

каллусообразования. В результате сравнительного изучения каллусогенеза испытуемых видов трав на питательных средах различного состава установлено, что наибольшей отзывчивостью обладали Житняк пустынный, Ломкоколосник ситниковый, Тимофеевка луговая, а питательная среда Мурасиге и Скуга являлась более благоприятной для культивирования всех испытуемых генотипов.

#### Литература

1 Ларионова Н.Л. Устойчивость нетрадиционных кормовых растений к углеводородному загрязнению почвы и эффект фиторемедиации // Сб. науч. тр. Казанского государственного университета «Вопросы совр. экологии и физиол. раст». Казань.- 2001. – С.45-47.

2 Михайловская Н.А. Влияние diaзотрофной бактериализации на аккумуляцию радиоцезия в многолетних злаковых травах // Проблемы питания растений и использования удобрений в современных условиях.- 2000. - №1. - С. 328-332.

3 Подоляк А.Г., Тимофеев С.Ф., Персикова Т.Ф. Переход цезия-137 и стронция-90 в травостой низинных лугов на торфяно-болотных почвах //Агрохимия, 2004.- №11. - С. 63-70.

4 Павлов В.Ю. Особенности роста и развития многолетних злаковых трав и возможное применение при фитомелиорации деградированных городских земель // Мат. меж. науч. конф. (Костяковские чтения) "Научные технологии в мелиорации". Москва: ВНИИГМ.- 2005. - С. 49-52.

5 Кравцов В.В., Кравцов В.А. Сорта многолетних злаковых и бобовых трав для восстановления кормового потенциала сенокосов и пастбищ. // Кормопроизводство. - 2002.- №4. - С. 10-11.

#### Тұжырым

Бұл жұмыста жем шөптердің кейбір түрлерінің культурасындағы жетілген ұрықтырдың каллусогенез индукциясының нәтижелері келтірілді. Каллус түзілуі процесіне сезімтал төрт генотип сұрыптан алынды және оларды өсіруіне оптимальді әдістер дайындалды.

#### Summary

This paper presents the results of the study of callus induction in the culture of mature embryos of some species of grassland plants. According to the degree of responsiveness to the process of callus formation four genotypes are selected and their optimum techniques of cultivating are developed.

УДК 633.1:581.1

Атабаева С.Д.

### ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ГИПЕРУСТОЙЧИВОСТИ И ГИПЕРАККУМУЛЯЦИИ РАСТЕНИЯМИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

(Казахский национальный университет имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан)

В статье представлен обзор современной литературы о механизмах гиперустойчивости растений и гипераккумуляции тяжелых металлов

Понятие «фиторемедиация» объединяет большое количество методов и технологий, в частности, фитоэкстракцию, фитоиммобилизацию, фитостабилизацию, фитоволитализацию [1]. После применения фитотехнологий почвы не теряют своих естественных свойств, следовательно, эти технологии являются почвосохранивающими, экологически безопасными и экономически выгодными.

Для фитоэкстракции тяжелых металлов из почвы наиболее выгодным является использование растений-гипераккумуляторов тяжелых металлов. Термин "гипераккумулятор" относится к видам растений, которые аккумулируют в 10-100 раз больше металлов, чем обычные растения. В настоящее время общепринято определение R.Brooks (1998) [2], согласно которому гипераккумуляторами тяжелых металлов считаются те растения, которые накапливают в надземных органах цинк (Zn) > 10 000, свинец (Pb) > 1000, кадмий (Cd) > 100 мкг/г. Растения-неаккумуляторы ТМ должны накапливать на незагрязненной почве Zn, Pb и Cd < 100, < 10 и < 1 мкг/г, соответственно; на загрязненной почве - Zn < 1000, Pb < 100 и Cd < 10 мкг/г, соответственно.

Растения-гипераккумуляторы являются эндемичными для тех почв, которые загрязнены тяжелыми металлами и не конкурируют с другими видами на незагрязненных почвах. Аккумуляция металлов растениями в нетоксической форме является одной из стратегий, используемых растениями для выживания в условиях сильного загрязнения среды.

Из литературных данных известны растения-гипераккумуляторы тяжелых металлов: *Ambrosia artemisiifolia* L. (амброзия полыннолистная), *Thlaspi rotundifolium* L., *Thlaspi caerulescens* L. (ярутка), поглощающие в значительном количестве Zn, Cd, Pb. К гипераккумуляторам Ni относятся *Alyssum* L. (бурачок) и *Arabidopsis* L. (резушка). Последний считается удобным объектом для исследований, так как имеет короткий жизненный цикл и малое количество хромосом [3].

Выявление механизмов гиперустойчивости и гипераккумуляции тяжелых металлов растениями является необходимым этапом в развитии фиторемедиации. Исследователи предполагают, что увеличение концентрации металл-связывающих протеинов или пептидов в клетке растений может увеличивать способность металлов к связыванию и устойчивость растений.

Одни авторы считают, фитохелатины не играют существенной роли в гиперустойчивости растений к

тяжелым металлам. Хотя в культуре клеток экспрессия металлотионеинов [4, 5] или фитохелатинов [6] повышала устойчивость к Cd, перенос генов, отвечающих за синтез металлотионеинов к высшим растениям не оказывал влияния на аккумуляцию ионов. Когда испытывались *гипертолерантные* растения, не изменялась концентрация фитохелатинов, что наводит на мысль, что *гиперустойчивость* к Cd и Zn обеспечивается не за счет синтеза фитохелатинов [7]. Одним из доказательств в пользу роли фитохелатинов является то, что авторами была обнаружена корреляция между их присутствием фитохелатинов и *нормальным* уровнем устойчивости к металлу. Мутация, приводящая к неспособности продуцировать фитохелатины, приводила *Arabidopsis thaliana* L. к гиперчувствительности к Cd [8, 9]. Было установлено, что высокое содержание фитохелатинов коррелирует со способностью растений транспортировать Cd в надземные органы. Альтернативным взглядом является то, что фитохелатины обеспечивают *нормальную* устойчивость растений к избытку металла в среде. Для растений с *нормальной* устойчивостью (*A. thaliana*) синтез фитохелатинов действительно необходим при избытке металлов в среде, а в *гиперустойчивости* растений-гипераккумуляторов вряд ли играют роль фитохелатинов, считают авторы [10]. Главным аргументом является то, что если допустить, что у растений Zn+Cd -гипераккумуляторов Cd связывается с фитохелатинами, то растения все равно погибли бы от избытка цинка.

Для определения лимитирующих факторов для аккумуляции тяжелых металлов и устойчивости и для получения устойчивых трансгенных растений с повышенной способностью аккумулировать металлы, ген *Escherichia coli gshii*, кодирующий ГС, был активирован в цитозоле индийской горчицы [11]. Трансгенные растения накапливали значительно больше металла, чем дикий вид: концентрация Cd в надземных органах была выше на 25%. Тем не менее, эти растения показали повышенную устойчивость к Cd на стадии проростков и в стадии зрелости. Аккумуляция Cd и устойчивость коррелировала с уровнем экспрессии гена *gshi*. Обработанные кадмием растения содержали большее количество глутатиона, фитохелатины, тиолов, S и Ca по сравнению с диким типом. Авторы пришли к выводу, что в присутствии Cd фермент (ГС) является лимитирующим фактором для биосинтеза глутатиона и фитохелатины. Сверхэкспрессия ГС является перспективной стратегией для производства растений с супер-способностями, необходимыми для фиторемедиации.

Восстановленный глутатион GSH играет важную роль в защите растений от различных стрессов. Глутатион является не только субстратом для глутатион-S-трансферазы, нейтрализующей потенциально токсичные ксенобиотики [12], но также является восстановителем дегидроаскорбата [13]. Более того, GSH является предшественником фитохелатинов. Фитохелатины содержат высокий процент Цис-сульфгидрильных остатков, которые связывают и изолируют ионы в стабильных комплексах и индуцируются такими металлами, как Cd, во всех испытанных растениях [11, 14]. Глутатион синтезируется из составляющих его АК в 2 последовательностях, АТФ-зависимая реакция катализируется  $\gamma$ -глутамил-Цис-синтетазой (ГЦС) и  $\gamma$ -глутатион-синтетазой (ГС), соответственно. Фитохелатин-синтаза последовательно катализирует элонгацию ( $\gamma$ -Глу-Цис)<sub>n</sub> переносом  $\gamma$ -Глу-Цис-группы на глутатион или фитохелатины [15].

Манипуляция экспрессией ферментов, включающихся в синтез глутатиона и фитохелатинов, может быть отличным подходом для повышения устойчивости растений. Фермент фитохелатин-синтаза не может являться лимитирующим фактором для синтеза фитохелатинов из-за конститутивной экспрессии в растениях [16] и активированием присутствием металлов. Гены, кодирующие ферменты, включающиеся в синтез глутатиона, являются более перспективными в этом отношении. Лимитирующей стадией для синтеза глутатиона в отсутствие металлов является реакция, катализируемая  $\gamma$ -глутамил-Цис-синтетазой, потому что активность этого фермента регулируется глутатионом путем обратной связи и зависит от доступности Цис. Сверхэкспрессия у *E. coli* гена *gshi*, кодирующего  $\gamma$ -глутамил-Цис-синтазу повышал уровень глутатиона у тополя [12]. Более того, экспрессия у томата  $\gamma$ -глутамил-Цис-синтазы может восстанавливать устойчивость глутатион-дефицитного мутанта арабидопсиса *cad2*. Тем не менее, сверхэкспрессия этого гена не повышала устойчивость к Cd дикого типа арабидопсиса.

В норме ГС не является лимитирующим фактором, так как содержание глутатиона не изменяется сильно вследствие невысокой концентрации фитохелатинов. Сверхэкспрессия гена *E. coli gshii*, кодирующего ГС, не увеличивала уровень глутатиона у тополя [17]. Тем не менее, в присутствии тяжелых металлов регуляция биосинтеза глутатиона подвергается значительным изменениям. Тяжелые металлы активируют фитохелатин-синтазу и таким образом индуцируют биосинтез фитохелатинов, в результате чего снижается уровень глутатиона [18]. Последовательно, путем обратной связи снимается ингибирование  $\gamma$ -глутамил-Цис-синтазы глутатионом. Более того, экспрессия  $\gamma$ -глутамил-Цис-синтазы может повышаться тяжелыми металлами. Было продемонстрировано, что Cd увеличивает транскрипцию гена  $\gamma$ -глутамил-Цис-синтазы и дезактивирует ГС. Происходит снижение глутатиона и аккумуляция его ингибируется  $\gamma$ -глутамил-Цис за счет снижения активности ГС [19]. Экспозиция корней кукурузы в присутствии Cd вызывала снижение содержания глутатиона и накопление  $\gamma$ -глутамил-Цистеина за счет снижения активности ГС. Поэтому, ГС может стать лимитирующим фактором для биосинтеза глутатиона и фитохелатинов [20]. Сверхэкспрессия гена *gshii* может увеличить содержание глутатиона и синтез фитохелатинов (рисунок).

В результате сверхэкспрессии гена *E. coli gshii* у индийской горчицы происходило увеличение содержания глутатиона и фитохелатинов, а также увеличивалась аккумуляция Cd и устойчивость растений. В корнях Cd-обработанных растений дикого типа содержание глутатиона было в 3 раза ниже, чем у контрольных

растений за счет увеличения синтеза фитохелатинов. трансгенных растений по сравнению с диким типом.

В тканях трансгенных растений содержание глутатиона было одинаковым у обработанных и необработанных растений, хотя уровень фитохелатинов в корнях и надземных органах трансгенных растений было в 2 раза больше, чем у дикого типа. Так как корни являются главным местом синтеза фитохелатинов, наблюдалось снижение глутатиона у дикого типа в корнях, но не в надземных органах. Кадмий увеличивал содержание тиоловых групп в корнях трансгенных растений в 10 раз и только в 3 раза в надземных органах, что указывает на причину устойчивости трансгенных растений как результат увеличения синтеза фитохелатинов.

Высокий уровень глутатиона в корнях у трансгенных растений обуславливал большую устойчивость к кадмию. Cd-ФХ комплексируется в вакуолях с сульфидными группами. Предполагают, что устойчивость к металлам может лимитироваться доступностью серы для Цис и синтезом сульфидов [21]. Уровень общей серы был в надземных органах выше, чем в корнях.

Кадмий значительно снижал концентрацию Са у диких и трансгенных растений, но сверхэкспрессия гена ГС уменьшала уровень снижения Са в надземных органах. В корнях содержание Са не сильно различалось у трансгенных растений и у дикого типа. Cd является блокиратором кальциевых каналов, мешает связыванию Са с кальмодулином, белком, который регулирует активность многих ферментов и клеточных процессов [22]. Увеличение уровня Cd-связанного пептида у трансгенных растений может снижать эффективность кадмия на взаимодействие с кальцием.

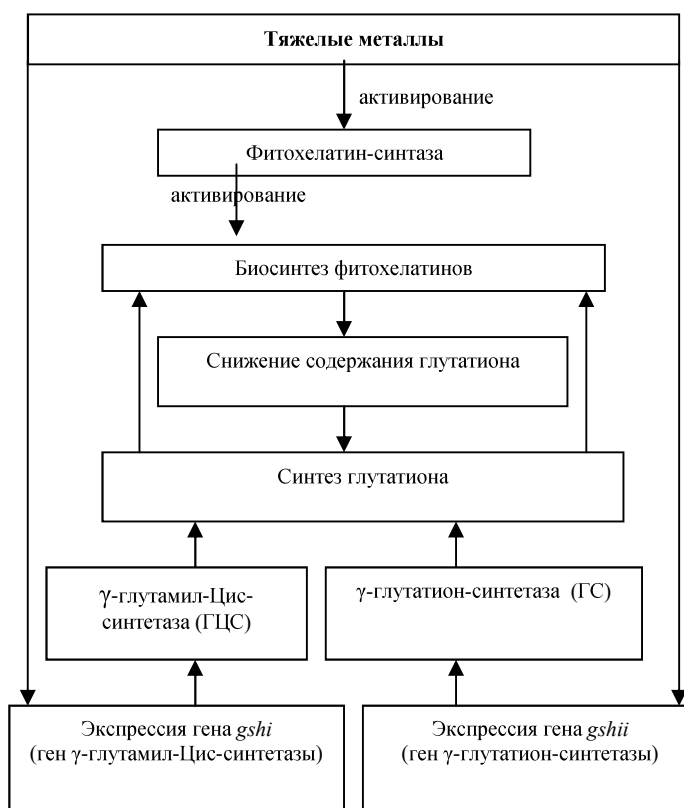


Рисунок – Схема регуляции синтеза фитохелатинов в растениях

Трансгенные растения накапливали больше Cd в надземных органах. Транслокация Cd из корней в надземные органы по силеме обеспечивалась транспирационным током [23]. Чем больше Cd связывается с фитохелатинами и запасается в вакуолях у трансгенных растений, тем меньше подвергаются разрушению жизненно важные биохимические и физиологические процессы. Это ведет к увеличению поверхности листьев, следовательно, большей аккумуляции Cd (как результат увеличения транспирации).

Трансгенные растения поглощают больше кадмия из-за меньшего повреждения поверхности корней. Поглощение воды является первичным механизмом увеличивающим движение Cd по растению [21]. Высокий уровень фитохелатинов в корнях у трансгенных растений снижает негативный эффект Cd на поглощение воды.

Таким образом, регуляция синтеза глутатиона способствует аккумуляции тяжелых металлов и увеличению устойчивости трансгенных растений. Трансгенные растения позволяют увеличивать эффективность фитоэкстракции тяжелых металлов из загрязненных сред. Манипуляция экспрессией генов синтеза глутатиона может стать одним из подходов к увеличению фитоэкстракции тяжелых металлов и повышению устойчивости растений.

#### Литература

1 Chaney R.L., Li Y. M., Scott J.A. Improving metal hyperaccumulator wild plants to develop commercial

- phytoextraction systems: Approaches and Progress.* – New York, 1998. – 37 p.
- 2 Brooks R.R. *Plants that hyperaccumulate heavy metals* // Wallingford, UK: CAB International, 1998. – 53 p.
  - 3 Li Y.M., Chaney R., Brewer E., Roserberg R., Angle J.S., Baker A., Reeves R., Nelkin J. *Development of a technology for commercial phytoextraction of nickel - economic and technical considerations* // *Plant and Soil.* - 2003. - Vol. 249. - P. 107-115.
  - 4 Grill E., Luffler S., Winnacker E-L. *Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific g-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthetase)* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1989. – Vol. 86. – P. 6838-6842.
  - 5 Robinson N.J., Tommey A.M., Kuske C., Jackson P.J. *Plant metallo-thioneins* // *Biochem. J. Environ. Qual.* – 1994. – N 23. – P. 1151-1157.
  - 6 Rauser W.E. *Phytochelatin and related peptides* // *Plant physiol.* – 1995. – Vol. 109. – P. 1141-1149.
  - 7 Harmens H., Den Hartog P.R., Verkleij J.A. *Increased zinc tolerance in Silene vulgaris (Moench) Garcke is not due to increased production of phytochelatin* // *New Phytol.* – 1993. – N103. – P.1305-1309.
  - 8 Howden R., Andersen C.R., Gobbett C.S. *A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of Arabidopsis thaliana* // *Plant Phys.* – 1995. – Vol. 107. – P. 1067-1073.
  - 9 Howden R., Goldbrough P.B., Andersen C.R., Gobbet C.S. *Cadmium sensitive cad1 mutants of Arabidopsis thaliana are phytochelatin-deficient* // *Plant Phys.* – 1995. – Vol. 107. – P. 1059-1066.
  - 10 Lombi E., Zhao F.J., McGrath S.P., Young S.D. *Physiological evidence for high-affinity transporter highly expressed in Thlaspi caerulescens ecotype* // *New Phytol.* – 2001. – N149. – P. 53-60.
  - 11 Zhu Y.L., Pilon-Smits E.A.H., Jouanin L., Terry N. *Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance* // *Plant Physiol.* – 1999. – Vol. 119. – P. 73-80.
  - 12 Foyer C.H., Haliwell B. *The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism* // *Planta.* - 1976. – Vol. 133. – P. 21-25.
  - 13 Marrs K. *The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants* // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1996. – Vol. 47. – P.127-158.
  - 14 Zenk M.H. *Heavy metal detoxification in higher plants: a review* // *Gene.* – 1996. – Vol. 179. – P. 21-30.
  - 15 Chen J., Zhou J., Goldsbrough P.B. *Characterization of phytochelatin synthase from tomato* // *Physiol. Plant.* – 1997. – Vol. 101. – P. 165-172.
  - 16 Steffens J.C. *The heavy metal-binding peptides of plants* // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1990. – Vol. 41. – P. 553-575.
  - 17 Foyer C.H., Souriau N., Perret S., Lelandais M., Kunert K.J., Pruvost C., Jouanin L. *Over-expression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees* // *Plant Physiol.* – 1995. – Vol. 109. – P. 1047-1057.
  - 18 Schneider S., Bergmann L. *Regulation of glutathione synthesis in suspension cultures of parsley and tobacco* // *Bot Acta.* – 1995. – Vol. 108. – P. 34-40.
  - 19 Rauser W.E., Schupp R., Rennenberg H. *Cysteine,  $\gamma$ -glutamylcysteine and glutathione levels in maize seedlings. Distribution and translocation in normal and cadmium-exposed plants* // *Plant Physiol.* – 1991. – Vol. 97. – P. 128-138.
  - 20 Goldbrough P.B. *Metal tolerance in plants: the role of phytochelatin and metallothioneins* // *Phytoremediation of Trace elements (Eds N.Terry, G.S.Banuelos).* – Ann. Arbor. Press., Ann. Arbor, MI, 1998 – 386 p.
  - 21 Cheung W.Y. *Calmodulin: its potential role in cell proliferation and heavy metal toxicity* // *Fed. Proc.* - 1984. – Vol. 43. – P. 2995-2999.
  - 22 Marchiol L., Leita L., Martin M., Peressotti A., Zerbi G. *Physiological responses of two soybean cultivars to cadmium* // *J. Environ. Qual.* – 1996. – Vol. 25. – P. 562-566.
  - 23 Petit C.M., van de Geijn S.C. *In vivo measurements of cadmium (115 mM Cd) transport and accumulation in steams of intact tomato plants (Lycopersicon esculentum Mill). I. Long distance transport and local accumulation* // *Planta.* – 1978. – Vol. 138. – P. 137-143.

#### Тұжырым

Өсімдіктердің гипертөзімділігінің және ауыр металдардың өсімдіктердегі гипераккумуляция механизмдері туралы соңғы кездегі әдебиетке шолу берілген

#### Summary

The review of modern literature data about mechanisms of plant hypertolerance and hyperaccumulation of heavy metals by plants it was presented

УДК 579.06: 577.21

Аширбеков<sup>1</sup> Е.Е., Абугалиева<sup>1</sup> Г.К., Балмуханов<sup>1</sup> Т.С., Айтхожина<sup>1</sup> Н.А.,  
Цзю<sup>2</sup> В.Л., Игнатова<sup>2</sup> Л.В., Мукашева<sup>2</sup> Т.Д.

**ДНК-ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ РОДА *Bacillus* МЕТОДОМ RAPD**

(<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина,

<sup>2</sup>Казахский государственный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан)