

Вместе  
08

На правах рукописи

**ВОЛКОВ Кирилл Сергеевич**

**АДАПТАЦИЯ К ДЕЙСТВИЮ ПОВЫШЕННЫХ  
КОНЦЕНТРАЦИЙ МЕДИ И ЦИНКА И ВОЗМОЖНОСТЬ  
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ФИТОРЕМЕДИАЦИИ РАСТЕНИЙ**

*Mesembryanthemum crystallinum* L.

03.00.12. – физиология и биохимия растений

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

МОСКВА - 2006

Работа выполнена в Лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук

Холодова Валентина Павловна

**Официальные оппоненты:**

Доктор биологических наук,  
профессор

Кондратьев Михаил Николаевич

Кандидат биологических наук

Серегин Илья Владимирович

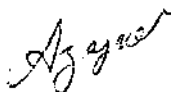
Ведущее учреждение – Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет.

Защита диссертации состоится 30 мая 2006 г. в 15.00 часов на заседании диссертационного совета К 002.210.01 при Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35  
Факс (495) 977 8018, email: ifr@ippras.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан « 27 » апреля 2006 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность.** Проблема повышенного содержания тяжелых металлов (ТМ) в окружающей среде с каждым годом приобретает все большую актуальность. В настоящее время проблемными с точки зрения превышения допустимых концентраций различных ТМ являются не только участки, прилежащие к крупным магистралям, но и рекреационные территории в крупных мегаполисах, а также сельскохозяйственные угодья. В связи с этим представляется крайне необходимым проведение исследований, направленных на изучение влияния высоких концентраций ТМ на растения и формирование у последних адаптационных механизмов, позволяющих выживать в экстремальных условиях.

Полученные в таких исследованиях данные представляют большой интерес как для понимания общих механизмов устойчивости к экстремальным воздействиям, так и с практической точки зрения, поскольку устойчивые виды, способные не только расти в присутствии повышенных концентраций ТМ, но и накапливать их в надземных органах, могут в дальнейшем использоваться в целях фиторемедиации, - одной из наиболее перспективных стратегий очистки загрязненных территорий от поллютантов (Cunningham and Ow, 1996; Gleba et al., 1999; Lasat, 2002).

Факультативный галофит *Mesembryanthemum crystallinum* L. (хрустальная травка) уже длительное время используется в качестве модели для изучения механизмов адаптации к экстремальным условиям, однако, к настоящему времени не проведено систематического изучения адаптации растений хрустальной травки к действию ТМ. В исследованиях Н.И. Шевяковой с соавт. (2003) было показано, что относительная устойчивость растений *M. crystallinum* к кадмию сопряжена со слабым поступлением этого ТМ в надземные органы. Напротив, в исследовании Thomas et al. (1998) была установлена возможность роста растений хрустальной травки при чрезвычайно высоких концентрациях солей меди в среде (до 8 мМ), что сопровождалось накоплением ионов меди в

листьях. Однако, несмотря на то, что авторы ограничились лишь кратковременными опытами, это не помешало им заявить о возможности использования *M. crystallinum* в целях фиторемедиации загрязненных медью территорий.

В последнее время немало внимания уделяется изучению механизмов адаптации растений к комплексному действию стрессорных факторов и явлению так называемой кросс-адаптации - способности растений повышать устойчивость к данному фактору в результате адаптации к фактору иной природы. Однако, вопрос о том, сопровождается ли адаптация растений к засолению увеличением толерантности к ТМ, остается в настоящее время открытым. Вместе с тем, понимание механизмов адаптации растений к комбинированному действию хлоридного засоления и ТМ представляет помимо теоретического и немалый практический интерес, - зачастую загрязнение ТМ сопровождается и повышенным уровнем солей в почве. В особенности это характерно для территорий, прилегающих к магистралям - одного из главнейших объектов фиторемедиации в крупных мегаполисах.

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящей работы являлось изучение воздействия на растения хрустальной травки солей меди и цинка, а также комплекса стрессорных факторов, в частности меди и хлоридного засоления, изучение механизмов адаптации к данным стрессорам, оценка возможности использования растений в фиторемедиации.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Выяснить диапазоны концентраций серноокислых солей меди и цинка, в которых растения хрустальной травки сохраняют способность к нормальному прохождению онтогенетического цикла.

2. Исследовать изменение основных параметров водного статуса растений при действии меди и цинка, а также выяснить, сопровождаются ли такие изменения стресс-индуцированным формированием важного водосберегающего механизма *M. crystallinum* - САМ-типа фотосинтеза.

3. Оценить интенсивность индуцируемого солями меди и цинка у растений *M. crystallinum* окислительного стресса.

4. Выяснить, приводит ли воздействие на растения хрустальной травки солей меди и цинка к активации экспрессии генов металлотионеинов – основной группы хелатирующих данные ТМ пептидов растений.

5. Исследовать особенности адаптации растений *M. crystallinum* к совместному действию меди и хлористого натрия.

6. Проследить изменение основных физиологических параметров растений *M. crystallinum* при комплексном действии солей меди и засоления и дать ответ на вопрос, является ли хрустальная травка пригодной для фиторемедиации территорий, подвергнутых одновременно засолению и загрязнению ТМ.

**Научная новизна.** Впервые показана высокая степень устойчивости растений *M. crystallinum* к солям цинка на стадии проростков. Впервые показана возможность функционирования САМ-типа фотосинтеза у растений хрустальной травки при действии ТМ. Экспериментально доказано, что ТМ-индуцированный окислительный стресс у растений *M. crystallinum* не сопровождается нарушением барьерных свойств основных клеточных мембран. Впервые обнаружена индукция ионами меди и цинка экспрессии генов металлотионеинов у растений *M. crystallinum*. Впервые проведено изучение особенностей формирования адаптации растений хрустальной травки к меди при совместном действии с хлористым натрием. Установлено, что адаптация растений к избыточному засолению сопровождается снижением токсического эффекта меди и что важную роль в этом процессе играет способность растений к повышенной аккумуляции пролина.

**Практическая значимость.** Полученные в работе теоретические данные об особенностях действия солей цинка и меди на изменение параметров водного статуса, формирование САМ и окислительного стресса у растений, а также о механизмах устойчивости как к ТМ, так и к комплексному действию факторов, имеют существенное значение для выяснения хода формирования адаптивных процессов у галофитов и при разработке технологии создания трансгенных растений с повышенной устойчивостью. Растения *M. crystallinum* могут быть рекомендованы для фиторемедиации территорий с комплексным загрязнением. Теоретические обобщения и совокупность полученных

экспериментальных данных может использоваться в курсах лекций для студентов биологических факультетов ВУЗов страны.

**Апробация работы.** Результаты исследований докладывались на международной конференции «Aral Sea Basin Conference» (Бухара, 2003), на V Съезде общества физиологов растений России и Международной конференции «Физиология растений – основа фитобиотехнологии» (Пенза, 2003), на годичном собрании физиологов растений России и Международной научной конференции «Проблемы физиологии растений севера» (Петрозаводск, 2004), на международной конференции «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия» (Вологда, 2005).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 8 работ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследований, изложения полученных результатов, обсуждения, заключения и выводов. Работа изложена на 132 страницах машинописного текста, включая 6 таблиц, 28 рисунков; библиография содержит 131 названий, в т.ч. 111 на иностранных языках.

## ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследований являлись растения *M. crystallinum* L. - дикорастущего факультативного галофита семейства *Mesembryanthemaceae*, происходящего из намибийской пустыни Южной Африки.

Растения хрустальной травки выращивали в водной культуре в камере фитотрона при дневной и ночной температурах 23-25°C и 18-20°C соответственно. Продолжительность фотопериода составляла 12 часов при интенсивности освещения 350 мкмоль/м<sup>2</sup>с натриевыми лампами ДНаЗ (фирма Reflux, Россия). Посев семян производили в кюветы с перлитом. В возрасте 4-5 недель по 3 растения высаживали в стеклянные сосуды емкостью 2 литра на модифицированную питательную среду Johnson (Winter, 1973) с железом в нитратной форме. Соли меди (10-100 мкМ) или цинка (50-800 мкМ) вносили в

питательную среду по достижении растениями стадии 3 – 4 пар первичных листьев.

Для определения влияния ТМ на прорастание семена хрустальной травки, предварительно обработанные 0,1% раствором марганцовокислого калия, по 100 штук помещали на фильтровальную бумагу в стерильные чашки Петри, содержавшие питательный раствор Johnson. В чашки Петри вносили сернокислые соли меди или цинка в концентрациях до 200 мкМ и 6000 мкМ, соответственно. Проращивание проводили в тех же условиях, которые использовали для роста опытных растений; всхожесть оценивали на 7-й день.

**Измерение свежей и сухой массы** отдельных органов растения (листьев и стеблей) и **содержания в них воды** проводили стандартным весовым методом. **Интенсивность транспирации** оценивали гравитационным методом и выражали ее в  $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{св. массы} \cdot \text{ч}^{-1}$  или  $\text{мг} \cdot \text{дм}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$ . Для **определения осмотического потенциала клеточного сока** гомогенат листьев центрифугировали при 5000g в течение 15 минут на центрифуге KM-15200 фирмы «Kubota» (Япония) и измеряли осмотический потенциал на осмометре Osmomat 030 фирмы «Gonotec». О переходе на САМ-тип фотосинтеза и его интенсивности судили по величине титруемой кислотности клеточного сока листьев. **Содержание свободного пролина** определяли с помощью кислого нингидринового реактива (Bates et al., 1973). Интенсивность окраски измеряли при 520 нм на спектрофотометре СФ-46 (фирма «ЛЮМО», Россия). Для калибровки использовали пролин фирмы «Sigma» (США). **Барьерные свойства мембран** оценивали по степени выхода (утечки) электролитов после тестирующего высокотемпературного воздействия.

**Содержание хлорофилла** в листьях хрустальной травки определяли после экстракции пигментов этиловым спиртом по Шлыку (1971). Приготовление проб для **определения содержания меди и цинка** в тканях растений проводили путем мокрого озоления по методу Голубкиной (1995). Концентрацию ТМ измеряли на атомно-абсорбционном спектрофотометре Hitachi-207 фирмы «Hitachi» (Япония). **Перекисное окисление липидов** оценивали по концентрации малонового диальдегида (МДА) (Heath and Parker,

1968). Определение активности растворимой и ион-связанной пероксидаз проводили по Ridge and Osborne (1971), используя в качестве субстрата  $H_2O_2$ , а в качестве донора водорода - гваякол ('Fluka', Швейцария). Содержание белка определяли по методу Bradford (1976), используя для калибровки бычий сывороточный альбумин фирмы «Sigma» (США).

Оценку уровня экспрессии генов металлотиионеинов проводили методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Тотальную РНК из образцов выделяли фенольным методом, препарат РНК обрабатывали ДНКазой, после чего проводили фенольную депротеинизацию. Обратную транскрипцию проводили в соответствии с инструкцией фирмы "Fermentas", применив oligo(dT)21 VN в качестве затравки. ПЦР осуществляли с использованием Tag-ДНК-полимеразы. Последовательность нуклеотидов генов металлотиионеинов и контрольного гена актина были взяты на сайте [www.tigr.org](http://www.tigr.org) (The Institute for Genomic Research).

Каждый опыт проводили не менее 3 - 4 раз. Анализы выполняли в 3-х биологических повторностях. В таблицах представлены средние величины и значения НСР при 95% уровне вероятности. Бары на рисунках обозначают стандартные отклонения от среднего.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Адаптация растений хрустальной травки к действию меди и цинка.

Оценка влияния солей меди и цинка на *прорастание* семян *M. crystallinum* показала их довольно высокую устойчивость к действию этих ТМ не только на стадии прорастания, но и в процессе роста проростка в течение семи дней.  $CuSO_4$  в диапазоне концентраций от 10 до 50 мкМ не только не ингибировала прорастание, но оказывала некоторое стимулирующее действие (при 25 мкМ). Достоверное снижение всхожести семян наблюдалось при 100 мкМ и более высоких концентрациях  $CuSO_4$ . Значительно большую устойчивость показала хрустальная травка по отношению к  $ZnSO_4$ , негативное действие которого проявилось лишь при концентрации 6000 мкМ.



Иная картина была обнаружена при *длительном выращивании* растений в присутствии ТМ. Оказалось, что растения хрустальной травки не были способны адаптироваться к концентрациям меди выше 100 мкМ, а цинка – выше 1000 мкМ, погибая через несколько дней действия ТМ. В дальнейшей работе соли меди вносили в питательный раствор в концентрациях 10 - 100 мкМ, а цинка – 150 - 800 мкМ.

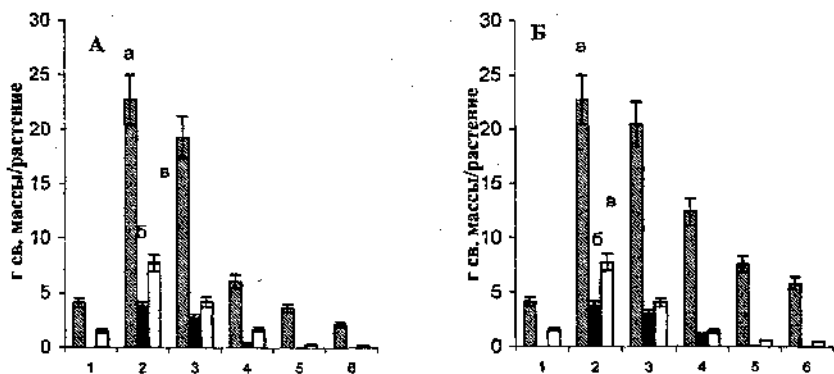


Рис. 1. Влияние 2х-недельного воздействия меди (А) и цинка (Б) на рост растений

*M. crystallinum*.

1, 2 – контрольный вариант, 1 – начало опыта, 2 – на 14-е сутки,

(А) 3-6 – CuSO<sub>4</sub>, 3 – 10 мкМ, 4 – 25 мкМ, 5 – 50 мкМ, 6 – 100 мкМ,

(Б) 3-6 – ZnSO<sub>4</sub>, 3 – 100 мкМ, 4 – 250 мкМ, 5 – 500 мкМ, 6 – 800 мкМ.

а – листья и стебель, б – боковые побеги, в – корни.

Данные по *росту растений* хрустальной травки в присутствии сернокислых солей меди и цинка представлены на рис. 1. Растения контрольного варианта за 14 суток эксперимента не только увеличили биомассу первичных листьев с 4,1 г до 23 г, но и начали формировать боковые побеги. В то же время только при минимальной из использованных концентраций меди (10 мкМ) рост и развитие растений были близки к контрольному варианту. Напротив, уже в присутствии 25 мкМ меди рост растений был очень слабым, при более высоких концентрациях биомасса растений была даже ниже исходной величины.

Хрустальная травка обнаружила способность адаптироваться к действию значительно более высоких концентраций цинка: 100 мкМ  $ZnSO_4$  лишь слегка снижал скорость роста, а 800 мкМ сильно тормозил накопление биомассы, но не блокировал развития боковых побегов.

Важно было оценить *аккумуляцию ионов меди и цинка* в надземных органах растений. Данные одного из типичных опытов по динамике поступления ТМ в листья представлены в таблице 1. Они показывают, что в контрольных растениях содержание меди составляло 15,3 мкг, цинка 30,7 мкг на 1 г сухой массы листьев. Но уже через три дня роста содержание меди увеличилось до 174 мкг, на 7-й день эксперимента достигло 215 мкг/г сухой массы листьев при максимальной использованной концентрации  $CuSO_4$  (200 мкМ). Значительно выше было накопление цинка, концентрация которого на 7-й день эксперимента превысила 1700 мкг/г сухой массы листьев (при 800 мкМ  $ZnSO_4$  в среде). При этом практически не было обнаружено достоверной разницы в аккумуляции меди и цинка при использовании в качестве аниона сульфата или хлорида (табл. 1).

Таблица 1. Накопление меди и цинка листьями растений хрустальной травки, мкг/г сухой массы

Концентрация солей, мкМ		3 дня	7 дней
Контроль	*		15,3
$CuSO_4$	50	84	125
	100	130	185
	200	174	215
$CuCl_2$	50	85	107
	100	119	147
	200	199	191
Контроль	*		30,7
$ZnSO_4$	250	181	304
	500	410	1248
	800	913	1710
$ZnCl_2$	250	210	317
	500	395	1312
	800	1023	1405
НСР <sub>0,05</sub>		23	31

\* Культуральная среда содержала 0,25 мкМ  $CuSO_4$  и 1 мкМ  $ZnSO_4$ .

Для выяснения причин сильного негативного действия ТМ на рост растений было решено исследовать влияние ТМ на некоторые физиологические

параметры. Принимая во внимание тот факт, что при внесении в питательный раствор солей ТМ (особенно меди) визуально обнаруживалось подвядание растений (падение тургора) и снижение пигментации листьев, работа была начата с оценки *показателей водного статуса* и содержания пигментов.

Оказалось, что рост растений на среде с ТМ, включая даже самые низкие из использованных концентраций меди, приводил к сильному снижению содержания воды в листьях (табл. 2). *Падение оводненности* происходило уже на ранних этапах действия меди; со временем ее негативный эффект заметно усиливался. Приведенный в табл. 2 пересчет содержания воды на сухую массу особенно отчетливо свидетельствует о нарушении водного статуса растений в присутствии меди. В отличие от меди негативное действие цинка было значительно менее выраженным.

Таблица 2. Содержание воды в листьях растений хрустальной травки

Концентрация солей, мкМ		3 дня	10 дней	3 дня	10 дней
		% от свежей массы		г Н <sub>2</sub> О/г сухой массы	
Контроль		97.11	96.83	33.60	30.64
CuSO <sub>4</sub>	15	96.43	94.97	27.01	18.95
	25	96.12	92.11	24.77	11.72
	50	94.28	89.49	16.48	8.81
ZnSO <sub>4</sub>	150	96.81	95.18	30.35	19.76
	250	96.36	95.12	26.47	19.62
	500	96.12	94.35	24.77	16.70
HCP <sub>0,05</sub>		0.45	0.53	1.5	1.2

Сернокислые соли как меди, так и, в меньшей степени, цинка вызывали резкое *ингибирование транспирации*, причем такой эффект отмечался уже при действии на растения минимальной из использованных концентраций меди. В то время как уровень транспирации контрольных растений достигал 320 мг/дм<sup>2</sup>·ч, действие 15 мкМ сернокислой меди снижало к седьмым суткам эксперимента транспирацию до 118 мг/дм<sup>2</sup>·ч. В самой высокой (50 мкМ) из использованных в данном случае концентраций, медь еще более сильно ингибировала транспирацию, которая на четырнадцатые сутки снижалась

практически в пять раз по сравнению с контрольными растениями. Действие цинка на транспирацию было менее выражено.

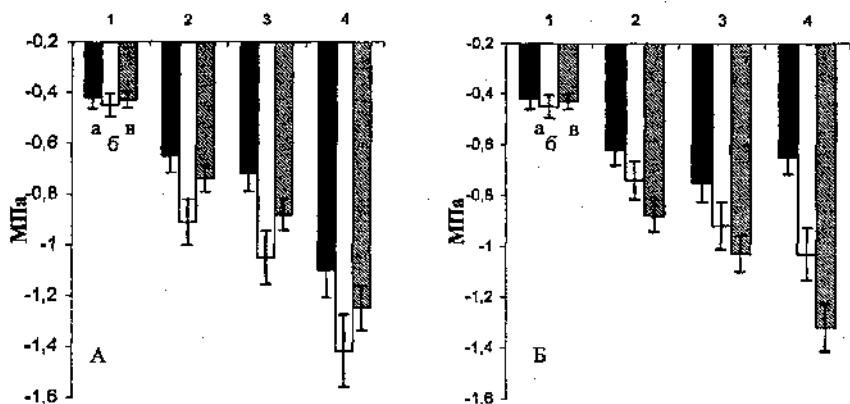


Рис. 2 Осмотический потенциал листьев растений *M. crystallinum* при действии меди (А) и цинка (Б) в течение 3 (а), 7 (б) и 14 (в) дней.

А – 1 – контроль, 2-4 –  $\text{CuSO}_4$ , 2 – 25 мкМ, 3 – 50 мкМ, 4 – 100 мкМ

Б – 1 – контроль, 2-4 –  $\text{ZnSO}_4$ , 2 – 250 мкМ, 3 – 500 мкМ, 4 – 800 мкМ

Более точно состояние водного статуса растений отражает такой показатель, как *осмотический потенциал клеточного сока* (рис. 2). Сульфат меди в концентрации 25 мкМ в течение трех дней вызывал снижение осмотического потенциала до  $-0,68$  МПа, а к седьмым суткам эксперимента он опускался до значений ниже единицы, т.е. более чем в два раза по сравнению с контрольными показателями. К самому значительному, практически трехкратному по сравнению с контролем, падению осмотического потенциала (до  $-1,58$  МПа в отдельных случаях) приводил семидневный рост растений на среде с сернокислой медью в концентрации 100 мкМ. Несколько слабее было выражено влияние на осмотический потенциал сернокислого цинка. Максимальное падение осмотического потенциала наблюдалось при действии высшей из использованных концентраций цинка (800 мкМ) – до  $-1,4$  МПа к

четырнадцатым суткам эксперимента, что однако же было ниже падения, вызванного семидневным действием меди в концентрации 100 мкМ.

Вслед за падением оводненности и осмотического потенциала происходила индукция ТМ *аккумуляции пролина*, одного из основных осмопротекторов у хрустальной травки. На 14-й день опыта концентрация пролина увеличилась в 3 раза в присутствии 25 мкМ  $\text{CuSO}_4$  и в 8 раз на фоне 50 мкМ  $\text{CuSO}_4$ . В вариантах с цинком было достигнуто 7-кратное превышение уровня пролина в листьях по сравнению с контрольными растениями (рис. 3).

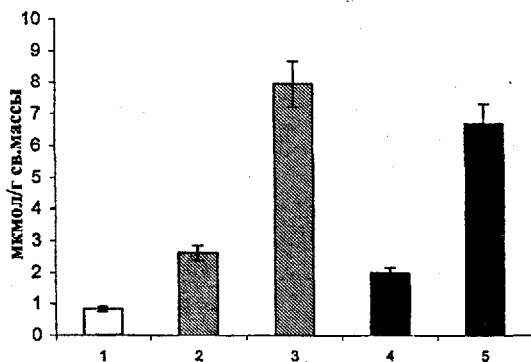


Рис. 3 Аккумуляция пролина в листьях растений *M. crystallinum* при действии меди и цинка в течение 14 дней.

1 – контроль,  
2, 3 –  $\text{CuSO}_4$ , 2 – 25 мкМ, 3 – 50 мкМ,  
4, 5 –  $\text{ZnSO}_4$ , 4 – 250 мкМ, 5 – 500 мкМ

Одним из основных ответов хрустальной травки на действие стрессоров различной природы является переключение фиксации  $\text{CO}_2$  с  $\text{C}_3$  - типа фотосинтеза на САМ. Являясь эффективной водосберегающей стратегией, **САМ-фотосинтез** способствует поддержанию водного статуса растений в жестких условиях.

Об индукции САМ и его интенсивности судили по концентрации протона в листьях (рис. 4), которая повышалась при действии меди и цинка уже на третьи сутки эксперимента, достоверно превышая концентрацию протона в листьях как контрольных растений, так и подвергнутых действию 400 мМ  $\text{NaCl}$ . Значительно возрастала концентрация протона к 14-м суткам эксперимента, в максимальном случае составляя почти 140 мкэкв  $\text{H}^+$ /г свежей массы, что достоверно превосходило интенсивность САМ, вызванного  $\text{NaCl}$ .

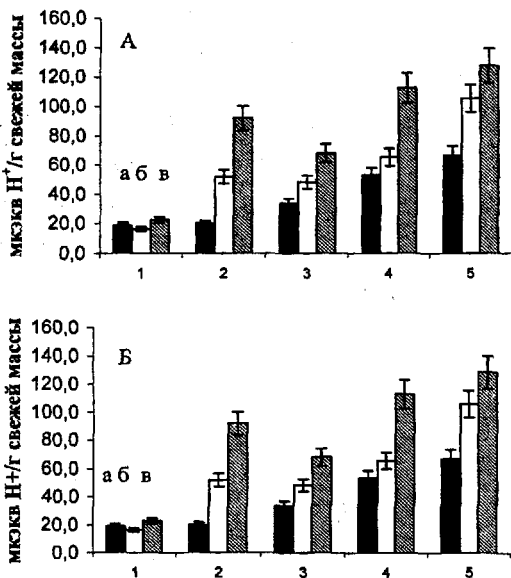


Рис. 4 Действие меди (А) и цинка (Б) на интенсивность САМ у растений хрустальной травки на третьи (а), седьмые (б) и четырнадцатые (в) сутки эксперимента.

А – 1 – контроль, 2 – NaCl (400 мМ),

3-5 – CuSO<sub>4</sub>, 3 – 25 мкМ, 4 – 50 мкМ, 5 – 100 мкМ

Б – 1 – контроль, 2 – NaCl (400 мМ),

3-5 – ZnSO<sub>4</sub>, 3 – 250 мкМ, 4 – 500 мкМ, 5 – 800 мкМ

Среди негативных эффектов, вызванных высокими концентрациями меди и цинка на растения *M. crystallinum*, необходимо отметить действие на хлорофилл, причем реакции ранее сформированных и молодых, развивающихся листьев, были различны. На старых листьях появлялись обесцвеченные некротические пятна размером до 1 см, тогда как сформировавшиеся в присутствии ТМ листья обнаруживали признаки хлороза. Количественная оценка содержания хлорофилла в листьях, выросших в среде с ТМ, показала, что существенное действие сернокислого цинка проявилось только при высшей из использованных концентраций: не влияя достоверно на содержание хлорофилла, 500 мкМ ZnSO<sub>4</sub> изменяли соотношение хл а/хл b. Медь в низких концентрациях оказала слабое действие, однако уже при росте растений на среде с 50 мкМ CuSO<sub>4</sub> наблюдалось не только изменение соотношения хл а/хл b, но также и сильное снижение содержания хлорофилла.

Одной из причин обнаруженной деградации хлорофилла и нарушения его синтеза в листьях хрустальной травки мог быть *окислительный стресс*, индуцируемый ТМ. Одной из основных мишеней действия активных форм кислорода (АФК) часто являются липидные компоненты мембран. Об интенсивности *перекисного окисления липидов* можно судить по концентрации малонового диальдегида – основного продукта этого процесса.

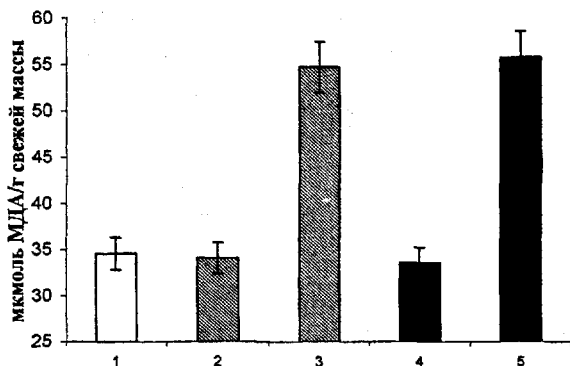


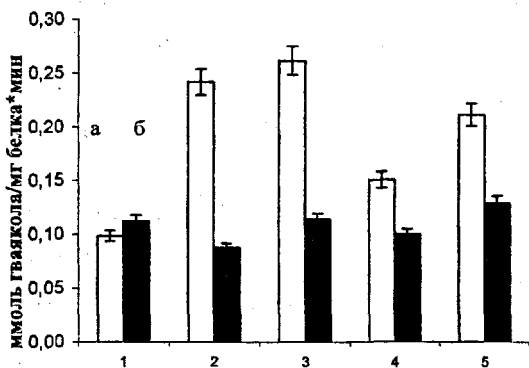
Рис. 5. Влияние меди и цинка на интенсивность перекисного окисления липидов (14 дней).

1 – контроль,  
 2, 3 – CuSO<sub>4</sub>, 2 – 25 мкМ, 3 – 50 мкМ,  
 3, 5 – ZnSO<sub>4</sub>, 3 – 250 мкМ,  
 4 – 500 мкМ.

Как свидетельствуют полученные данные (рис. 5), высокие концентрации солей меди и цинка вызвали достоверное, практически одинаковое по размеру, на 70% превышающее значения контрольного варианта, повышение активности липоксигеназы, тогда как эффект низких концентраций ТМ отсутствовал.

Часто мишенью повреждающего действия АФК оказываются основные мембраны клетки, плазмалемма и тонопласт. Для оценки их состояния и возможного влияния ТМ на целостность мембран использовали такой интегральный показатель как *утечка электролитов* из клеток листьев. Однако не было выявлено какого-либо эффекта солей меди и цинка на барьерные свойства мембран ни в стандартных условиях, не при провоцирующем действии высоких температур. Такие данные вместе с сильным влиянием ТМ на хлорофилл позволяют высказать предположение, что основной мишенью

действия АФК у растений хрустальной травки являются мембраны хлоропластов.



**Рис. 6.** Изменение активности свободной (а) и ион-связанной (б) пероксидазы при действии меди и цинка в течение 14 дней.

1 – контроль, 2, 3 – CuSO<sub>4</sub>, 2 – 25 мкМ, 3 – 50 мкМ, 4, 5 – ZnSO<sub>4</sub>, 4 – 250 мкМ, 5 – 500 мкМ.

Важную роль в системе защиты от активных форм кислорода (АФК) играет *пероксидаза*, предотвращающая избыточное накопление пероксида водорода. Особенно сильную активацию свободной формы пероксидазы (более чем в 2,5 раза в сравнении с контрольными растениями) вызывали 50 мкМ CuSO<sub>4</sub>. Сопоставимый эффект сульфата цинка наблюдался лишь при 10-кратной увеличенной его концентрации (500 мкМ). Необходимо также отметить, что медь и цинк не вызывали повышения активности ион-связанной формы пероксидазы в листьях растений (рис. 6). Характерно, что все признаки окислительного стресса значительно сильнее развивались в присутствии солей меди, что вполне отвечает ее химической природе как металлу с переходной валентностью.

Воздействие на растения хрустальной травки серноокислыми солями меди и цинка приводило к *активации экспрессии генов* низкомолекулярных специфических белков хелаторов этих ТМ – *металлотионеинов*. Было показано, что исследуемые гены – *MT6273* и *MT6331* наиболее активно экспрессируются при обработке растений серноокислой медью (рис. 7). Так, к седьмым суткам эксперимента уровень транскриптов обоих генов металлотионеинов значительно увеличивался по сравнению с контролем уже при росте растений на среде с 25 мкМ CuSO<sub>4</sub>. Еще более значительный уровень



мРНК *MT6273* и *MT6331* наблюдался при использовании 50 мкМ  $\text{CuSO}_4$ . Таким образом, обнаруживалась выраженная концентрационная зависимость уровня экспрессии обоих генов.

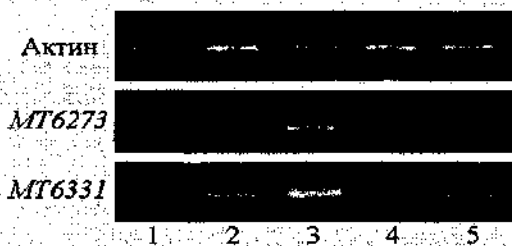


Рис 7. Уровень матричной РНК двух генов металлотионеинов - *MT6273* и *MT6331*, седьмые сутки эксперимента.

1 – контроль,  
2 -  $\text{CuSO}_4$  25 мкМ, 3 -  $\text{CuSO}_4$  50 мкМ,  
4 -  $\text{ZnSO}_4$  250 мкМ, 5 -  $\text{ZnSO}_4$  500 мкМ

Действие сернокислого цинка вызывало достоверное увеличение экспрессии *MT6273* и *MT6331* лишь в высшей из использованных концентраций – 800 мкМ. Однако даже в данном случае уровень накопления матричной РНК исследуемых генов был ниже такового при использовании 50 мкМ сульфата меди.

#### Совместное действие меди и засоления

Поскольку *M. crystallinum* является галофитом, заселяющим в естественных условиях почвы с высоким содержанием солей, представлялось необходимым изучить особенности формирования адаптационного процесса при одновременном действии двух факторов –  $\text{NaCl}$  и ТМ.

Для изучения характера взаимодействия двух стрессоров, прежде всего, сравнивали *общее состояние и накопление биомассы* растений при раздельном действии сернокислой меди и хлористого натрия или их совместном действии. Полученные данные показали, что за семь суток эксперимента растения, подвергнутые совместному действию двух изучаемых факторов, не обнаруживали таких характерных признаков токсического действия солей меди как резкое замедление и полное ингибирование аккумуляции биомассы, появление некротических пятен и потеря тургора. В

целом следует отметить, что по уровню развития растения, подвергнутые совместному действию NaCl и CuSO<sub>4</sub>, были вполне сопоставимы с растениями, выращиваемыми в присутствии одного лишь NaCl (400 мМ) в питательной среде.

Представлялось весьма вероятным, что снятие хлористым натрием токсического действия сернокислой меди было сопряжено с ингибированием поступления ионов меди в растения хрустальной травки. Однако не было обнаружено достоверных различий в уровне накопления меди первичными листьями растений, росших в течение 7 дней на среде в присутствии только CuSO<sub>4</sub> или совместно с 400 мМ NaCl (рис. 7), хотя внесение CuSO<sub>4</sub> в среду вызывало увеличение концентрации меди в листьях в 7-8 раз в сравнении с контролем. Следовательно, защитный эффект хлористого натрия не был связан с торможением аккумуляции меди в листьях хрустальной травки.

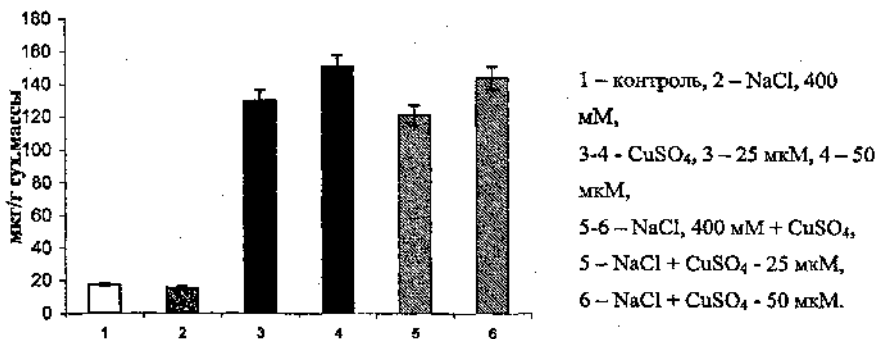


Рис. 8. Аккумуляция меди в листьях растений хрустальной травки за 7 суток.

Важной адаптационной стратегией растений хрустальной травки является их переход с C<sub>3</sub>-типа фотосинтеза на водосберегающий САМ-тип. В связи с этим нельзя было исключать, что позитивный эффект адаптации растений к NaCl на их устойчивость к меди связан со стресс-индуцированным формированием САМ-типа фотосинтеза. Полученные результаты показали, что к концу эксперимента (7 суток) величина титруемой кислотности для растений

контрольного варианта составила 23 мкэкв/г свежей массы, что свидетельствует об инициации функционирования САМ. Через 7 суток после внесения в питательную среду 400 мМ NaCl концентрация протона доходила до 52 мкэкв/г свежей массы, что соответствует САМ средней интенсивности. Действие сернокислой меди вызывало значительное увеличение интенсивности САМ, концентрация протона в этом случае составляла 83 мкэкв/г свежей массы. Близкой была интенсивность САМ у растений обоих вариантов совместного действия CuSO<sub>4</sub> и NaCl, составляя в среднем 72 мкэкв/г свежей массы. Существенно, что различия интенсивности протекания САМ между этими вариантами и вариантами с действием одной лишь сернокислой меди недостоверны. Это означает, что защитный эффект NaCl в случае совместного с CuSO<sub>4</sub> действия, не был связан с дополнительной активацией САМ-фотосинтеза. Также не было обнаружено и снижения хлористым натрием при совместном действии с медью частичного обезвоживания листьев растений.

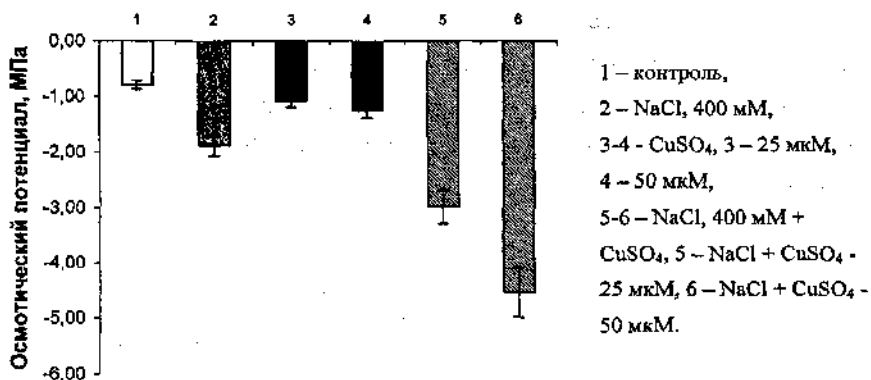


Рис. 9. Осмотический потенциал клеточного сока листьев растений хрустально травки за 7 суток.

Выше приводились данные о действии цинка и в большей степени меди на снижение *осмотического потенциала* клеточного сока листьев растений *M. crystallinum* (см. рис. 2). Еще большее влияние оказывало воздействие хлористого натрия, снижая осмотический потенциал до -2МПа от -0,8МПа у

контроля. Промежуточные значения занимали показатели осмотического потенциала растений при действии сернокислой меди. Однако совместное действие факторов приводило к неожиданно резкому падению анализируемого показателя, в 3,8 раз по сравнению с контролем у растений варианта NaCl + CuSO<sub>4</sub> - 25 мкМ и почти в шесть раз при действии на растения NaCl + CuSO<sub>4</sub> - 50 мкМ (рис. 9).

Напрямую с параметрами водного статуса связан такой показатель как аккумуляция совместимых осмолитов, среди которых *пролин* играет особую роль при адаптации растений к засолению (Кузнецов, Шевякова, 1999). При относительно невысоком содержании в листьях контрольных растений (рис. 10) пролин быстро синтезировался при внесении в питательную среду NaCl. Так, на седьмые сутки эксперимента растения хрустальной травки при действии 400 мМ NaCl накапливали в листьях до 10 мкмоль пролина на 1 г свежей массы. Более слабую – менее 3 мкмоль/г свежей массы – аккумуляцию пролина вызывала сернокислая медь в концентрации 25 мкМ, однако при 50 мкМ CuSO<sub>4</sub> на седьмые сутки концентрация пролина возрастала до 8 мкмоль/г свежей массы. Однако, самая высокая концентрация пролина, значительно превосходящая все другие варианты, - 15-16 мкмоль/г - обнаруживалась в листьях растений при совместном действии обоих изучаемых факторов.

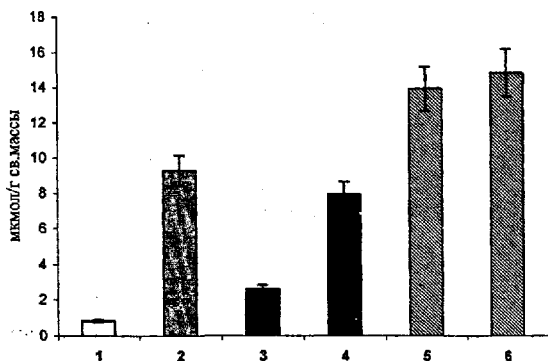


Рис. 4. Аккумуляция пролина в листьях растений хрустальной травки, 7-е сутки эксперимента.

1 – контроль, 2 – NaCl, 400 мМ, 3-4 – CuSO<sub>4</sub>, 3 – 25 мкМ, 4 – 50 мкМ, 5-6 – NaCl, 400 мМ + CuSO<sub>4</sub>, 5 – NaCl + CuSO<sub>4</sub> - 25 мкМ, 6 – NaCl + CuSO<sub>4</sub> - 50 мкМ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как медь, так и цинк являются эссенциальными элементами для растений. Так, известно, что медь является ключевым компонентом, обеспечивающим функционирование ряда ферментов (цитохромоксидазы, аскорбатоксидазы и др.) и белков неферментативной природы (например, пластоцианина). Среди функций цинка в последние годы особое внимание привлекает его участие в работе транскрипционных факторов. Незаменяемостью этих элементов, в частности, объясняется то обстоятельство, что при выращивании растений в водной культуре соли меди и цинка являются обязательными компонентами питательных смесей. Так, среда, использованная в опытах с хрустальной травкой, содержала 0,25 мкМ  $\text{CuSO}_4$  и 1 мкМ  $\text{ZnSO}_4$ .

На уровне прорастания семян и начальной стадии роста проростков растения хрустальной травки проявляли высокую устойчивость к солям ТМ, поскольку всхожесть не снижалась при 200 мкМ  $\text{CuSO}_4$  и 1000 мкМ  $\text{ZnSO}_4$ . Однако при длительном выращивании растения *M. crystallinum* обнаружили способность адаптироваться лишь к более низким концентрациям (до 100 мМ  $\text{CuSO}_4$  и 800 мМ  $\text{ZnSO}_4$ ), что, тем не менее, было в 200 и 800 раз выше, чем содержание этих соединений в стандартной питательной среде.

Как и для большинства изученных растений, для хрустальной травки соли меди оказались значительно более токсичными, чем соли цинка. Этому выводу вполне соответствуют существенно меньшие концентрации меди в сравнении с цинком, обычно обнаруживаемые в тканях растений в норме ( $\text{Cu}$  - 1-10 мкг.г<sup>-1</sup>,  $\text{Zn}$  - 10-100 мкг.г<sup>-1</sup> сухой массы), а также минимальные токсические концентрации этих ТМ ( $\text{Cu}$  - 20-30 мкг.г<sup>-1</sup>,  $\text{Zn}$  - 300-500 мкг.г<sup>-1</sup> сухой массы).

Результаты наших экспериментов не позволяют пока отнести хрустальную травку к гипераккумуляторам изученных нами ТМ. Действительно, несмотря на то, что при выращивании растений на среде с 800 мкМ  $\text{ZnSO}_4$  содержание цинка в листьях достигало почти 2 мг на г сухой массы, эта величина все же

существенно ниже концентрации, характерной для гипераккумуляторов цинка (более 10 мг на г сухой массы листьев). Что же касается отношения хрустальной травки к меди, прежде всего, обращает на себя внимание ее высокая токсичность.

Помимо нарушения водного статуса, отчетливым признаком негативного действия солей меди и в меньшей степени цинка является окислительный стресс. К его проявлениям в первую очередь следует отнести заметную деградацию хлорофилла и торможение его синтеза, а также активацию пероксидазы и липоксигеназы. Вместе с тем, существенно, что окислительный стресс не сопровождался нарушениями барьерных функций основных клеточных мембран. Полученные нами данные подтверждают вывод, сделанный при изучении действия меди на растения *Silene cucubalus* о критической роли поддержания барьерных свойств мембран в реализации устойчивости к этому ТМ (De Vos et al., 1991). Характер защитных реакций хрустальной травки – активизация свободной формы пероксидазы, аккумуляция пролина – также может служить подтверждением внутриклеточных, возможно, хлоропластных повреждений, вызываемых АФК, но не затрагивающих в существенной степени функционирование тонопласта и плазмалеммы.

В целом, полученные данные позволяют сделать заключение об относительно высокой устойчивости растений хрустальной травки к солям меди и особенно цинка. Хотя соли меди заметно тормозили рост уже в концентрации 25 мкМ, растения могли завершать онтогенез и формировать полноценные семена даже при 100 мкМ  $\text{CuSO}_4$  в среде. Однако необходимо отметить, что эта концентрация почти на 2 порядка ниже той, что была заявлена как пригодная для роста хрустальной травки в работе Thomas et al.(1998) на основании 3-7-дневных опытов. Вместе с тем, в пользу сравнительно высокой устойчивости хрустальной травки к меди свидетельствует тот факт, что длительное выращивание при относительно

невысоких концентрациях  $\text{CuSO}_4$  приводило к аккумуляции в листьях более 100 мкг меди на 1 г сухой массы, что в несколько раз превышает токсический уровень этого ТМ для большинства растений.

Несомненный вклад в устойчивость растений к действию меди вносит хелатирование ионов данного металла специфическими низкомолекулярными белками-хелаторами – металлотионеинами, значительная активация экспрессии генов которых была обнаружена нами у растений *M. crystallinum*. Таким образом, можно предположить, что в детоксикации меди у *M. crystallinum* функционирует преимущественно механизм хелатирования, в то время как устойчивость к цинку, скорее всего, реализуется посредством механизма его компартментации в вакуоль, активное участие в этом процессе по некоторым данным принимают транспортные ZAT белки (Hall and Williams, 2003).

Значительно лучшая адаптивная способность растений хрустальной травки в условиях совместного действия меди и засоления может объясняться, с одной стороны, улучшением водного статуса растений, с другой – повышенной аккумуляцией пролина, сопряженной с резким снижением осмотического потенциала растений. Известно, что пролин обладает значительным антиоксидантным действием, а соли меди как металла с переходной валентностью инициируют возникновение активных форм кислорода. Можно на этом основании заключить, что адаптация растений к хлористому натрию (400 мМ) сопровождается снижением токсического эффекта меди, важную роль в этом играет способность растений в ответ на совместное действие двух исследованных факторов к суперпродукции пролина, обладающего множественным стресс-протекторным действием.

## ВЫВОДЫ

1. Растения хрустальной травки показали довольно высокую устойчивость к действию солей меди и особенно цинка. Полностью завершая онтогенетический цикл при концентрациях  $\text{CuSO}_4$  до 100 мкМ и  $\text{ZnSO}_4$  до 800

мкМ, растения накапливали в надземных органах значительные количества ТМ, хотя недостаточные для отнесения данного растения к гипераккумуляторам этих ТМ. Вместе с тем хрустальная травка обнаруживала максимальную устойчивость на стадии проростков, что весьма полезно при использовании растения в целях фиторемедиации.

2. Действие ТМ проявлялось в резком снижении аккумуляции биомассы, падении оводненности, нарушении синтеза хлорофилла, а также в активной аккумуляции АФК, что приводило к проявлению на листьях некрозов и интенсификации перекисного окисления липидов.

3. Такое действие ТМ инициировало реализацию ряда адаптивных стратегий, среди которых – стресс-индуцированное формирование САМ; осморегуляция, включающая активный синтез пролина; активация защитных ферментов окислительного стресса, что позволяло поддерживать нормальное функционирование основных мембран клетки.

4. В ответ на действие солей меди и в меньшей степени цинка происходила активация экспрессии двух генов металлотионеинов (*MT6273* и *MT6331*) – специфических хелаторов ТМ, установленная на уровне кодируемых этими генами мРНК. Основную роль в детоксикации цинка, по-видимому, играет активный транспорт этого ТМ в вакуоль ZAT транспортерами.

5. Совместное действие хлористого натрия и ТМ значительно увеличивало адаптационный потенциал растений хрустальной травки, в основе чего может лежать их способность к суперпродукции пролина, обладающего множественным стресс-протекторным действием.

6. Накопление значительных количеств ТМ в надземных органах хрустальной травки вместе с довольно коротким вегетационным циклом и высокой устойчивостью к одновременному действию ТМ и засоления позволяет рассматривать данное растение как перспективное для фиторемедиации, особенно территорий с комплексным загрязнением.



**По материалам диссертации опубликованы следующие работы:**

1. Волков К.С., Холодова В.П. Возможность использования растений хрустальной травки в целях фиторемедиации // Тезисы докладов, V Съезд общества физиологов растений России и Международная конференция «Физиология растений – основа фитобиотехнологии». Пенза, 2003 г. С.260.

2. Холодова В.П., Аканов Э.Н., Волков К.С., Малиновский А.В., Кузнецов Вл.В. Ответ хрустальной травки на повышенную концентрацию углекислоты // Тезисы докладов, V Съезд общества физиологов растений России и Международная конференция «Физиология растений – основа фитобиотехнологии». Пенза, 2003 г. С.349.

3. Волков К.С., Холодова В.П. Изменение водного статуса и активности антиоксидантных ферментов при адаптации хрустальной травки к повышенным концентрациям меди и цинка // Тезисы докладов, Годи́чное собрание Общества физиологов растений России и Международная научная конференция «Проблемы физиологии растений севера». Петрозаводск, 2004. С.43.

4. Холодова В.П., Волков К.С., Кузнецов Вл.В. Адаптация к высоким концентрациям солей меди и цинка растений хрустальной травки и возможность их использования в целях фиторемедиации. Физиология растений, 2005, Т. 52, № 6. С.848 – 858.

5. Волков К.С., Холодова В.П. Формирование окислительного стресса у растений хрустальной травки при действии меди и цинка // Тезисы докладов, Международная конференция «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия». Вологда, 2005. С.31.

6. Холодова В.П., Абдеева А.Р., Волков К.С., Кузнецов Вас. В., Кузнецов Вл. В. Экспрессия генов аквапоринов при адаптации растений к хлоридному засолению и солям тяжелых металлов // Тезисы докладов, Международная конференция «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия». Вологда, 2005. С.175.

7. Волков К.С., Холодова В.П., Кузнецов Вл.В. Адаптация растений к засолению снижает токсический эффект меди // Доклады Академии наук, 2006 (в печати).

8. Volkov K.S., Kholodova V.P., Kuznetsov Vl.V. Protective action of sodium chloride against deleterious effect of copper in *Mesembryanthemum crystallinum* // Abstracts of the 15<sup>th</sup> FESPB Congress, Lyon, France, 2006 (in press).

Принято к исполнению 26/04/2006  
Исполнено 27/04/2006

Заказ №329  
Тираж: 100 экз.

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900  
Москва, Варшавское ш., 36  
(495) 975-78-56  
(495) 747-64-70  
[www.autoreferat.ru](http://www.autoreferat.ru)

