



*На правах рукописи*

Сальва Елсайед Морси Мохамед

**ПОЛУЧЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ  
РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ, ТОЛЕРАНТНЫХ К ИОНАМ КАДМИЯ, И  
ИХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА**

Специальность 03.01.05 – физиология и биохимия растений

**03 ФЕВ 2011**

**Автореферат**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена на кафедре ботаники, физиологии растений и агробиотехнологии аграрного факультета Российского университета дружбы народов, г. Москва

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,  
доцент Гайворонская  
Людмила Михайловна

Научный консультант

доктор биологических наук,  
Долгих Юлия Ивановна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,  
профессор Калашникова  
Елена Анатольевна

кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник  
Кожевникова Анна  
Дмитриевна

Ведущая организация:

Всероссийский научно-  
исследовательский институт  
сельскохозяйственной  
биотехнологии РАСХН

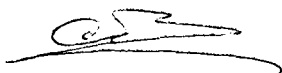
**Защита состоится «10» февраля 2011 г. в 16-30 часов на заседании диссертационного совета Д 220.043.08 при ФГОУ ВПО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» по адресу: 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49.**

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке имени Н.И. Железнова ФГОУ ВПО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева

Автореферат разослан 9 января 2011 года

Автореферат размещен на сайте [www.timacad.ru](http://www.timacad.ru)

Ученый секретарь  
диссертационного совета



Белопухов С.Л.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Возделываемые растения подвергаются действию различных неблагоприятных факторов окружающей среды. В последние годы к таким природным стрессовым факторам как засуха, засоление, повышенные и пониженные температуры добавились антропогенные факторы, например, загрязнение почвы солями тяжелых металлов, вызванное развитием промышленности, работой транспорта, применением минеральных удобрений. Одним из наиболее токсичных тяжелых металлов является кадмий, обладающий сильно выраженным отрицательным действием на все живые организмы, включая растения. Накапливаясь в органах и тканях, кадмий негативно влияет на многие стороны метаболизма, а также на продуктивность растений. Вместе с тем, благодаря наличию механизмов устойчивости, действующих на разных уровнях организации, некоторые виды растений способны расти и развиваться без серьезных нарушений физиологических процессов в присутствии довольно высоких концентраций кадмия в окружающей среде [Титов и др., 2007].

Для выращивания растений в этих условиях большое практическое значение имеет изучение влияния кадмия на культурные растения, в том числе и пшеницу, контроль поступления тяжелых металлов в различные ткани и органы растений, выявление механизмов устойчивости.

Большую помощь в изучении механизмов устойчивости растений оказывают мутантные и трансгенные формы с измененной чувствительностью к тяжелым металлам. Идентичные исходным растениям во всех других отношениях, такие формы позволяют вычленить из большого количества признаков только те, которые непосредственно связаны с устойчивостью, накоплением и распределением металлов по растению. Для получения растений, толерантных к тяжелым металлам, перспективно использование метода клеточной селекции. Повышение уровня генетической изменчивости при культивировании клеток *in vitro* увеличивает генетическое разнообразие исходного материала [Karp, 1995]. Проведение отбора на

клеточном уровне позволяет в малом объеме проанализировать миллионы генотипов. Многообещающим способом получения толерантных к тяжелым металлам растений является генетическая инженерия [Zhang et al., 2006].

Цель исследования: получение биотехнологическими методами растений пшеницы, толерантных к ионам кадмия, и исследование причин их устойчивости.

Задачи исследования:

- определить чувствительность различных сортов пшеницы к хлориду кадмия;
- оценить морфогенетическую способность различных сортов пшеницы;
- получить методом клеточной селекции клеточные линии и растения пшеницы, толерантные к  $\text{CdCl}_2$ ;
- оценить устойчивость растений-регенерантов и их потомства к кадмию, дать морфо-физиологическую характеристику полученных растений;
- определить уровень толерантности к кадмию трансгенных растений пшеницы с повышенным содержанием эндогенного пролина;
- определить уровень накопления кадмия исходными и полученными путем клеточной селекции растениями.

Научная новизна и практическая значимость

Определена чувствительность к кадмию нескольких сортов пшеницы. Методом клеточной селекции получены растения пшеницы с повышенной толерантностью к кадмию. Показано, что увеличение уровня эндогенного пролина способствует повышению устойчивости к кадмию и изменению характера распределения ионов металла по растению. Полученные толерантные к кадмию растения могут быть использованы в качестве модели для изучения механизмов устойчивости к действию тяжелых металлов.

Разработанный метод клеточной селекции может быть использован для выведения сортов пшеницы с повышенной устойчивостью к кадмию.

#### Апробация работы

Результаты работы докладывались на Всероссийской конференции «Современные аспекты структурно-функциональной биологии растений и грибов», г.Орел (2010 г.) и III Всероссийском симпозиуме «физиология трансгенного растения и фундаментальные основы биобезопасности», г.Москва (2010 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 3 печатные работы, из которых 1 – статья в журнале из списка ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения заключения, выводов и списка литературы. Материалы диссертации изложены на страницах машинописного текста и содержат таблицы и рисунков. Список цитируемой литературы включает наименований, в том числе на английском языке.

### **ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В работе было использовано восемь сортов мягкой яровой пшеницы: 5 египетских (Гиммеза-1, Гиммеза-9, Гиза-167, Сидс-1, Саха-69) и три российских (Энита, Новосибирская-22, Кинельская-59), а также египетский сорт твердой пшеницы Сухадж-1. Кроме того были использованы растения пшеницы, трансформированные геном пролиндегидрогеназы (*pdh*) в антисмысловой ориентации (Степанова и др., 2010).

Каллус получали из зрелых зародышей, выделенных из сухих семян. Для индукции и культивирования каллуса использовали среду Мурасиге-Скуга (Murashige, Skoog, 1962), содержащую 120 мг/л аспарагина, 20 мг/л аскорбиновой кислоты, 100 мг/л мезо-инозита, 30 мг/л сахарозы, 3мг/л 2,4-D и 7 г/л агар-агара. Для регенерации растений каллус пересаживали на среду

МС без гормонов, в которую для стимуляции регенерации добавляли антибиотик цефотаксим в концентрации 150 мг/л (Данилова, Долгих, 2004). Регенеранты укореняли на среде с половинной нормой солей МС и 10 г/л сахарозы, затем пересаживали в почву. Каллус и регенеранты культивировали при температуре 26°C на свету при интенсивности освещения 2000 лк и длине светового дня 16 ч.

Для определения чувствительности клеток к кадмию каллусы культивировали на средах, содержащих  $\text{CdCl}_2$  в концентрациях 100, 200 и 300 мкМ. Через месяц определяли число выживших и число морфогенных каллусов. Морфогенными считали каллусы с зелеными почками.

Для определения влияния кадмия на рост растений в водной культуре семена проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной водой, недельные проростки пересаживали в сосуды объемом 1 л, наполненные дренажом (керамзит), залитые раствором Хогланда-Снайдерса. Хлорид кадмия вносили в питательный раствор через неделю после посадки проростков в концентрациях от 0 до 300 мкМ. В один сосуд сажали до 5 растений. После двухнедельной инкубации в растворе с кадмием измеряли высоту надземной части и максимальную длину корня, определяли сырую и сухую массу, концентрацию пролина, количество фотосинтетических пигментов, количество МДА, активность СОД и пероксидазы, содержание кадмия в разных органах растений.

Экстракцию и определение свободного пролина проводили по методу Bates (Bates L. et al., 1973). Определение активности общей супероксиддисмутазы (СОД) выполняли по Beauchamp и Fridovich (1971), гваяколовой пероксидазы – по Ridge и Osborne (1971). Концентрацию белка в ферментных препаратах измеряли по методу Esen (1978). Содержание малонового диальдегида определяли по методу Heath и Packer (1968).

Фотосинтетические пигменты экстрагировали 80% ацетоном. Концентрацию пигментов в вытяжке определяли на спектрофотометре Thermo Electron Corporation Genesys 10 UV (Шлык, 1971).

Определение содержания кадмия в тканях растений проводили по методу Голубкиной. Концентрацию ТМ измеряли на атомно-абсорбционном спектрофотометре Hitachi-207 («Hitachi», Япония).

Все опыты выполнены в трехкратной повторности. В таблицах и на диаграммах приведены средние значения со стандартной ошибкой. Достоверность разницы между вариантами определяли по критерию Стьюдента-Фишера при  $P < 0,05$ . При проведении статистической обработки использовали программу Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Определение чувствительность к кадмию различных сортов пшеницы*

Проростки нескольких сортов пшеницы российской и египетской селекции выращивали в водной культуре в питательном растворе, содержащем от 0 до 400 мкМ  $\text{CdCl}_2$  в течение двух недель. Размеры побега и корня, а также массу каждого растения измеряли до внесения кадмия в питательный раствор и после культивирования в присутствии тяжелого металла. На основании этих измерений определяли увеличение длины растений и прирост биомассы.

Разные сорта пшеницы значительно различались по реакции на кадмий. У сортов Гиммеза-9, Новосибирская-22, Сидс-1, Саха-69 гибель части растений наблюдали уже при концентрации кадмия 100 мкМ. Наиболее заметно реакция на кадмий и различия между сортами проявились при содержании 300 мкМ хлорида кадмия в питательном растворе. Для одной группы сортов (Кинельская-59, Энита, Гиза-167) была характерна высокая выживаемость, сопровождающаяся торможением роста, что можно рассматривать как адаптивную реакцию. У другой группы сортов отмечена гибель большей части проростков, но у выживших наблюдали двухкратное увеличение биомассы и длины побегов и существенный рост корней. Вероятно, эти сорта не являются однородными: среди основной массы растений с высокой чувствительностью к кадмию встречаются относительно

толерантные организмы. Проростки наиболее чувствительного сорта Саха-69 при концентрации 300 мкМ погибли.

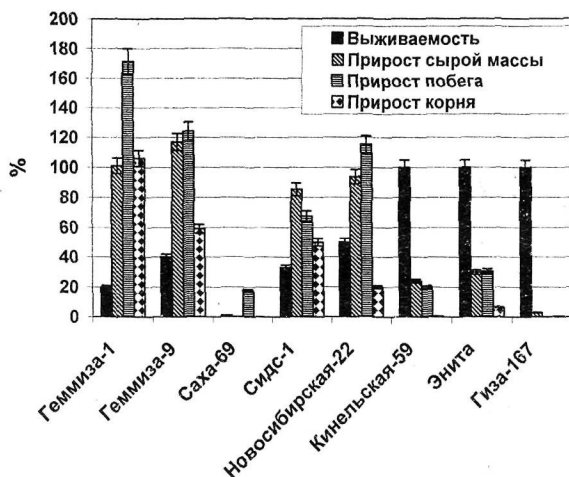


Рисунок 1. Выживаемость и прирост растений пшеницы после двухнедельного культивирования в среде с кадмием.

На основании полученных данных можно заключить, что при выращивании в водной культуре концентрация кадмия 300 мкМ является летальной для растений пшеницы сорта Саха-69 и сублетальной для растений всех остальных сортов. В дальнейшем она была использована для тестирования полученных после клеточной селекции растений.

### ***Морфогенетическая способность каллусных тканей разных сортов пшеницы***

Методы биотехнологии, такие как клеточная селекция и генетическая инженерия, предусматривают использование культивируемых тканей и последующую регенерацию растений. Поэтому очень важно, чтобы клетки после манипуляций *in vitro* сохраняли способность к морфогенезу.

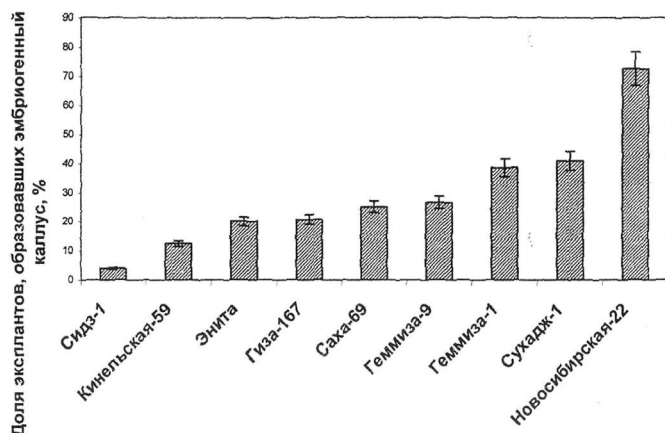


Рисунок 2. Частота образования эмбриогенного каллуса зрелыми зародышами разных сортов пшеницы

С целью выбора пшеницы, пригодной для проведения клеточной селекции, была оценена способность к образованию эмбриогенного каллуса исследуемых сортов. Анализ частоты образования эмбриогенного каллуса показал большие различия между сортами (Рис.2). Среди исследуемого материала можно выделить сорта, которые в использованных стандартных условиях культивирования показали высокую (Новосибирская-22), среднюю (Энита, Гиза-167, Саха-69, Гиммеза-1, Гиммеза-9, Сухадж-1) и низкую (Кинельская-59, Сидс-1) способность к эмбриогенезу.

Проведение клеточной селекции и отбор трансформированных каллусов требует продолжительного культивирования тканей. Поэтому важно было оценить, у каких сортов каллус остается эмбриогенным достаточно долго. Долю каллусов с эмбриогенными секторами оценивали после одного, трех и четырех месяцев культивирования. С увеличением возраста культуры доля эмбриогенных каллусов сокращалась у всех сортов. Через три месяца доля способных к регенерации растений каллусов уменьшилась в зависимости от сорта на 6-19%. Через четыре месяца эмбриогенные ткани составляли только 2-8% от общего числа каллусов. На основании проведенных экспериментов

для дальнейшей работы были выбраны сорта, зародыши которых образовывали эмбриогенный каллус с большей частотой и культивируемые ткани дольше сохраняли способность к морфогенезу *in vitro*: Новосибирская-22, Энита, Гемиза-1 и Саха-69.

### ***Получение устойчивых к кадмию клеточных линий и регенерация из них растений***

Для определения чувствительности клеток пшеницы к ионам кадмия и выбора селективной концентрации каллусы инкубировали на средах с разным содержанием хлорида кадмия. При выращивании каллуса на среде без кадмия, выживаемость клеток составляла 100%. Инкубация культивируемых тканей на среде со 100 мкМ  $\text{CdCl}_2$  в течение одного месяца мало повлияла на жизнеспособность клеток: доля выживших каллусов у всех сортов была выше 80%. Повышение концентрации кадмия до 200 мкМ вызвало гибель части каллусов (Табл. 1), но доля выживших оставалась довольно высокой. Концентрация кадмия 300 мкМ оказалась летальной для каллусных тканей всех проанализированных сортов пшеницы.

Таблица 1. Влияние кадмия на выживаемость и способность к морфогенезу каллусных тканей пшеницы.

| Сорт             | Доля живых каллусов, % |               |               | Доля эмбриогенных каллусов, % |            |
|------------------|------------------------|---------------|---------------|-------------------------------|------------|
|                  | 100<br>мкМ Cd          | 200<br>мкМ Cd | 300<br>мкМ Cd | 100 мкМ Cd                    | 200 мкМ Cd |
| Саха-69          | 82,5                   | 55,0          | 0             | 29,4                          | 17,5       |
| Гиммеза-1        | 81,2                   | 75,0          | 0             | 12,0                          | 0,0        |
| Энита            | 82,4                   | 65,7          | 0             | 28,7                          | 23,0       |
| Новосибирская-22 | 81,3                   | 70,8          | 0             | 22,8                          | 12,4       |

Поскольку целью работы было получение растений, важно было подобрать такую селективную концентрацию, при которой еще сохранялась способность к морфогенезу. На среде со 100 мкМ кадмия доля эмбриогенных каллусов варьировала у разных сортов от 12 до 30%. Инкубация на среде с 200 мкМ кадмия привела к уменьшению доли эмбриогенных каллусов в полтора-два раза, а культивируемые ткани сорта Гиммеза-1 полностью утратили способность к морфогенезу (Табл.1). Если исходить из влияния кадмия на регенерационную способность каллусов, то селективной можно считать концентрацию 100 мкМ.

### *Получение устойчивых к кадмию клеточных линий и регенерация из них растений*

Для получения устойчивых каллусов был выбран метод селекции с постепенным повышением концентрации селективного фактора. Культивируемые ткани сначала помещали на среду со 100 мкМ  $\text{CdCl}_2$ , затем после месяца культивирования каллусы, оставшиеся эмбриогенными, переносили или на среду для регенерации растений, или на среду для роста каллуса с 200 мкМ кадмия. Выжившие при 200 мкМ ткани пересаживали на среду с 300 мкМ тяжелого металла. Хотя были отобраны каллусы, сохранявшие способность к росту при концентрации кадмия 200 мкМ, регенеранты были получены только после отбора на среде со 100 мкМ кадмия. От сортов Энита, Саха-69 и Геммиза-1 было получено по одному растению. Они были обозначены: Энита-R100; Геммиза-R100 и Саха-R100.

Учитывая сильное подавление кадмием морфогенеза, в других опытах отбор проводили на стадии укоренения растений. Культивирование каллуса и регенерацию побегов проводили на среде без кадмия, а в среду для укоренения добавляли 300 мкМ. Отбирали выжившие и укоренившиеся побеги. Этим способом было получено еще одно растение сорта Гемиза, обозначенное Геммиза-R300.

### Характеристика потомства $R_1$ растений-регенерантов

После двухнедельной инкубации в питательном растворе с 50 мкМ  $\text{CdCl}_2$  по длине надземной части и корней проростков не было выявлено достоверных отличий растений  $R_1$  от контрольных (Рис.10). Потомство регенеранта сорта Энита (Энита- $R_1$ 100) достоверно превосходило исходные растения по сырой и сухой массе (Рис.3). Растения  $R_1$  сорта Геммиза-1 (GR<sub>1</sub>100), наоборот, были меньше исходных растений.

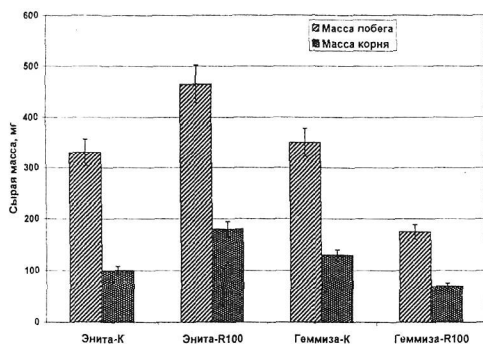


Рисунок 3. Средняя сырая масса исходных растений (К) и растений  $R_1$  после двухнедельного культивирования в среде с 50 мкМ  $\text{CdCl}_2$ .

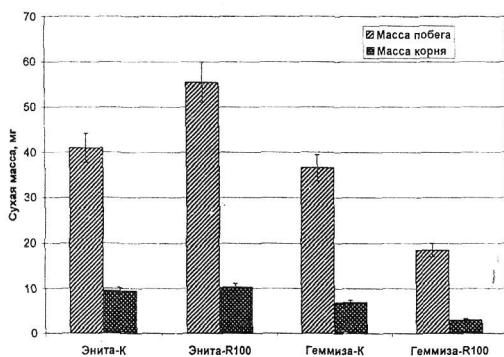


Рисунок 4. Средняя сухая масса исходных растений (К) и растений  $R_1$  после двухнедельного культивирования в среде с 50 мкМ  $\text{CdCl}_2$ .

Проростки, выращенные из семян регенеранта Геммиза-R<sub>0</sub>300 инкубировали в более жестких условиях: концентрация хлорида кадмия в питательном растворе составляла 300 мкМ. После двух недель культивирования в этих условиях был отмечен более быстрый рост растений Геммиза-R<sub>1</sub>300 по сравнению с исходными. Прирост надземной части и корня составил у исходных растений, соответственно, 39,5 и 8,3%, а у растений Геммиза-R<sub>1</sub>300 – 48,0 и 24,8%.

Регенеранты сорта Саха-69 образовали мало семян, поэтому в поколении R<sub>1</sub> не были проанализированы.

У потомков регенерантов обоих сортов в питательном растворе с кадмием происходило увеличение содержания пролина в листьях. Начиная с первого дня культивирования в стрессовых условиях, содержание пролина в листьях растений R<sub>1</sub> сорта Энита было в 2-3 раза больше, чем в листьях исходных растений. Такая разница сохранилась и после двух недель культивирования в присутствии кадмия. В растениях R<sub>1</sub> сорта Геммиза-1 концентрация пролина в первые три дня была меньше, чем у исходных растений. Но в конце двухнедельной инкубации уровень пролина у исходных растений резко понизился, а у растений Геммиза-R<sub>1</sub>100 сохранился на довольно высоком уровне (Рис.5).

У растений Геммиза-R<sub>1</sub>300 содержание пролина в конце двухнедельной инкубации анализировали у каждого растения. У всех проростков из потомства толерантного регенеранта в листьях было отмечено более высокое содержание пролина, чем у исходных растений. У некоторых растений превышение достигало 20 раз.

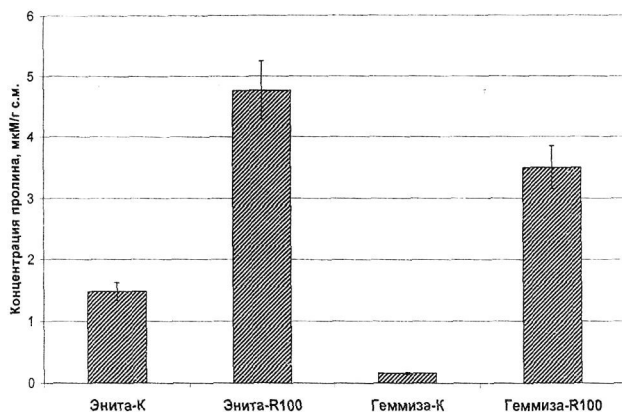


Рисунок 5. Содержание пролина в листьях исходных растений (К) и растений R1 после двухнедельного культивирования в среде с 50 мМ CdCl<sub>2</sub>.

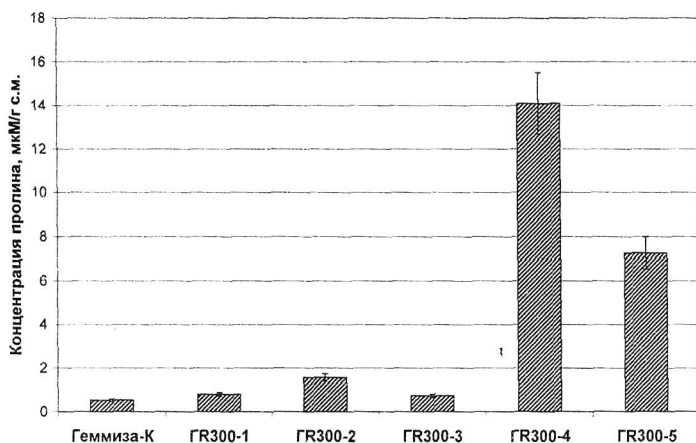


Рисунок 6. Содержание пролина в листьях исходных растений сорта Геммиза-1 и в растениях Геммиза-R<sub>1</sub>300.

Известно, что кадмий негативно влияет на фотосинтез, подавляя, в частности, биосинтез хлорофилла. Анализ фотосинтетических пигментов у исходных растений и растений из потомства толерантных регенерантов показал, что в листьях растений Энита-R<sub>1</sub>100 концентрация хлорофилла а и

хлорофилла *b* была в полтора раза выше, чем у исходных растений. Содержание фотосинтетических пигментов в листьях растений Геммиза- $R_1100$  было таким же, как у исходных растений этого сорта.

По результатам исследования первого поколения потомства регенерантов можно сказать, что растения Энита- $R_1100$  и Геммиза- $R_1300$ , полученные после клеточной селекции, показали несколько более высокую степень устойчивости, чем исходные растения. Выявлены существенные различия между контрольными и опытными растениями обоих сортов по накоплению пролина в стрессовых условиях.

### *Характеристика потомства $R_2$ растений-регенерантов*

Во втором поколении рост и другие параметры оценивали после двухнедельного культивирования в среде с  $300 \text{ мкМ CdCl}_2$ . Существенное увеличение устойчивости к кадмию после клеточной селекции было отмечено для растений сорта Саха-69. Растения сорта Саха-69 были самыми чувствительными к тяжелому металлу из всех проверенных. При культивировании в среде, содержащей  $300 \text{ мкМ}$  хлорида кадмия, все исходные растения погибли. В этих условиях у растений Саха- $R_2100$  при стопроцентной выживаемости увеличение длины побега за две недели составило 57%, длины корня – 42% и биомассы – 8,6%. Проростки Геммиза- $R_2100$ , как и в первом поколении, не превосходили исходные растения по показателям роста.

Проверку растений  $R_2$  сорта Энита проводили в нормальных условиях и при концентрации кадмия в среде  $300 \text{ мкМ}$ . У растений, не подвергавшихся селекции, при культивировании в среде с кадмием прирост биомассы уменьшился почти вдвое по сравнению с приростом в среде без кадмия. А у растений Энита- $R_2100$  прирост биомассы в присутствии и в отсутствии кадмия был почти одинаковым. Еще сильнее были различия между увеличением высоты побега: у растений без селекции добавление в среду

кадмия вызвало уменьшение прироста в 3,5 раза, а у растений, полученных после клеточной селекции, в 2 раза.

Все растения  $R_2$  сортов Энита и Саха-69 превосходили в стрессовых условиях контрольные растения по концентрации пролина, у некоторых растений эта разница достигала 10 раз. Если у сорта Энита повышенное накопление пролина было отмечено, главным образом, в листьях, то у сорта Саха-69 и в листьях, и в корнях. У сорта Геммиза-1 отличия опытных растений от контрольных не были выявлены.

В целом при анализе следующего поколения подтвердилась более высокая устойчивость растений сортов Энита и Саха-69, полученных после клеточной селекции. Сохранилась положительная корреляция между уровнем внутриклеточного пролина и толерантностью растений.

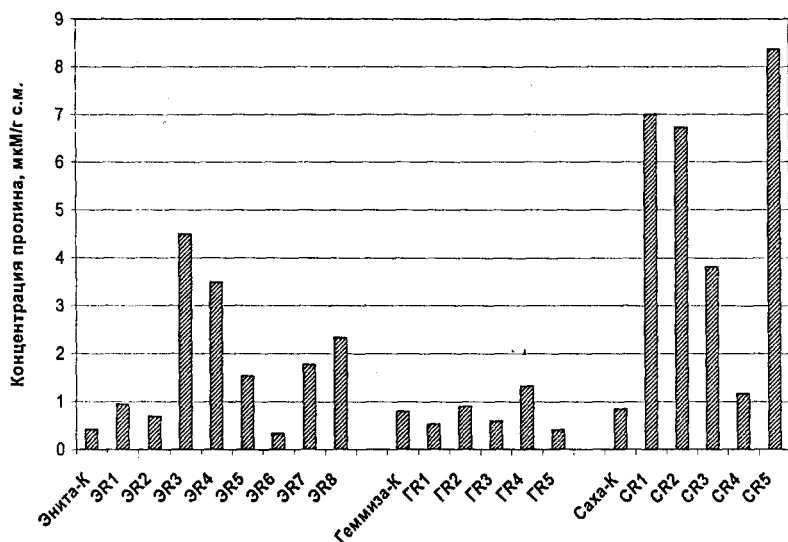


Рисунок 7. Содержание пролина в листьях после инкубации в течение двух недель в присутствии 300 мкМ  $\text{CdCl}_2$ .

### *Определение роли пролина в обеспечении толерантности к кадмию.*

Среди обнаруженных отличий наиболее существенными были различия по содержанию пролина. Чтобы ответить на вопрос, является ли повышение уровня пролина причиной толерантности к кадмию, исследовали реакцию на этот ТМ растений пшеницы, трансформированных геном пролиндегидрогеназы в антисмысловой ориентации и содержащих вследствие этого больше пролина.

Присутствие введенной последовательности в геноме пшеницы было подтверждено методом ПЦР. В контрольных условиях уровень свободного пролина мало различался у трансгенных и нетрансгенных растений. После выращивания в условиях стресса у контрольных растений количество пролина практически не изменилось, в то время как у трансгенных растений количество пролина возросло в 8 раз. Это показывает, что введенный в растения пшеницы ген пролиндегидрогеназы работает.

Влияние хлорида кадмия оценивали по росту и продуктивности растений в почве, содержащей кадмий. Учитывая малую доступность металла в почве, была выбрана высокая концентрация 160 мг/кг почвы.

Действие кадмия выражалось в изменении фенотипа растений (высыхание нижних листьев, ранее пожелтение). При данных концентрациях кадмия ни трансгенные, ни контрольные растения не погибли и дали семена. На стадии цветения растений были определены морфологические показатели. Трансгенные растения превосходили контрольные по среднему числу колосьев на растение, по среднему числу зерен на растение и среднему весу 100 зерен (Табл.2).

Опыты с трансгенными растениями подтвердили существенную роль пролина в обеспечении устойчивости к кадмию.

Таблица 2. Влияние кадмия на трансгенные и контрольные растения пшеницы.

| Вариант                   | Число побегов на растение | Число колосьев на растение | Максим. длина корня, см | Число зерен |             | Вес 100 зерен (г) |
|---------------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------|-------------|-------------------|
|                           |                           |                            |                         | на колос    | на растение |                   |
| Контр., среднее           | 2,0±0,2                   | 1,5±0,2                    | 23,3±2,4                | 20,1±2,1    | 29,3±3,0    | 1,23±0,2          |
| Трансг. растения, среднее | 2,3±0,2                   | 2,0±0,2                    | 23,6±2,4                | 19,3±2,0    | 38,5±3,9    | 1,73±0,3          |
| Тр.1                      | 3                         | 2                          | 25,0                    | 21,5        | 43          | 1,93              |
| Тр.2                      | 3                         | 3                          | 21,0                    | 19,3        | 58          | 1,63              |
| Тр.3                      | 3                         | 2                          | 20,0                    | 25,0        | 50          | 2,34              |
| Тр.4                      | 2                         | 2                          | 30,0                    | 17,5        | 35          | 1,74              |
| Тр.5                      | 2                         | 2                          | 33,0                    | 13,5        | 27          | 1,66              |
| Тр.6                      | 1                         | 1                          | 17,0                    | 21,0        | 21          | 1,47              |
| Тр.7                      | 2                         | 2                          | 23,0                    | 13,5        | 27          | 1,33              |
| Тр.8                      | 2                         | 2                          | 20,0                    | 23,5        | 47          | 1,74              |

### *Характеристика антиоксидантной системы толерантных к кадмию растений*

Стрессовые условия, в том числе и присутствие в среде кадмия, вызывают образование избытка свободных радикалов. Одной из функций пролина является защита клеток от окислительного стресса [Кузнецов, Шевякова, 1999]. На примере растений, полученных путем клеточной селекции от сорта Энита, было проведено сравнение активности антиоксидантной системы у чувствительных и толерантных растений. У исходных и отселектированных (Энита R<sub>2</sub>100) растений после культивирования в течение двух недель в среде с 300 мкМ CdCl<sub>2</sub> и без кадмия определяли степень перекисного окисления липидов по накоплению малонового диальдегида (МДА), а также активность ферментов

супероксиддисмутазы (СОД) и пероксидазы. У исходных растений под действием кадмия количество МДА возросло в листьях и корнях в полтора раза. У растений Энита R<sub>2</sub>100 количество МДА в листьях в присутствии кадмия увеличилось только на 20%, а в корнях не изменилось по сравнению с растениями, культивируемыми в среде без кадмия. Вероятно, толерантные к кадмию растения, содержащие больше пролина, оказались более устойчивыми к окислительному стрессу.

У растений Энита R<sub>2</sub>100 в условиях стресса отмечено также более выраженное, чем у исходных растений, усиление активности СОД и связанной пероксидазы в листьях (Табл.3). У отдельных растений активность ферментов возрастала в присутствии кадмия более, чем в два раза. Возможно, пролин оказывает защитное действие на молекулы этих ферментов.

Таблица 3. Активность СОД и пероксидазы в листьях растений пшеницы.

| Вариант                                                             | Энита-К   |            | Энита-R <sub>2</sub> 100 |            |
|---------------------------------------------------------------------|-----------|------------|--------------------------|------------|
| Концентрация Cd, мкМ                                                | 0         | 300        | 0                        | 300        |
| Активность СОД,<br>ед.активности/мг белка                           | 74,2±8,4  | 100,8±12,3 | 77,9±8,9                 | 123,3±10,8 |
| Активность<br>своб.пероксидазы,<br>ммоль гваякола/мг<br>белка ' мин | 1,39±0,16 | 3,77±0,53  | 1,37±0,17                | 2,27±0,21  |
| Активность<br>связ.пероксидазы, ммоль<br>гваякола/мг белка ' мин    | 4,72±0,61 | 6,41±0,85  | 3,79±0,56                | 5,50±0,76  |

### *Аккумуляция кадмия чувствительными и толерантными растениями*

При выращивании сельскохозяйственных растений на полях, загрязненных тяжелыми металлами, возникает опасность накопления токсикантов в тканях растений и последующего попадания металлов в организм человека. Есть данные, что повышение устойчивости к кадмию может сопровождаться усилением поступления этого металла в растения [Zhang et al., 2006]. В связи с этим было определено содержание кадмия в различных органах исходных и толерантных растений пшеницы после выращивания в присутствии кадмия.

У растений, инкубированных в водной культуре в среде с 300 мкМ  $\text{CdCl}_2$  в течение двух недель, кадмий был обнаружен в корнях и в листьях. Корни предварительно не отмывали, так что полученное содержание, вероятно, отражает сумму ионов металла внутри и на поверхности корней. Общее содержание кадмия у полученных после селекции образцов было в два раза меньше, чем у исходных. У растений из потомства регенерантов (Энита R<sub>2</sub>100 и Геммиза-1 R<sub>2</sub>100), было показано увеличение содержания кадмия в листьях и уменьшение его в корнях. Отличие от исходных растений по характеру распределения металла по органам было сильнее выражено у толерантных к кадмию растений Энита R<sub>2</sub>100.

Таблица 4. Содержание кадмия в тканях растений после инкубации в присутствии 300 мкМ  $\text{CdCl}_2$  (мкг/г сухого веса).

|                              | Лист | Корень |
|------------------------------|------|--------|
| Геммиза-1 - контроль         | 84   | 2775   |
| Геммиза-1 R <sub>2</sub> 100 | 101  | 1305   |
| Энита – контроль             | 50   | 2750   |
| Энита R <sub>2</sub> 100     | 131  | 1026   |

У трансгенных растений, выращенных в почве, накопление кадмия оценивали после созревания семян в листьях и зерновках. Общее количество аккумулированного металла было существенно меньше по сравнению с растениями из водной культуры. Вероятно, в почве кадмий связывается с ее элементами, и его поглощение затруднено. Как и в случае растений, полученных после клеточной селекции, более толерантные трансгенные растения накапливали больше ионов металла в листьях по сравнению с нетрансгенными. Вместе с тем в зерновках трансгенных растений концентрация кадмия была в два раза меньше, чем у контрольных образцов (Рис.8). Вероятно, повышение уровня эндогенного пролина, влияет и на степень накопления тяжелого металла, и на характер его распределения по растению.

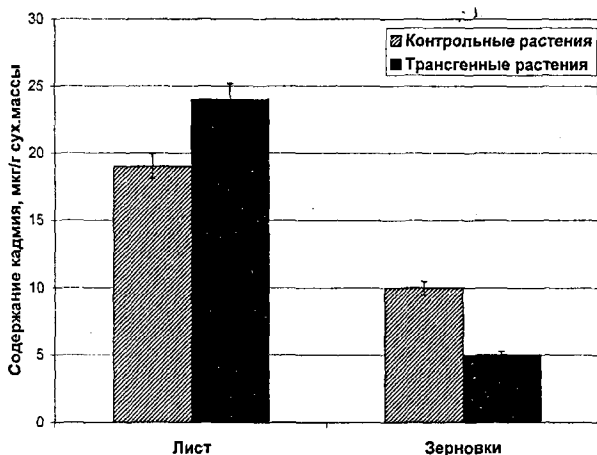


Рисунок 8. Содержание кадмия в трансгенных и контрольных растениях.

### Заключение

В результате проведенной работы показана возможность применения метода клеточной селекции для получения растений пшеницы с повышенной толерантностью к ионам кадмия. Были отобраны растения, которые по

параметрам роста и ряду физиологических признаков обладали более высокой устойчивостью к кадмию по сравнению с исходными растениями. Показана наследуемость толерантности, что свидетельствует о мутационной природе изменения. Менее чувствительные к кадмию растения характеризовались более высоким содержанием пролина в листьях и иногда в корнях. В присутствии кадмия растения, полученные путем клеточной селекции, меньше страдали от окислительного стресса, чем исходные. Повышенный уровень пролина можно рассматривать как одну из причин увеличения толерантности отобранных растений. Полученные толерантные растения являются удобной моделью для изучения механизмов устойчивости к кадмию.

## ВЫВОДЫ

1. Определена чувствительность к хлориду кадмия нескольких сортов пшеницы российской и египетской селекции. По реакции на кадмий сорта можно разделить на две группы: для первой группы (Кинельская-59, Энита, Гиза-167) характерна высокая выживаемость и торможение роста, что можно рассматривать как адаптивную реакцию, а для вторых (Гиммеза-1, Гиммеза-9, Сидз-1, Новосибирская-22) на фоне гибели большинства растений отмечен активный рост выживших. Вероятно сорта второй группы неоднородны и включают как чувствительные, так и устойчивые растения.
2. Установлены ингибирующие рост и сублетальные концентрации кадмия для растений и каллусных тканей пшеницы. В водной культуре сублетальной является концентрация 300 мкМ кадмия. Сублетальной концентрацией для культивируемых тканей является 100 мкМ.
3. Отмечены существенные различия между сортами по способности их тканей к морфогенезу *in vitro*. Отобраны сорта с наибольшей способностью к регенерации растений (Новосибирская-22, Энита,

Гиммеза-1 и Саха-69) и, следовательно, обладающие бóльшим биотехнологическим потенциалом.

4. Методом клеточной селекции получены регенеранты сортов Энита, Гиммеза-1 и Саха-69, более толерантные к кадмию, чем исходные растения. В двух поколениях показано наследование признака устойчивости.
5. Толерантные растения в присутствии кадмия отличались от исходных более высоким содержанием пролина и фотосинтетических пигментов, а также были менее чувствительны к окислительному стрессу.
6. Трансгенные растения пшеницы с увеличенным содержанием эндогенного пролина характеризовались большей продуктивностью и меньшим накоплением кадмия в зерновках в присутствии кадмия по сравнению с контрольными растениями.
7. На примере полученных после клеточной селекции и трансгенных растений показано, что повышение уровня эндогенного пролина способствовало увеличению устойчивости растений к кадмию и влияло на поглощение и транспорт по растению ионов металла.

#### Список работ, опубликованных по материалам диссертации

1. Мохамед С.Е., Соловьёва А.И., Долгих Ю.И. Оценка биотехнологического потенциала различных сортов пшеницы // Вестник РУДН, сер. Агрономия и животноводство, 2009, № 4, с.21-26.
2. Мохаммед С.Е., Каранова С.Л., Долгих Ю.И. Получение толерантных к ионам кадмия клеточных линий и растений пшеницы методом клеточной селекции. Материалы Всероссийской конференции «Современные аспекты структурно- функциональной биологии растений и грибов», 23-25 сентября 2010, Орел, с. 155-159.
3. Степанова А.Ю., Мохаммед, Осипова Е.С., Терешонок Д.В., Долгих Ю.И. Получение и характеристика растений пшеницы, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы. Тезисы III

Всероссийского симпозиума «Физиология трансгенного растения и фундаментальные основы биобезопасности», Москва, 2010, с.77.

*Отпечатано с готового оригинал-макета*

Формат 60x84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Усл. печ. л. 1,4 Тираж 100 экз. Заказ 729

Издательство РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева  
127550, Москва, ул. Тимирязевская, 44