

Қорыта айтқанда, бидай «Жеңіс» сортының өніп-өсу белсенділігі ортадағы NaCl мөлшерінен тәуелді болды. NaCl концентрациялары неғұрлым жоғарылаған сайын, бидайдың өніп-өсу қарқыны төмендейтіні анықталды. Құрамында күкірті бар өсуді реттегіш синтетикалық регуляторлардың T-10 ортаңғы (0,0001%) және T-10" төменгі (0,00001%) концентрациялары бидайдың өну белсенділігін анағұрлым арттыратыны айқындалды. Ал бидайдың өсу қарқынын арттырмайтыны анықталды. Әйтсе де тәжірибелік варианттарда бидайдың өсіп-дамуы бақылау вариантында өскен өскіндерден қалыспады. Тәжірибелік варианттарды өзара салыстырғанда бидайдың өсу қарқынын T-10 мен T-10" төменгі (0,00001%), ал T-10' ортаңғы (0,0001%) және төменгі (0,00001%) концентарциялары анағұрлым жоғарылататыны анықталды. Тұзды ортада T-10 орташа және төменгі, ал T10" төменгі концентрациялары бидайдың өну белсенділігін арттыратыны анықталды. Ал бидайдың өсу қарқынына T-10 мен T-10" төменгі, ал T-10' ортаңғы және төменгі концентарциялары оптималды жағдай тудыратыны анықталды.

1. Громов, А.А. Эффективность регуляторов роста и биопрепаратов на озимой пшенице и просе / А.А. Громов, В.Б. Щукин, В.Н. Варавва // Земледелие.- 2005.- № 6.- С. 34-35.

2. Щукин, В.Б. Эффективность обработки семян озимой пшеницы физиологически активными веществами и биопрепаратами / В.Б. Щукин, А.А. Громов, Н.В.Щукина // Земледелие.- 2007.- № 6. – С. 32.

3. Шаповал О.А. Формирование урожая озимой пшеницы при обработке регуляторами роста // Плодородие. 2004 .№3(18). с. 16.

4. Тарасенко С.А., Дорошкевич Е.И., Тарасенко В.С. Влияние стимуляторов роста растений на урожай и качество сельскохозяйственных культур. Тез. док. VI Междунар. конференц. «Регуляторы роста и развития растений». -М.: Изд-во МСХА, 2001. с. 280.

5. Немченко В.В. Применение регуляторов роста для повышения устойчивости растений к неблагоприятным условиям произрастания. Тез. док. VI Междунр. конференц. «Регуляторы роста и развития растений». М.: Изд-во МСХА, 2001.-с. 263.

В работе изучено влияние серосодержащих синтетических регуляторов роста (T-10, T-10', T-10") на солеустойчивость яровой пшеницы сорта «Женис». Выявлены влияние регуляторов роста на прорастание, рост и развитие пшеницы в условиях засоления.

In work influence synthetic regulators of growth (T-10, T-10', T-10 ") on salt-endurance of spring wheat of a grade of "Zhenis" is studied. Influence of regulators of growth on germination, growth and and development of wheat in the conditions of salinization.

С.Д. Атабаева, С.С. Кенжебаева.

ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ ДЛЯ ФИТОРЕМЕДИАЦИИ

(Казахский национальный университет им.аль-Фараби)

В настоящей работе проведен обзор литературных данных последних лет о возможностях применения трансгенных растений для фиторемедиации почв, загрязненных тяжелыми металлами. Приведены данные литературы о возможности получения ряда растений-трансформантов, обладающих повышенной способностью аккумулировать во внутриклеточных структурах (преимущественно в вакуолях) и в межклеточном пространстве конъюгаты эндогенных соединений с токсикантами. Генно-инженерные работы, направленные на повышение эффективности фиторемедиационных свойств растений, особенно интенсивно ведутся в течение последних лет. Манипуляция экспрессией фермента γ -глутамил-Цис-синтетазы, включающегося в синтез глутатиона и фитохелатинов, может быть отличным подходом для повышения устойчивости растений, так как фермент фитохелатин-синтаза не может являться лимитирующим фактором для синтеза фитохелатинов из-за конститутивной экспрессии в растениях и активированием присутствием металлов. Регуляция синтеза глутатиона способствует аккумуляции тяжелых металлов и увеличению устойчивости трансгенных растений. Приведены данные литературы о возможности использования гена фермента глутатион-S-трансфераза для создания трансгенных растений.

Фиторемедиация за последнее десятилетие из концептуального методологического подхода превратилась в экологически важную, конкурентоспособную коммерческую технологию для очистки окружающей среды от органических и неорганических токсичных соединений. Для разных фиторемедиационных приемов, используемых на практике, таких как фитоэкстракция, ризодеградация (совместное действие микроорганизмов и растений), фитодеградация, фитостабилизация, ризофильтрация и др., которые уже используются в практических целях, крайне важный фактор для успешной реализации этих технологий - наличие подходящих растений, активно усваивающих токсиканты. Эффективность процессов фиторемедиации в значительной степени определяется способностью самого растения усваивать и накапливать в клеточных структурах токсиканты. Прогресс, связанный с фиторемедиацией окружающей среды, загрязненной органическими токсикантами, по своей масштабности значительно превосходит аналогичные процессы, связанные с усвоением неорганических токсикантов и радионуклидов. Это объясняется долговременной селекцией подходящих для этого процесса растений, приспособленностью к конкретной почвенно-климатической

зоне, урожайностью, способностью накапливать большую биомассу, наличием соответствующих физиологических (способность к транспирации) и морфологических (развитая корневая система) характеристик, адаптацией к полевым условиям, наличием соответствующих ферментных систем и др. Указанные выше качества и, возможно, некоторые другие обуславливают усвоение и глубокую деградацию органических токсикантов растениями, т.е. именно ими определяется фиторемедиационный потенциал растений. В этом направлении достигнут вполне определенный прогресс - клонированием генов. Уже получен ряд растений-трансформантов, обладающих повышенной способностью аккумулировать во внутриклеточных структурах (преимущественно в вакуолях) и в межклеточном пространстве конъюгаты эндогенных соединений с токсикантами. В этом направлении исследования интенсивно развиваются во многих странах мира [1].

Около двух десятков лет широко обсуждается возможность использования растений для очистки почв, грунтовых вод и водоемов от неорганических токсикантов. Судя по достигнутым результатам, несомненно, что фитоэкстракция тяжелых металлов в условиях *in situ* является наиболее дешевой, не затрагивающей структуры почвы технологией, которая все больше привлекает внимание как ученых, так и практиков-аграриев, а также экологов.

В литературе описаны растения-трансформанты, характеризующиеся повышенной фитоэкстракционной способностью. Генно-инженерные работы, направленные на повышение эффективности фиторемедиационных свойств растений, особенно интенсивно ведутся в течение последних лет. Первые широкомасштабные полевые исследования были проведены в начале 2000 г. в США. Наиболее значимые работы по получению рекомбинантных растений, а их уже накопилось свыше 100, осуществлялись в разных направлениях.

Предполагают, что фиторемедиация коммерциализировалась бы очень быстро, если поглощающая способность растений гипераккумуляторов, как *T. caerulescens*, трансформировалась к высокопродуктивной культуре, как *Indian mustard (Brassica juncea)* или кукуруза (*Zea mays*). Биотехнология была успешно применена для манипуляции процессами поглощения металлов и свойствами устойчивости у нескольких видов. Например, у табака (*Nicotiana tabacum*) увеличивалась устойчивость к металлу при экспрессии генов синтеза металлотионеинов и других металл-связывающих белков.

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 [2]. 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 [3], но также является восстановителем дегидроаскорбата [4]. 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 [2, 5]. Глутатион синтезируется из составляющих его АК в 2 последовательностях, АТФ-зависимая реакция катализируется γ -глутамил-Цис-синтетазой (ГЦС) и γ -глутатион-синтетазой (ГС), соответственно. Фитохелатин-синтаза последовательно катализирует элонгацию $(\gamma\text{-Глу-Цис})_n$ переносом $\gamma\text{-Глу-Цис-группы}$ на глутатион или фитохелатины [6].

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 [7] и активированием присутствием металлов (рисунок). Гены, кодирующие ферменты, включающиеся в синтез глутатиона, являются более перспективными в этом отношении. Лимитирующей стадией для синтеза глутатиона в отсутствие металлов является реакция, катализируемая γ -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 γ -глутамил-Цис-синтазу повышал уровень глутатиона у тополя [4]. Более того, экспрессия у томата γ -глутамил-Цис-синтетазы 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 [8]. 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 [9]. Последовательно, путем обратной связи снимается ингибирование γ -глутамил-Цис-синтетазы глутатионом. Более того, экспрессия γ -глутамил-Цис-синтетазы может повышаться тяжелыми металлами. Было продемонстрировано, что Cd увеличивает транскрипцию гена γ -глутамил-Цис-синтетазы и дезактивирует ГС. Происходит снижение глутатиона и аккумуляция его ингибируется γ -глутамил-Цис за счет снижения активности ГС [10]. Экспозиция корней кукурузы в присутствии Cd вызывала снижение содержания глутатиона и накопление γ -глутамил-Цистеина за счет снижения активности ГС. Поэтому ГС может стать лимитирующим фактором для биосинтеза глутатиона и фитохелатинов [11]. Сверхэкспрессия гена *gshii* может увеличить содержание глутатиона и синтез фитохелатинов (рисунок 1).

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 является лучшим объяснением устойчивости трансгенных растений как результат увеличения синтеза фитохелатинов.

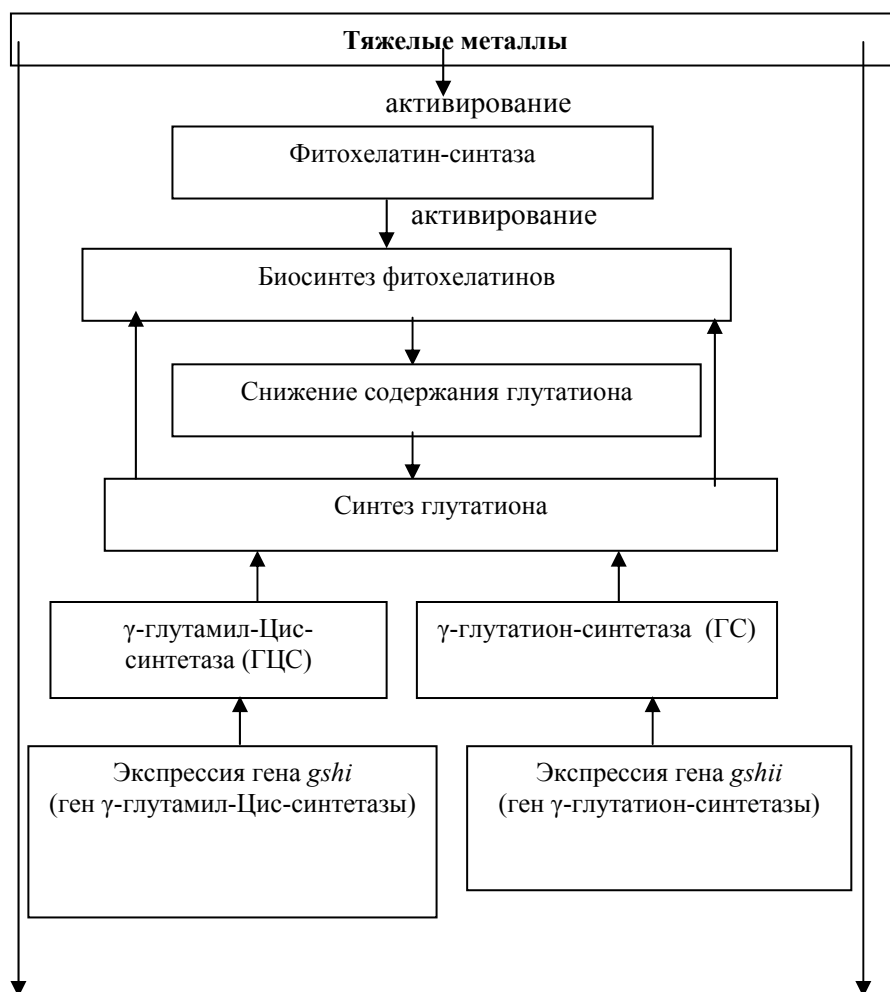


Рисунок 1 – Схема регуляции синтеза фитохелатинов в растениях

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 [12]. Уровень общей серы был в надземных органах выше у 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 [13]. Увеличение уровня Cd-связанного пептида у трансгенных растений может снижать эффективность кадмия на взаимодействие с кальцием.

Трансгенные растения накапливали больше Cd в надземных органах. Транслокация Cd из корней в надземные органы по ксилеме обеспечивалась транспирационным током [14]. 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 [12]. Высокий уровень фитохелатинов в корнях у трансгенных растений снижает негативный эффект Cd на поглощение воды.

Итак, манипуляция экспрессией генов синтеза глутатиона может стать одним из подходов к увеличению фитоэкстракции тяжелых металлов и повышению устойчивости растений.

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.

Эффективным применением биотехнологии для восстановления окружающей среды является биоинженерия растений, способных улетучивать ртуть из почв, загрязненных метил-ртутью. Метил-ртуть, сильный неотоксикант, синтезируется на ртуть-загрязненных почвах. Для детоксикации этого токсина используют трансгенные растения арабидопсиса или табака. В них были экспрессированы гены *merB* и *merA*. В этих модифицированных растениях *merB* катализировал протолиз углерод-ртути, связанный с генерацией Hg^{2+} в менее мобильный ртуть. Последовательно, *merA* превращает Hg (II) в Hg^0 - летучий элемент, который выделяется в атмосферу. Хотя на западе регулирующие законы ограничивают использование модифицированных растений *merB* и *merA*, это исследование иллюстрирует огромный потенциал биотехнологии для восстановления окружающей среды.

Относительно законов, ограничивающих использование улетучивания ртути Bizil с сотр. (1977) [цит. по 1] продемонстрировал, что растения с экспрессированными *MerBpe* (органомеркуриал-лиаза под контролем промотора растений) может быть использована для деградации метил-ртути и последовательно извлекать ионную форму ртути через экстракцию. Несмотря на преимущества биотехнологии, мало известно о генетике растений гипераккумуляторов. В частности, наследуемость подобных механизмов, как металл-транспорт и аккумуляция и устойчивость к металлам должны быть лучше поняты.

R.Chaney предлагает использовать традиционные селекционные подходы для улучшения процессов фиторемедиации и возможно объединенных полевых тестов на металлустойчивость и поглощение тяжелых металлов в высоко продуктивную биомассу растений. Например, E.P.Brewer с сотр. (1997) генерировал соматические гибриды между *T.caerulescens* (Zn-гиперакумулятор) и *Brassica napus* (канола), полученный гибридной селекцией для Zn-устойчивости. Были получены гибриды с большой биомассой со сверхустойчивостью к цинку. Авторы прилагают усилия для сбора и коллекции гермоплазмы растений-аккумуляторов [цит. по 1].

Среди большого разнообразия растений, перспективных для фиторемедиации особое внимание заслуживает тополь (*Populus*), в силу мощной корневой системы, обладающий большой поглощающей способностью. Многообразные генно-инженерные модификации этого растения убеждают в целесообразности практического использования ряда полученных трансформантов. Одна из таких работ посвящена обогащению генома тополя бактериальным геном, кодирующим синтез γ -глутамицистеин синтетазы (ГЦС) (К.Ф. 6.3.2.2), которая служит ключевым ферментом в процессе биосинтеза глутатиона.

Глутатион-S-трансфераза — широко распространенный в растениях фермент, который принимает участие как в нормальных метаболических процессах растительной клетки, так и в защите

растений от стрессовых ситуаций. Часто при создании трансгенных растений для фиторемедиации мишенью является ген именно этого фермента [цит. по 1].

Если попытаться представить, каким должно быть идеальное, с экологической точки зрения, растение, то, очевидно, картина выглядела бы следующим образом: такое растение, обладая длинной, хорошо развитой корневой системой и сильным транспирационным током, должно интенсивно образовывать биомассу, а эта растительная биомасса должна характеризоваться толерантностью по отношению к органическим и неорганическим токсичным соединениям. Кроме того, такое растение в обязательном порядке должно быстро образовывать конъюгаты и располагать соответствующим потенциалом (емкостью) для их складирования в клеточных структурах и апопласте [цит. по 1].

Краткий обзор генно-инженерных работ, проводимых в этой области, указывает на то, что в ряде случаев в трансгенных растениях отмечается существенное повышение детоксикационной способности. Об этом свидетельствует тот факт, что некоторые трансгенные растения отличаются повышенной способностью ассимиляции органических токсичных соединений и способностью поглощения тяжелых металлов. Очевидно, эти работы будут продолжены и в ближайшем будущем и, несомненно, результаты будут более существенными, с точки зрения их практической реализации.

1. Квеситадзе Г.И., Хатисашвили Г.А., Садунишвили Т.А., Евстигнеева З.Г. Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях. – М.: Наука. 2005. – 197 с.

2. 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.

3. 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.

4. 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.

5. Zenk M.H. Heavy metal detoxification in higher plants: a review // *Gene.* – 1996. – Vol. 179. – P. 21-30.

6. Chen J., Zhou J., Goldsbrough P.B. Characterization of phytochelatin synthase from tomato // *Physiol Plant.* – 1997. – Vol. 101. – P. 165-172.

7. Steffens J.C. The heavy metal-binding peptides of plants // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1990. – V. 41. – Pp. 553-575.

8. 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.

9. Schneider S., Bergmann L. Regulation of glutathione synthesis in suspension cultures of parsley and tobacco // *Bot Acta.* – 1995. – Vol. 108. – P. 34-40.

10. Rauser W.E., Schupp R., Rennenberg H. Cysteine, γ -glutamylcysteine and glutathione levels in maize seedlings. Distribution and translocation in normal and cadmium-exposed plants // *Plant Physiol.* – 1991. – Vol. 97. – P. 128-138.

11. Goldbrough P.B. Metal tolerance in plants: the role of phytochelatins and metallothioneins // *Phytoremediation of Trace elements* (Eds N.Terry, G.S.Banuelos). – Ann. Arbor. Press., Ann. Arbor, MI, 1998 – 386 p.

12. Cheung W.Y. Calmodulin: its potential role in cell proliferation and heavy metal toxicity // *Fed. Proc.* – 1984. – Vol. 43. – P. 2995-2999.

13. 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.

14. 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.

It was reviewed the literature in recent years about the potential use of transgenic plants to phytoremediation soils contaminated by heavy metals. The possibility of obtaining a number of plant transformants with increased ability to accumulate in intracellular structures (mainly in the vacuoles) and in the intercellular space of conjugates of endogenous compounds with toxicants was shown. Genetic engineering research works to improve the metal accumulation ability of plants are conducting intensively, especially in recent years. Manipulation of the expression of enzymes like as γ -glutamyl-Cys-synthetase involved in the synthesis of glutathione and phytochelatins can be an excellent approach for improving plant resistance, as phytochelatins synthase enzyme may not be a limiting factor for the synthesis of phytochelatins by constitutive expression in plants. Regulation of glutathione synthesis promotes the accumulation of heavy metals and increase the tolerance of the transgenic plants. The possibility of using gene of the enzyme glutathione-S-transferase to create transgenic plants it was shown.

Осы жұмыста соңғы жылдардың әдебиеттерін қолданып, трансгендік өсімдіктерді фиторемедиацияда қолдану мүмкіндіктері көрсетілген. Металл жинақтайтын қабілеті жоғары, металдарды клетканың ішіндегі органеллаларда /вакуольде/ және клетка аралық кеңістігінде токсиканттардың және эндогендік қосындылардың конъюгаттары түрінде жинақтайтын өсімдіктердің трансформанттарын алу мүмкіндіктері сипатталған. Соңғы жылдарда генді-инженерлік жұмыстар қарқынды жүріп жатыр. Глутатион мен фитохелатиндердің синтезіне қатысатын ферменттің γ -глутамил-Цис-синтеазаның гендерінің манипуляциясы өсімдіктердің ауыр металдарға тұрақтылығын және олардың металл жинақтайтын қабілетін жоғалатуға жол береді. Фитохелатинсинтазаның синтезінің гені шектейтін факторға жатпайды, себебі ол конститутивті болып келеді. Глутатион синтезінің реттелуі ауыр металдардың жинақталуына және тұрақтылығына әсер етеді. Трансгендік өсімдік алу үшін глутатион-S-трансфераза ферментін қолдану мүмкіндігі туралы әдебиеттер келтірілген.