металла. Устойчивость растений к кадмию оценивали методом корневого теста (I_1).

Установлено, что при действии кадмия в корнях растений ячменя резко повышается экспрессия гена *HvCAHX2*. Но, если у 3-дневных проростков уровень экспрессии гена возрастал в 8.5 раз (по сравнению с контролем), то у 7-дневных проростков — в 3 раза, несмотря на более высокое (в 1.3 раза) содержание в них металла. Обнаружено также, что кадмий оказывает сильное негативное влияние на рост корня 3-дневных проростков ($I_1=0.6$). В отличие от этого, у 7-дневных проростков заметного ингибирования роста корня не наблюдалось ($I_1=1$), что свидетельствует об их более высокой устойчивости к металлу.

Таким образом, под влиянием кадмия в корнях ячменя резко увеличивается экспрессия гена *HvCAHX2*, причем в большей степени у 3-дневных проростков. Однако при данной концентрации металла (100 мкМ) усиление экспрессии изученного нами гена не приводит к повышению содержания кадмия в корнях и увеличению металлоустойчивости растений.

ЭФФЕКТЫ NaCl, Na₂SO₄ И МАННИТОЛА НА УТИЛИЗАЦИЮ ЗАПАСНЫХ РЕЗЕРВОВ И ПРЕОБРАЗОВАНИЕ СОДЕРЖАЩИХ ИХ КОМПАРТМЕНТОВ В СЕМЯДОЛЯХ ПРОРОСТКОВ *Kochia scoparia* L.

Баранова Е. Н.¹, Гулевич А. А.^{1,2}, Козлов Н.Н.²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии, Тимирязевская 42, Москва 12755, тел. (495)9771636

²Всероссийский научно-исследовательский институт кормов им. В.Р. Вильямса Россельхозакадемии, Лобня, Луговая, Московская область 141055, тел. (495) 577-73-37

E-mail: greenpro2007@rambler.ru (Барановой Е.Н.)

Методом трансмиссионной электронной микроскопии изучали влияние NaCl, Na₂SO₄ и маннита на процессы утилизации запасного белка в клетках мезофилла семядолей и корневой меристемы при прорастании семян *Kochia scoparia* в растворах, выровненных по осмотическому давлению.

Показано изменение количества крахмальных зерен и замедление развития хлоропластов, в зависимости от осмотического эффекта солевого воздействия. Низкие концентрации Na₂SO₄ не оказывали влияния на развитие фотосинтетического аппарата и утилизацию крахмальных включений, маннитол вызывал сохранение значительных запасов крахмала, не препятствуя развитию хлоропласта, NaCl не мешал формированию внутренней инфраструктуры фотосинтезирующей пластиды. При повышении изоосмотической концентрации до 607,8 кПа NaCl также не влиял на преобразование амилопластов в пластиды и утилизацию крахмала, Na₂SO₄ частично ингибировал и развитие хлоропластов, и утилизацию крахмала, а маннитол вызывал замедление преобразования амилопластов с ингибированием утилизации крахмальных зерен.

Выявлены изменения в преобразовании запасящих вакуолей в центральную вакуоль, а также изменения в количестве и форме остатков белковых тел внутри вакуолей в зависимости от осмотического эффекта солевого воздействия. При низких концентрациях, соответствующих давлению в 202,6 кПа, Na₂SO₄ не влиял на преобразование запасящих вакуолей в центральную вакуоль и на утилизацию белка; с увеличением концентрации, и Na₂SO₄, и маннит вызывали сохранение значительных запасов белка, причем маннит не нарушал процессов преобразования вакуоли. NaCl не оказывал столь сильного эффекта на конверсию запасящих вакуолей в центральную вакуоль и утилизацию белка в клетках семядолей.

Полученные результаты показывают различную чувствительность к стрессовым факторам засоления важнейших процессов метаболизма на примере утилизации крахмальных зерен и формирования фотосинтетических субкомпартов хлоропластов в мезофилле семядолей, мобилизации запасного белка и преобразования вакуолярного компарта и мобилизации липидов из олеосом при прорастании семян.

Работа финансировалась Программой РАСХН 04.03.03.01.

ПОГЛОЩЕНИЕ КАДМИЯ И ЕГО РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПО ОРГАНАМ ЯЧМЕНЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА РАСТЕНИЙ

Батова Ю.В., Лайдинен Г.Ф., Казнина Н.М., Титов А.Ф.

Учреждение Российской академии наук Институт биологии Карельского научного центра РАН; Пушкинская 11, 185910 Петрозаводск, тел.:(814)762706, факс:(814)769810

E-mail: batova@krc.karelia.ru (Батовой Ю.В.)

В условиях лабораторного опыта изучали поглощение кадмия и его распределение по органам растений ярового ячменя (с. Зазерский 85) в зависимости от концентрации металла в корнеобитаемой зоне и возраста растений. Для проведения эксперимента растения выращивали в песке до следующих фаз развития: начало 2-го и начало 4-го листа, затем проростки переносили на питательный раствор Кнопа половинной концентрации с добавлением кадмия (50 или 100 мкМ) в форме сульфата. На 4-е сутки после этого определяли содержание металла в корнях, стеблях (укороченный стебель и влагалища листьев) и листовых пластинках методом инверсионной вольтамперометрии на полярографе АВС-1.1 (Вольта, Россия).

Проведенные эксперименты показали что, с увеличением концентрации кадмия в растворе его содержание в корнях растений существенно возрастает. Установлено также, что независимо от концентрации металла в растворе его содержание в корнях более взрослых растений значительно выше, чем у более молодых. Так, после экспозиции на растворе кадмия с концентрацией 50 мкМ содержание металла в корнях растений, находящихся в фазе начало 2-го листа, составило 11.2 мкг/г сырой массы, а у растений в фазе начало 4-го листа – 17.6 мкг/г сырой массы, а после экспозиции на растворе с концентрацией металла 100 мкМ – 16.2 и 42.8 мкг/г сырой массы, соответственно.

В отличие от корней, среднее содержание металла в надземных органах растений практически не зависело от его концентрации в зоне корней и возраста растений и варьировало от 3.2 до 4.1 мкг/г (в зависимости от варианта опыта).

Анализ распределения кадмия по органам растений показал, что максимальное количество металла накапливают корни (77.7–91.7% от общего содержания в растении), значительно меньше аккумулируют стебли (6.9–18.3%) и листовые пластинки (1.4–7.3%). Выявлено, что возраст растений оказывает заметное влияние на распределение металла. В частности, при экспозиции на растворе с концентрацией кадмия 100 мкМ с увеличением возраста проростков доля металла, аккумулированного в корнях, повышалась с 84.1 до 91.7%, тогда как в стеблях и листовых пластинках, наоборот, снижалась с 8.9 до 6.9% и с 7.0 до 1.4%, соответственно.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что с увеличением возраста растений ячменя возрастает интенсивность поглощения кадмия из раствора и одновременно усиливается барьерная функция корней. Отмеченные возрастные различия проявляются тем сильнее, чем выше концентрация металла в корнеобитаемой зоне.

СПЕЦИФИКА ДЕЙСТВИЯ ОБРАБОТОК АБК И 6-БАП НА ГОРМОНАЛЬНУЮ СИСТЕМУ, ВОДНЫЙ ОБМЕН И ТЕМПЫ РОСТА РАСТЕНИЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ ВЛАГООБЕСПЕЧЕННОСТИ

Бахтенко Е.Ю.

ГОУ ВПО Вологодский государственный педагогический университет,
ул.С. Орлова, 6, 160035, Вологда, тел/факс. (8172)769196

E-mail: bakhtenko@yandex.ru

Исследовалось действие АБК и 6-БАП при различной влажности почвы (70, 40, 120% ПВ) на динамику фитогормонов, показатели водного обмена, темпы роста, продуктивность. Объектами исследования являлись *Avena sativa* L. (с. Борпус) и *Triticum aestivum* L. (с. Русо). Растения выращивали методом почвенных культур в условиях вегетационного эксперимента. Опрыскивание раствором АБК и 6-БАП в концентрации 10^{-5} М проводили на 2-е сутки затопления или установления 30% ПВ. Контрольные растения обрабатывали водой. Определение содержания свободных форм гормонов (АБК, ИУК, зеатин и зеатин-рибозид) проводили иммуноферментным методом.

Установлено, что при 60-80% ПВ внесение АБК и 6-БАП оказывает различное действие: АБК снижает содержание ИУК, возрастание цитокининов на 1-2-е сутки после обработки является кратковременным. Обработка 6-БАП увеличивает уровень ауксинов и цитокининов. Возрастание АБК наблюдается только в течение 1-4 суток после внесения. При затоплении АБК и 6-БАП проявляют одинаковый эффект на уровень ауксинов и цитокининов, увеличивая их содержание. Опрыскивание АБК и 6-БАП приводит к возрастанию в побегах абсцизовой кислоты, снижение концентрации гормона наблюдается только через 6 суток после обработки. Следствием изменения концентрации отдельных фитогормонов после внесения веществ являются отклонения в соотношении. Обработка 6-БАП увеличивает отношение ИУК+З-ЗР/ИУК как при оптимальных условиях, так и при затоплении. Внесение АБК при 60-80% НВ снижает соотношение гормонов, в условиях затопления и засухи оказывает противоположное действие. Экзогенные вещества оказали противоположное действие на расходование воды: АБК снизила, а 6-БАП увеличил интенсивность транспирации вне зависимости от фона влажности. Обработка АБК и 6-БАП при засухе и затоплении привела к нормализации водного обмена, что проявилось в возрастании оводненности и снижении водного дефицита. Обработки АБК и 6-БАП на оптимальном фоне влажности почвы оказали противоположное влияние на рост и продуктивность пшеницы и овса. При внесении АБК и 6-БАП на фоне затопления антагонизма не наблюдалось. Растения, обработанные 6-БАП и АБК, отличались постепенным увеличением массы. Однако внесение 6-БАП оказало большее стимулирующее влияние по сравнению с АБК. Таким образом, обработка АБК при затоплении оказывает иное влияние по сравнению с внесением на оптимальном фоне, проявляя стимулирующий ростовой эффект. В то же время действие 6-БАП при разных фонах влагообеспеченности не отличается по направленности, однако, степень возрастания темпов роста выше при переувлажнении. Большую отзывчивость на обработку при затоплении проявляет пшеница как менее устойчивая культура по сравнению с овсом. Можно полагать, что обработка АБК и 6-БАП при переувлажнении и АБК при засухе снижает отрицательное влияние стресс-факторов, способствует возрастанию темпов роста в стрессовой ситуации и повышению устойчивости.

по сравнению с контролем, что, как можно предположить, связано со способностью ризобияльной инфекции изменять обмен веществ растения-хозяина с целью создания благоприятных условий для установления симбиотических взаимоотношений (Глянько и др., 2009).

Инокуляция проростков гороха *Escherichia coli* (штамм XL-1Blue) увеличивала активность данного ферментного комплекса в микросомальной клеточной фракции корней на 48% через 24 ч ($P \geq 0,99$) и на 64% через 48 ч ($P \geq 0,95$) по сравнению с контролем. Очевидно, что взаимодействие *Escherichia coli* с корнями бобового растения инициирует защитные механизмы, приводящие к активации НАДФН-оксидазного ферментного комплекса растения, что, в свою очередь, может коррелировать с увеличением АФК, приводя к окислительному взрыву.

При одновременной обработке корней проростков гороха *Escherichia coli* и *Rhizobium leguminosarum*, ризобияльная инфекция не только не снимала стимулирующий эффект условно-патогенной бактерии на НАДФН-оксидазную активность, но еще больше усиливала действие данного неблагоприятного фактора, при этом активность фермента увеличивалась более чем в два раза ($P \geq 0,99$) по сравнению с контролем через 24 ч после обработки и на 91% ($P \geq 0,95$) через 48 ч.

В данном случае наблюдался синергический эффект двух биотических факторов на активность фермента. Открытым в этой проблеме остается вопрос о внутриклеточной передаче сигналов от мембранносвязанного НАДФН-оксидазного ферментного комплекса на генетический аппарат растительной клетки. В связи с этим, дальнейшие исследования могут быть направлены на более детальное изучение установленных физиологических закономерностей.

ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА PCS И СОДЕРЖАНИЕ НЕПРОТЕИНОВЫХ ТИОЛОВ В КОРНЯХ И ЛИСТЯХ ЯЧМЕНЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА РАСТЕНИЙ

Казнина Н.М., Титов А.Ф., Топчиева Л.В., Лайдинен Г.Ф., Батова Ю.В.

Учреждение Российской академии наук Институт биологии Карельского научного центра РАН; ул. Пушкинская, 11, 185910 Петрозаводск, тел.:(8142)762706, факс:(8142)769810

E-mail: kaznina@krc.karelia.ru (Казниной Н.М.)

В условиях лабораторного опыта изучали влияние кадмия на экспрессию гена *PCS*, кодирующего фитохелатинсинтазу, и

содержание непротеиновых тиолов у растений ячменя (сорт Зазерский 85) разного возраста. Проростки выращивали в песчаной культуре при температуре воздуха 20-22°C, освещенности 10 клк, фотопериоде 14 ч. На 3-и и 7-е сут после появления шильца соответственно 1-го или 2-го листа, растения переносили на раствор Кнопа половинной концентрации (контроль). В опытных вариантах к питательному раствору добавляли 100 мкМ кадмия в форме сульфата. Через 4 сут определяли уровень экспрессии гена *HbPCS*, содержание восстановленного глутатиона (GSH) и фитохелатинов (ФХ) в корнях и листьях, сформированных за это время. Помимо этого был проведен анализ содержания кадмия в органах растений. Уровень экспрессии гена оценивали методом ПЦР в режиме реального времени. Количество GSH и ФХ определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, а содержание кадмия – вольтамперометрическим методом.

Обнаружено, что в присутствии кадмия в корнях ячменя во всех вариантах опыта экспрессия гена *HbPCS*, а также общее содержание ФХ существенно возрастают. Вместе с тем уровень экспрессии гена в корне 3-дневных проростков, несмотря на меньшее количество в нем металла, оказался почти в 2 раза, а количество ФХ – в 1.5 раза выше, чем у 7-дневных. При этом содержание GSH в корне более молодых растений заметно снижалось, тогда как у более взрослых, наоборот, повышалось.

Влияние кадмия на изученные показатели в листьях было выражено в гораздо меньшей степени, чем в корнях, и зависимость их от возраста растений проявлялась менее отчетливо. В частности, в листьях не обнаружено достоверного увеличения экспрессии гена *HbPCS*. Содержание ФХ повышалось незначительно. В несколько большей степени изменялось количество GSH, причем, также как и в корнях, у 3-дневных проростков оно уменьшалось, а у 7-дневных увеличивалось.

В целом, результаты исследований показали, что в присутствии кадмия в корнях 3-дневных растений ячменя увеличивается экспрессия гена *HbPCS*, повышается содержание ФХ, при этом уровень GSH снижается. В отличие от этого, в корнях 7-дневных растений при меньших значениях уровня экспрессии гена и ФХ, наблюдается повышение количества GSH. В листьях изменения изученных показателей, а также влияние на них возрастных различий оказалось незначительным.