

На правах рукописи



Злобин Илья Евгеньевич

**Ранние стрессорные ответы растений рапса на повышенные
уровни меди и цинка в среде**

03.01.05 - физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2015

Работа выполнена в лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук

Холодова Валентина Павловна

Официальные оппоненты:

Иванов Борис Николаевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук, заведующий лабораторией фотосинтетического электронного транспорта

Казнина Наталья Мстиславовна, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Карельского научного центра РАН, старший научный сотрудник лаборатории экологической физиологии растений

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Защита состоится 26 января 2016 г. в 11 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: (499) 977-80-18, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, <http://www.ippras.ru>

Автореферат разослан « » ноября 2015 г.

Ученый секретарь
совета по защите докторских
и кандидатских диссертаций,
кандидат биологических наук

Азаркович Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Медь и цинк являются необходимыми для жизнедеятельности элементами и одновременно с этим – высокотоксичными тяжелыми металлами (ТМ) (Tottey et al., 2008; Rubino and Franz, 2012). Среди эссенциальных переходных металлов медь и цинк обладают наибольшей аффинностью к большинству внутриклеточных лигандов, в соответствии с рядом Ирвинга-Уильямса (Tottey et al., 2008). По этой причине все ионы меди и цинка в клетке находятся в виде комплексов с различными металл-связывающими лигандами (O’Halloran and Culotta, 2000). Вследствие этого уровень физиологической внутриклеточной доступности меди и цинка определяется, в первую очередь, не общим содержанием данных металлов в клетке, а соотношением между содержанием металлов и клеточным потенциалом к их связыванию, который определяется разнообразными по химической природе и концентрации лигандами (Wegner et al., 2010). Поэтому при изучении токсических эффектов действия избытка меди и цинка необходимо анализировать не только общее увеличение содержания металлов в клетке, но и изменения внутриклеточной доступности и характера их связывания в цитозоле.

Потенциально медь и цинк в клетке могут связываться целым рядом соединений различной химической природы, например, восстановленным глутатионом (Freedman et al., 1989; Maryon et al., 2013) и металлотионеинами (Calderone et al., 2005; Krezel et al., 2007). Однако для растительных объектов данная область на сегодняшний день остается малоизученной; неизвестен характер связывания ионов данных металлов в цитозоле как при нормальном их содержании, так и при избытке.

Цель и задачи исследования. Цель данной работы состояла в изучении динамики быстрых ответных реакций растений рапса на воздействие различных по токсическому эффекту концентраций ионов меди и цинка.

Были поставлены следующие задачи:

- выявить потенциальную связь между содержанием меди в тканях и уровнем экспрессии ряда генов, связанных с детоксикацией ионов меди
- исследовать изменение в содержании лабильных форм меди и цинка в корнях растений рапса в ходе начального периода воздействия высоких концентраций ТМ

- определить роль глутатиона в качестве одного из возможных лигандов меди и цинка в клетках

- установить причины повреждения плазмалеммы клеток корня при медь- и цинк-индуцированном стрессе

Научная новизна. Обнаружено, что действие избытка меди вызывает скоординированное изменение уровня экспрессии ряда генов детоксикации в корнях растений рапса. Показана связь между уровнем экспрессии генов раннего ответа на избыток меди и скоростью изменения содержания металла в корнях. Показано, что воздействие избытка меди и цинка существенно увеличивает содержание слабосвязанных обменных форм данных металлов в клетках корней рапса. Обнаружена связь между накоплением подвижных форм металлов в клетках корня и повреждением в них плазматической мембраны. Выявлена роль восстановленного глутатиона в хелатировании ионов меди и цинка в клетках. Установлена роль процессов перекисного окисления липидов в нарушении целостности плазматической мембраны при действии различных концентраций ионов меди.

Практическая значимость. Полученные в работе данные имеют существенное значение для выявления прямых механизмов повреждающего действия избытка ионов меди и цинка на растительные клетки. Разработанные методы и подходы могут использоваться для мониторинга токсического воздействия различных тяжелых металлов на растительные организмы. Теоретические обобщения и совокупность полученных экспериментальных данных могут использоваться в курсах лекций для студентов биологических факультетов университетов страны.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на Всероссийской научной конференции с международным участием «Инновационные направления современной физиологии растений» (Москва, 2013); IX Международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы экологии - 2013", (Гродно, Беларусь, 2013); V Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2013); XIII Международной конференции молодых учёных «Леса Евразии – удмуртский лес» (Ижевск, 2013); Межинститутском научном молодежном семинаре «Актуальные проблемы физиологии, молекулярной биологии и биотехнологии растений» (Москва, 2014); VIII съезде общества физиологов растений России «Растения в условиях

глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, из которых 2 – статьи в рецензируемых журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, выводы и список цитируемой литературы. Материалы диссертации изложены на 123 страницах машинописного текста и содержат 1 таблицу и 31 рисунок. Список цитируемой литературы включает 183 наименования, из которых 172 – на иностранном языке.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования являлись растения рапса (*Brassica napus* L.) сорта Вестар. Семена рапса проращивали на перлите в течение 7 дней, после чего переносили в вегетационные сосуды вместимостью 1 литр на среду Хогланда-Снайдера (Иванова с соавт., 2010), по 5 растений на 1 сосуд, и выращивали в течение 14 дней при температуре 20-22⁰С, освещенности 100 мкмоль/м²с¹ люминесцентными лампами Philips (Польша), при продолжительности светового дня 14 часов. Медь и цинк вносили в сосуды в виде CuSO₄ и ZnSO₄; длительность воздействия составляла до 3 суток.

Определение содержания воды, металлов и пигментов в тканях растений проводили по (Иванова с соавт., 2010). Определение максимального квантового выхода фотохимических реакций фотосистемы II проводили по (Schreiber, 1997), в сотрудничестве с Рахманкуловой З.Ф. (лаборатория глобальной экологии фотосинтеза ИФР РАН). Определение содержания общего и окисленного глутатиона в тканях корня проводили по (Rahman et al., 2007). Выделение тотальной РНК проводили с помощью реактива Тризол. Содержание транскриптов целевых генов определяли с помощью ПЦР после обратной транскрипции. Получение кДНК осуществляли в соответствии с рекомендациями производителя (Fermentas, США). Перед определением уровня экспрессии целевых генов образцы нормализовались по уровню экспрессии гена *Actin-2*. Электрофорез ПЦР-продуктов проводили в 1%-м агарозном геле; результаты визуализировали с помощью транс-иллюминатора TFX-35-M (Vilber

Lourmat, Франция). Повреждение мембран клеток корня оценивали с помощью красителя Эванс синий по (Yamamoto et al., 2001). Накопление супероксид-радикала оценивали с помощью красителя нитросиний тетразолий по (Singh et al., 2008). Содержание лабильных форм меди и цинка в тканях оценивали с помощью флуоресцентных красителей Phen Green SK и Newport Green DCF (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Уровень перекисного окисления липидов в корне оценивали с использованием флуоресцентного красителя image-iT Lipid Peroxidation Kit (Thermo Fisher Scientific, США), в соответствии с рекомендациями производителя. Содержание восстановленного глутатиона в корне оценивалось с помощью флуоресцентного красителя монохлоробимана (Thermo Fisher Scientific, США), в соответствии с рекомендациями производителя.

Статистический анализ. На графиках приведены средние арифметические значения из числа повторностей $n \geq 3$ и их стандартные отклонения. Для определения значимости различий между средними значениями использовали дисперсионный анализ с апостериорным тестом Тьюки для попарного сравнения с уровнем значимости 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние избытка меди на некоторые физиологические параметры растений рапса.

Избыток ионов меди (50 мкМ CuSO_4) оказывал выраженное токсическое действие на растения рапса. Спустя 3 суток после начала опыта содержание воды в листьях растений в условиях избытка меди снижалось примерно на 3% (рис. 1).

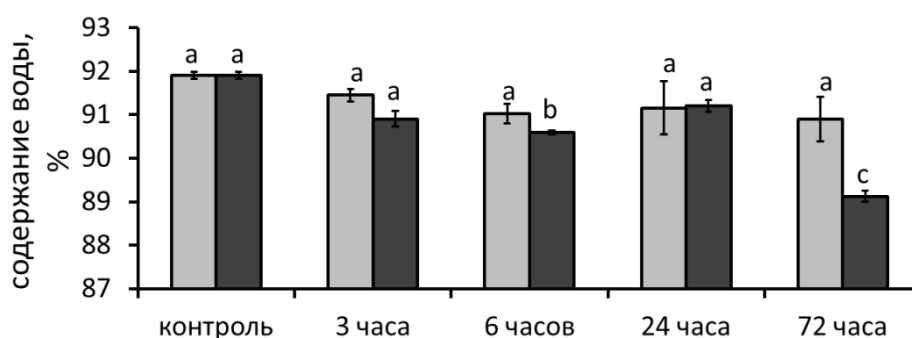


Рис. 1. Содержание воды в тканях листьев в контрольных условиях (светло-серый) и при действии 50 мкМ CuSO_4 (темно-серый). Разными буквами обозначены статистически значимые различия между средними значениями в контрольных условиях и условиях опыта ($P \leq 0,05$).

Действие избытка ионов меди вызывало заметное снижение содержания в листьях хлорофилла *a* и каротиноидов уже через 24 часа воздействия (рис. 2А, В); содержание хлорофилла *b* достоверно снижалось только к окончанию опыта (рис. 2Б). При этом, однако, не было обнаружено повреждающего действия избытка ионов меди на фотосистему II – уровень максимального квантового выхода фотосистемы II (Fv/Fm) не изменялся значимо в ходе всего опыта (рис. 2Г). Вероятно, это объяснялось недостаточной продолжительностью времени воздействия (до 72 часов), т.к. избыток меди часто вызывает снижение параметра Fv/Fm при более длительном воздействии (Thomas et al., 2013).

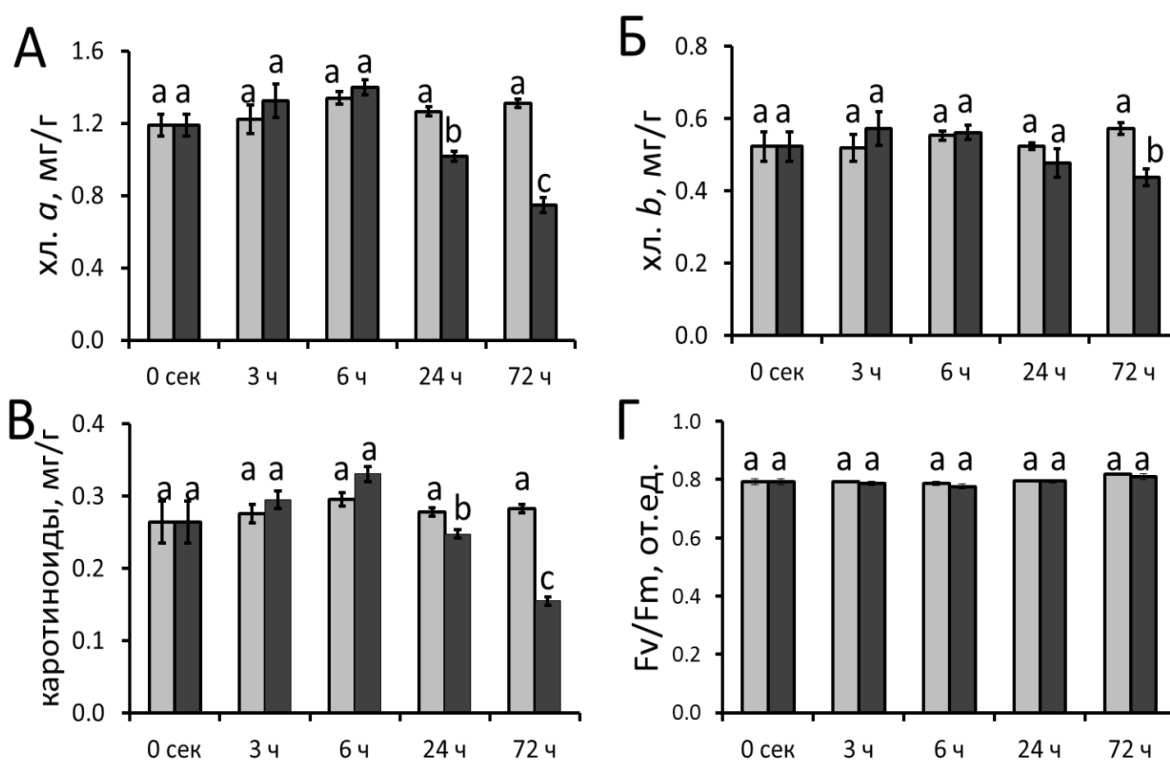


Рис. 2. Содержание хлорофилла *a* (А), хлорофилла *b* (Б), каротиноидов (В), в мг/г сырой массы листьев, и максимальный квантовый выход фотосистемы II в тканях листьев (Г) при действии избытка меди (50 мкМ CuSO₄). Светлыми столбиками указаны значения параметров в контрольных условиях, темными – при действии избытка меди. Разными буквами обозначены статистически значимые различия между средними значениями в контрольных условиях и в условиях опыта ($P \leq 0,05$).

В присутствии в среде избытка меди значительно увеличивалось содержание данного металла в тканях корня – уже спустя 3 часа воздействия оно выросло в 7 раз по сравнению с контролем, а к окончанию опыта – в 18 раз (рис. 3А). Напротив, в листьях значимое увеличение содержания меди (в 1,7 раза) отмечалось только к окончанию опыта (рис. 3Б).

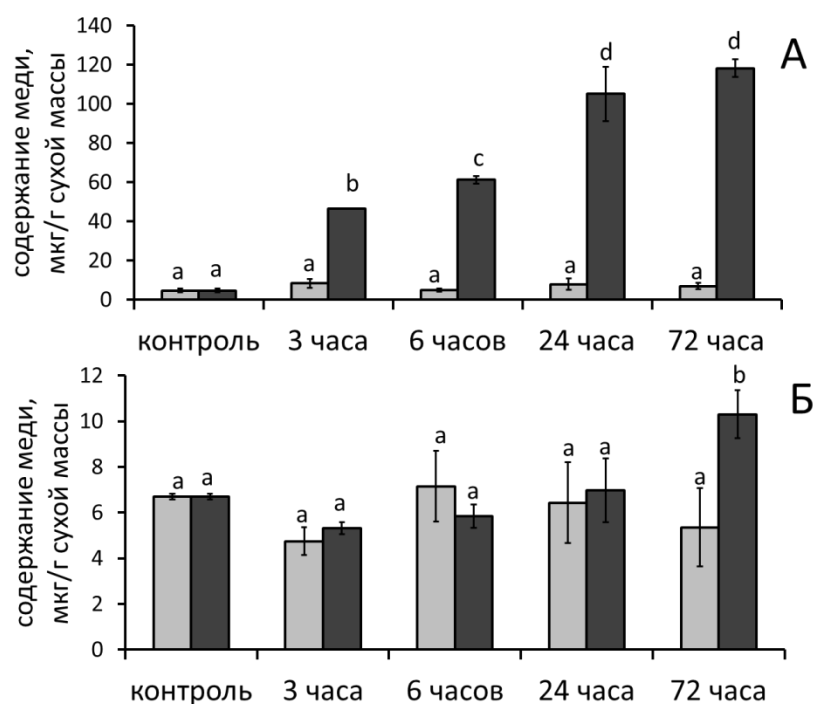


Рис. 3. Содержание меди в корнях (А) и листьях (Б) растений рапса. Светлыми столбиками указаны значения параметров в контрольных условиях, темными – при действии 50 мкМ CuSO₄. Разными буквами обозначены статистически значимые различия между средними значениями в контрольных условиях и условиях опыта ($P \leq 0,05$).

2. Влияние избытка меди в среде на экспрессию некоторых генов, участвующих в детоксикации избытка тяжелых металлов

В детоксикацию избыточных количеств тяжелых металлов в клетках вовлечены белки ряда функциональных групп, в первую очередь – хелаторов, связывающих ионы металлов, и транспортеров, осуществляющих вынос ионов из цитозоля в апопласт или вакуоль. Мы определили влияние меди на уровень содержания транскриптов для 17 генов, потенциально вовлеченных в гомеостатирование избытка меди в корнях и листьях рапса.

В тканях корня избыток меди уже в течение первых 3 часов опыта вызывал 5-10-кратное повышение содержания транскриптов группы генов детоксикации меди. В их число входили гены хелаторов тяжелых металлов – фитохелатинсинтазы PCS1, металлошаперона HSP6, а также гены ряда транспортеров, а именно MRP1 и MRP3, вовлеченных в транспорт комплексов металлов с фитохелатинами, YSL2, осуществляющего транспорт комплексов металлов с никотианамином, и ZIP5 (рис. 4). После начальной активации содержание транскриптов этих генов значительно снижалось; таким образом, возрастание уровня экспрессии приходилось на первые часы опыта, когда скорость увеличения содержания меди в тканях корня была

максимальной. В то же время, для двух генов – гена металлотионеина *MT2b* и гена металлошаперона *CCS* – обнаружена более поздняя активация экспрессии (рис. 4).

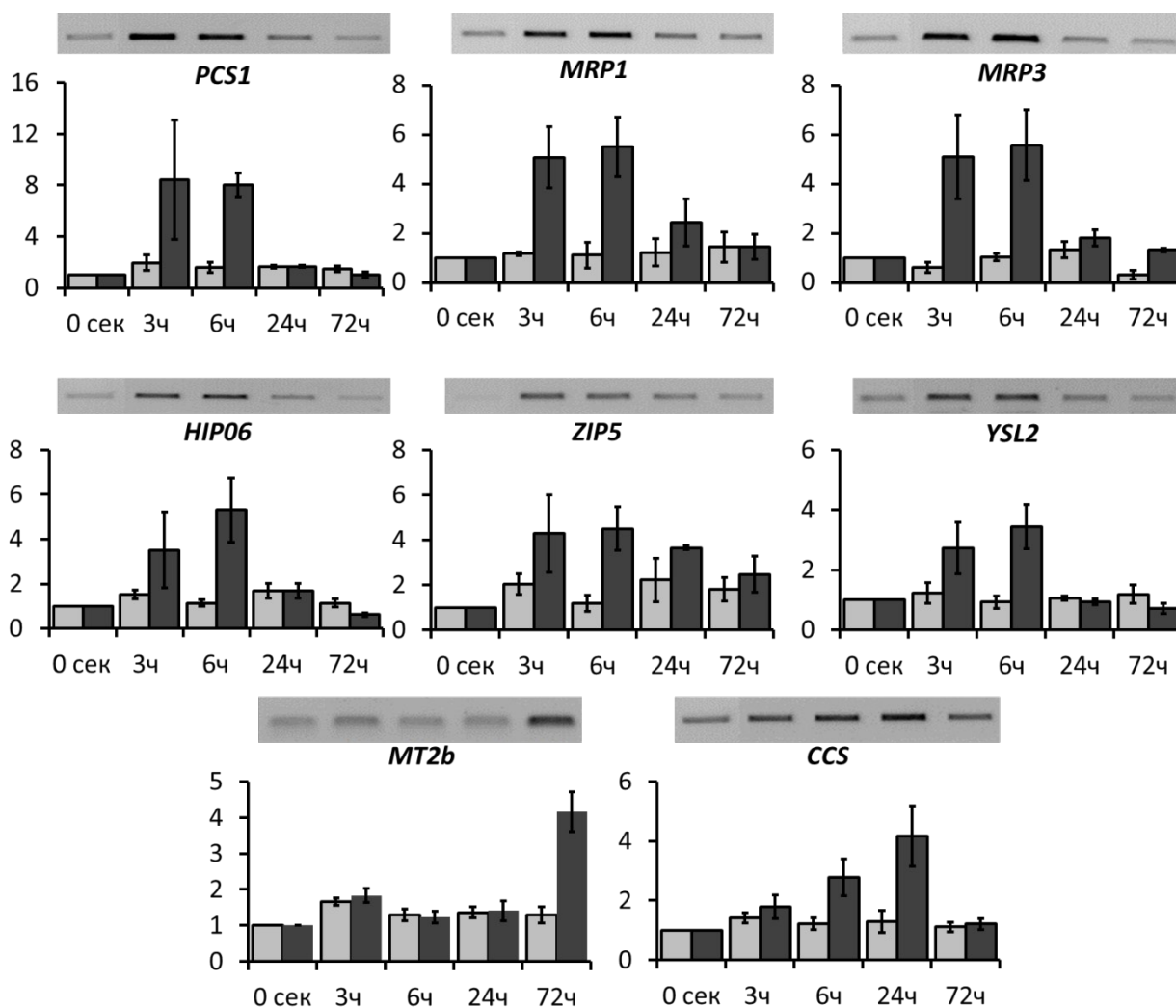


Рис. 4. Относительный уровень экспрессии генов детоксикации избытка меди в корнях в контрольных условиях (светло-серый) и при действии 50 мкМ CuSO_4 (темно-серый). За единицу принят уровень экспрессии в начале опыта («0 секунд»).

В листьях в условиях избытка меди отмечалось усиление экспрессии только для 3 генов из числа исследованных – гена транспортера *NRAMP4*, гена металлошаперона *CCS* и гена металлотионеина *MT1a* (рис. 5). С учетом относительно небольшого изменения содержания меди в тканях листьев в ходе опыта (рис. 3Б), можно предположить, что продукты этих генов не вовлечены непосредственно в связывание и транспорт избытка меди, а выполняют более специфические функции; например, транспортер *NRAMP4* может участвовать в ремобилизации вакуолярных запасов эссенциальных элементов при их металл-индуцированном недостатке (Lanquar et al., 2010).

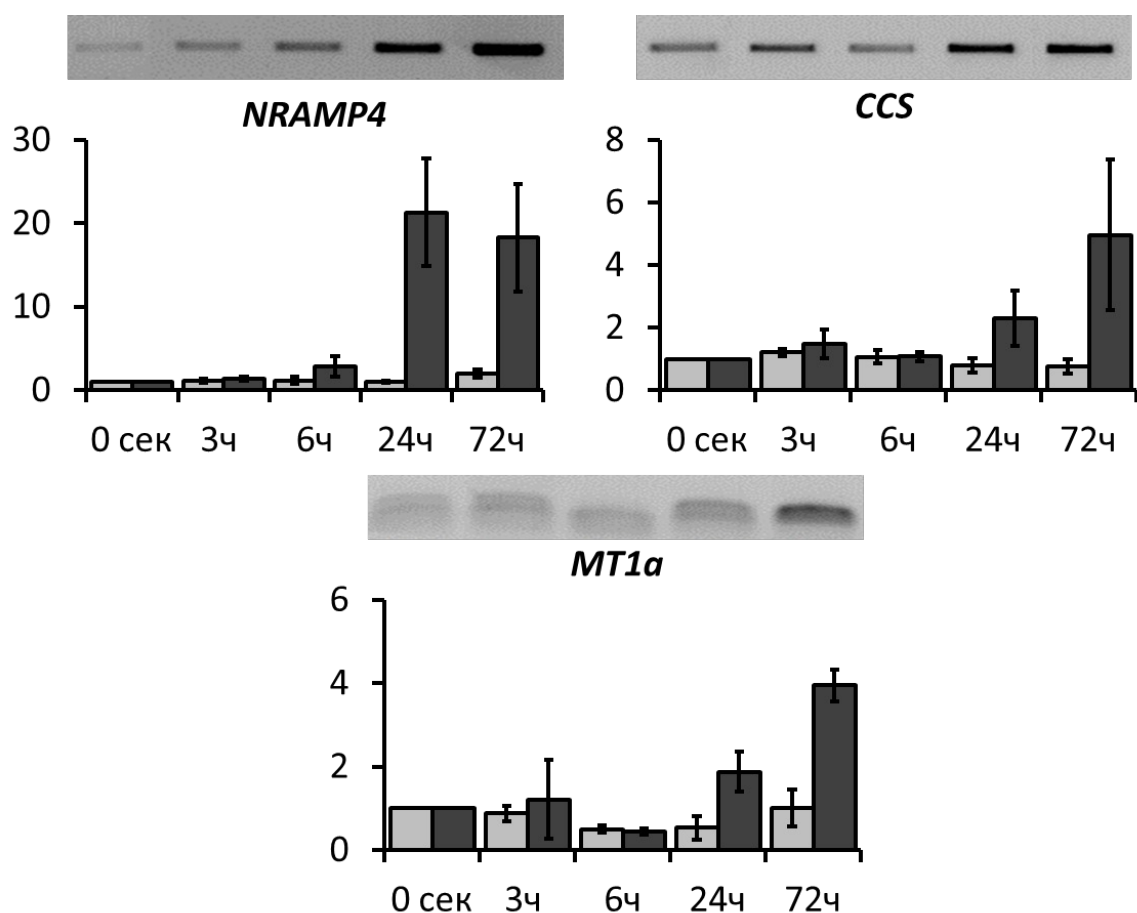


Рис. 5. Относительный уровень экспрессии генов детоксикации избытка меди в корнях в контрольных условиях (светло-серый) и при действии 50 мкМ CuSO₄ (темно-серый). За единицу принят уровень экспрессии на начало опыта («0 секунд»).

3. Морфологические изменения корневой системы рапса под влиянием различных концентраций меди и цинка

Для исследования воздействия избытка тяжелых металлов на корневую систему растений рапса схема опыта была расширена – помимо воздействия ионов меди в концентрации 50 мкМ (далее – высокой концентрации), в нее было включено воздействие ионов меди в концентрации 10 мкМ (далее – умеренной), а также ионов цинка в концентрации 250 мкМ. При этом было обнаружено, что действие умеренного избытка ионов меди, а также избытка ионов цинка вызывает явные изменения морфологии корня – он укорачивался, утолщался, а количество боковых корней на единицу длины корня значительно увеличивалось. Такие изменения характерны для умеренного действия широкого спектра стрессоров и составляют так называемый стресс-индуцированный морфогенетический ответ растения на воздействие стрессора, или SIMR (Stress-Induced Morphogenetic Response) (Potters et al., 2007; Potters et al., 2009).

4. Нарушение целостности плазмалеммы при действии ионов меди и цинка

Повреждение плазмалеммы клеток корня является первичным эффектом токсического действия меди, а уровень устойчивости растений к избытку меди тесно связан со способностью снижать степень повреждения мембран клеток корня (De Vos et al., 1991; Титов с соавт., 2007). Поэтому было решено охарактеризовать повреждающее действие избытка меди и цинка на мембраны клеток корня. Повреждение мембран оценивалось по способности клеток поглощать краситель Эванс синий.

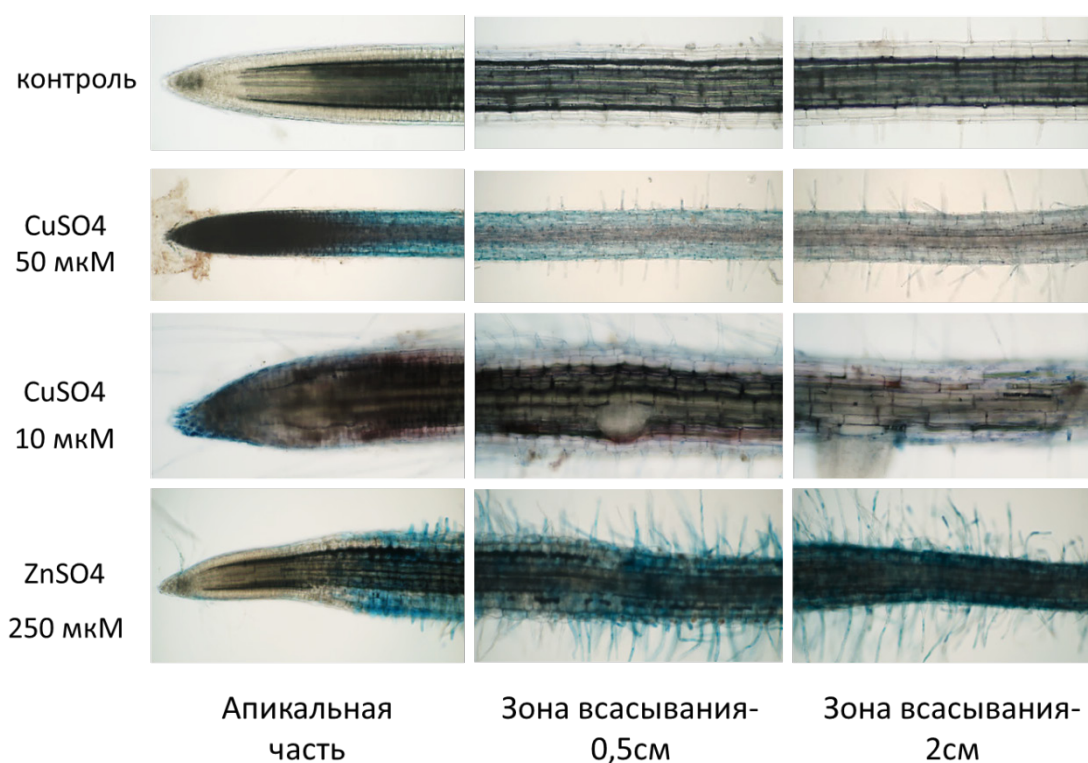


Рис. 6. Окрашивание клеток корня красителем Эванс синий в контрольных условиях и спустя 72 часа воздействия избытка металлов; светлое поле, увеличение $\times 10$.

Действие высокой концентрации меди вызывало повреждение мембран клеток в апикальной части корня уже спустя 1 час воздействия, а к окончанию опыта отмечалось повреждение мембран клеток на всю глубину корня (рис. 6). Напротив, при действии умеренного избытка меди заметное нарушение целостности мембран отмечалось только к окончанию опыта (рис. 6). При действии избытка цинка уже в первые часы отмечалось избирательное повреждение мембран клеток ризодермы, особенно заметное к окончанию опыта; при этом другие клетки корня практически не поглощали краситель (рис. 6).

5. Изменение содержания лабильных форм меди и цинка в тканях корня при избыточном содержании этих металлов в среде

Было сделано предположение, что различия в характере повреждения клеток корня при действии избытка меди и цинка могут быть связаны с дифференцированным накоплением в них лабильных форм данных металлов. Было решено установить, каким образом различия в накоплении лабильных форм меди и цинка в тканях корней связано с их повреждением, с помощью медь- и цинк-специфичных флуоресцентных красителей Phen Green SK и Newport Green DCF.

Действительно, при действии избытка цинка уже в первые часы опыта отмечалось существенное возрастание содержания лабильных форм цинка в клетках ризодермы, особенно заметное к окончанию опыта (рис. 7). Следовательно, именно ризодерма в корне была местом избирательного накопления наиболее подвижных форм данного металла, что вероятно, и приводило к наиболее выраженному нарушению целостности мембран клеток ризодермы (рис. 6).

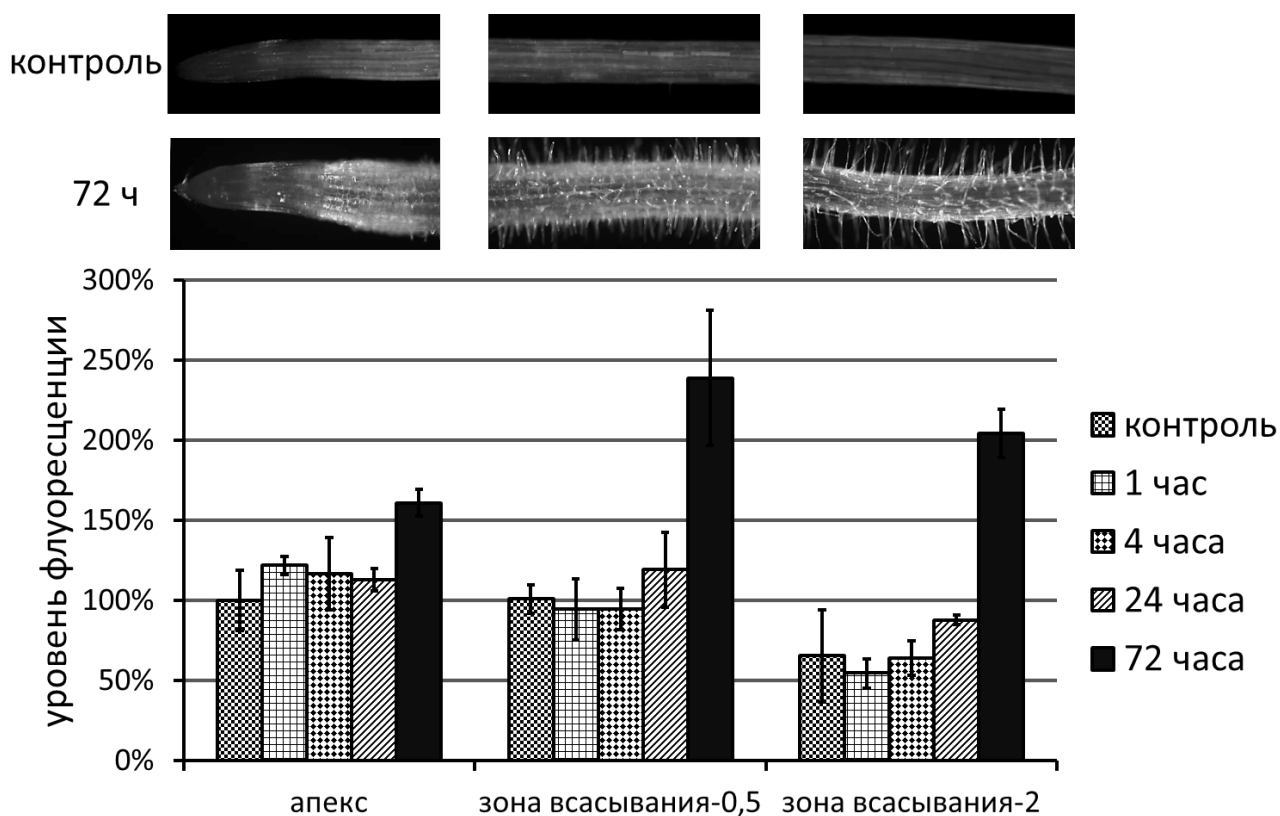


Рис. 7. Уровень флуоресценции красителя Newport Green DCF в тканях корня в контрольных условиях и при действии избытка цинка в течение 72 часов. Фильтр 44 FITC, увеличение x5. За 100% принят уровень флуоресценции в апикальной части корней контрольных растений.

При действии как высокого (рис. 8А), так и умеренного (рис. 8Б) избытка меди отмечалось дозозависимое возрастание содержания лабильных форм этого металла во всей толще корня уже в первые часы опыта. Таким образом, при действии избытка меди и цинка действительно наблюдается значительное повышение уровня внутриклеточного содержания лабильных форм этих металлов по сравнению с контрольными условиями.

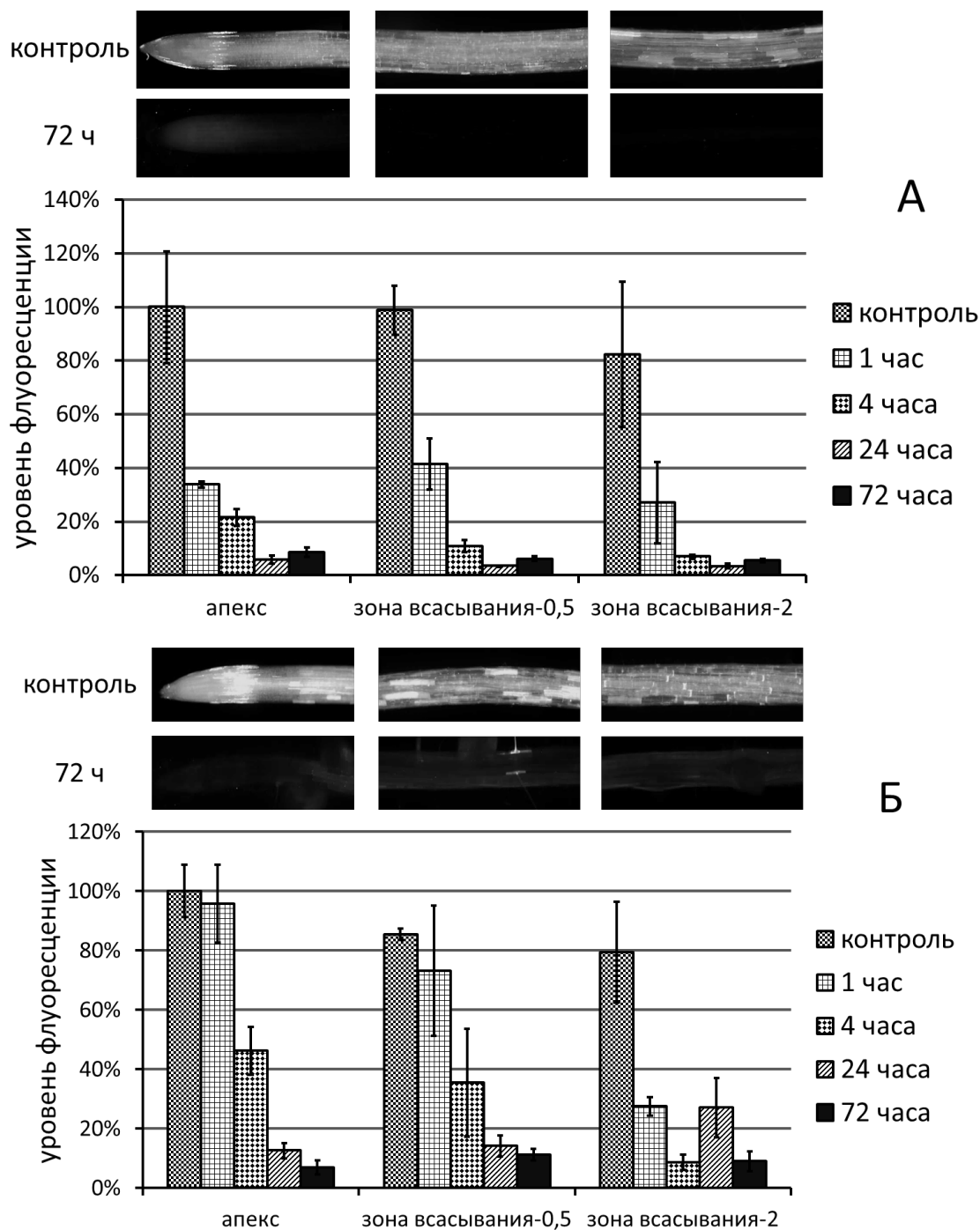


Рис. 8. Уровень флуоресценции красителя Phen Green SK в тканях корня при действии высокой (А) и умеренной (Б) концентрации ионов меди в течение 72 часов. Фильтр 44 FITC, увеличение x5. За 100% принят уровень флуоресценции в апикальной части корней контрольных растений.

6. Влияние избытка меди и цинка на содержание глутатиона в клетках корня

Глутатион является одним из важнейших компонентов защитных механизмов растительной клетки при действии на нее избытка ионов тяжелых металлов. Так, действие избытка тяжелых металлов может сопровождаться расходом восстановленного глутатиона (GSH) на синтез фитохелатинов и его окислением до GSSG; кроме того, молекулы GSH могут быть напрямую вовлечены в связывание ионов меди и цинка. Для исследования возможной роли молекул GSH в связывании ионов металлов *in situ* необходимо сопоставить изменения в содержании восстановленного, окисленного и общего глутатиона (Ortega-Villasante et al., 2005).

Сначала было определено действие избытка меди и цинка на содержание в клетках корня общего и окисленного глутатиона. Обнаружено, что при действии ионов меди в обеих концентрациях содержание общего глутатиона имело тенденцию к возрастанию (рис. 9А), а степень его окисленности снижалась (рис. 9Б). Действие избытка цинка также не вызывало значительных изменений в содержании общего глутатиона и существенно снижало степень его окисленности (рис. 9А, Б).

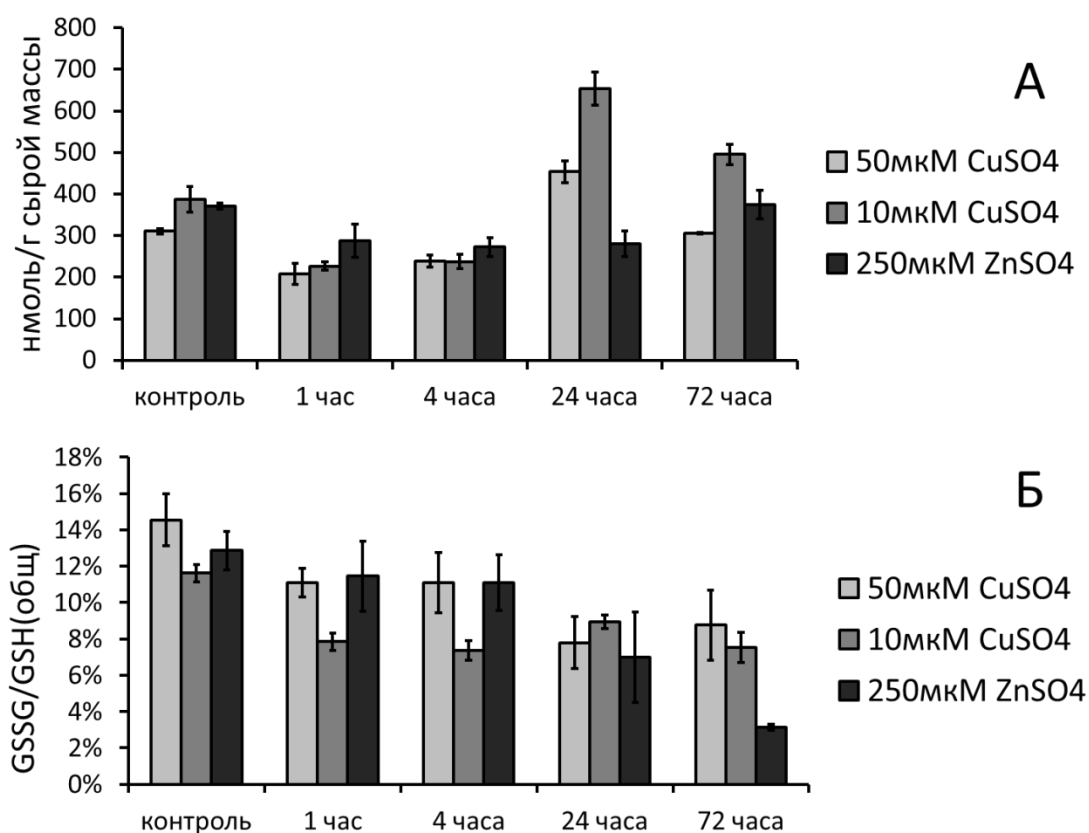


Рис. 9. Содержание общего глутатиона (А) и отношение количества окисленного глутатиона (GSSG) к общему (GSH(общ)) (Б) в корнях рапса при действии избытка ионов меди и цинка.

В то же время, содержание восстановленного глутатиона (GSH) при действии высокой концентрации ионов меди резко снижалось уже в первые часы воздействия, а к окончанию опыта восстановленный глутатион в корне практически отсутствовал (рис. 10А). При действии умеренного избытка ионов меди, напротив, значительный пул GSH сохранялся в тканях корня в ходе всего опыта (рис. 10Б).

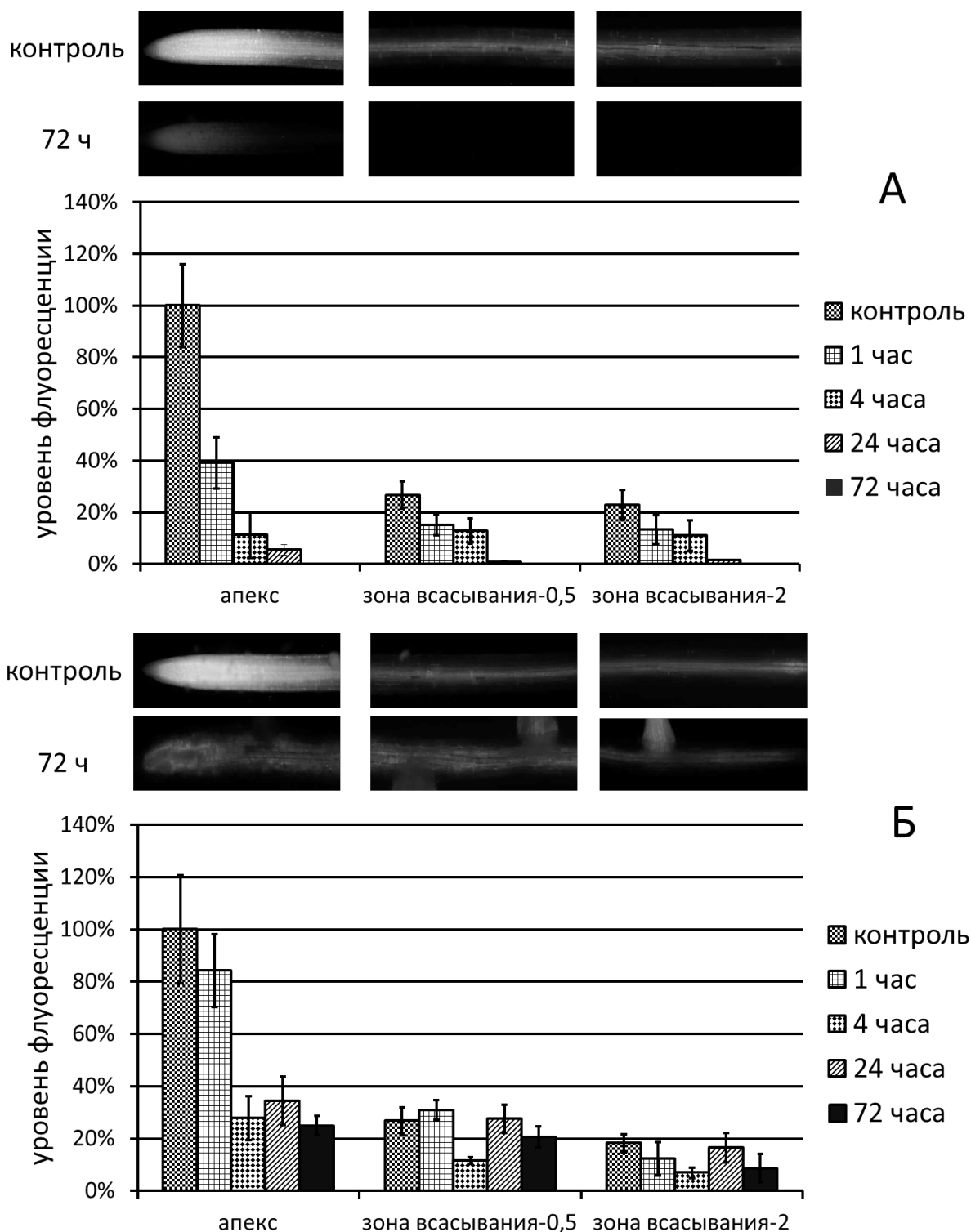


Рис. 10. Уровень флуоресценции комплексов биман-SG при действии высокой (А) и умеренной (Б) концентрации сульфата меди. Фильтр 49 DAPI, увеличение x5. За 100% принят уровень флуоресценции в апикальной части корней контрольных растений.

В отличие от меди в высокой концентрации, действие избытка цинка не вызывало значительного снижения содержания восстановленного глутатиона в тканях корня (рис. 11). По всей видимости, восстановленный глутатион является одним из основных хелаторов избытка ионов меди в клетках корня рапса, но не играет подобной роли для ионов цинка.

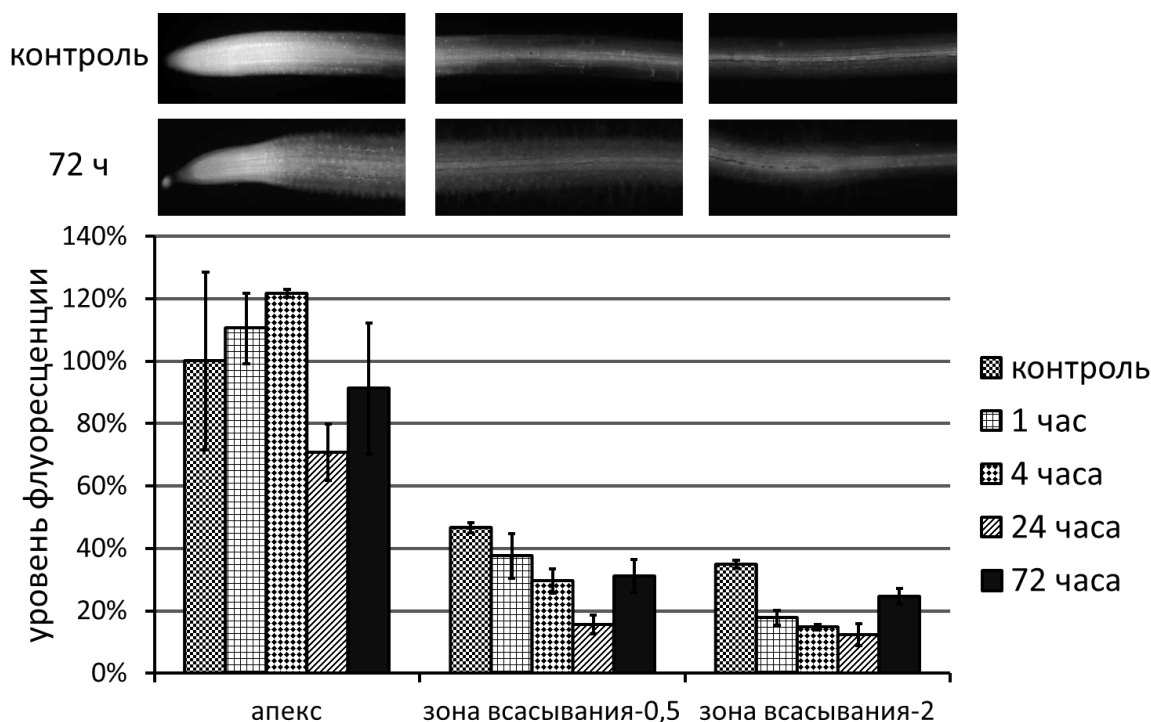


Рис. 11. Уровень флуоресценции комплексов биман-SG при действии избытка цинка. Фильтр 49 DAPI, увеличение x5. За 100% принят уровень флуоресценции в апикальной части корней контрольных растений.

7. Влияние избытка меди и цинка на развитие перекисного окисления липидов мембран и накопление супероксид-радикала в корне

Изменение содержания восстановленного глутатиона может иметь значительные последствия для клетки в условиях действия избытка тяжелых металлов. Известно, что наличие в клетке значительного пула восстановленного глутатиона необходимо для поддержания нормального уровня восстановленности SH-групп белков плазмалеммы (Kosower et al., 1982; Johnson et al., 1994). В то же время, именно окисление сульфгидрильных групп белков плазмалеммы является одним из основных механизмов повреждающего действия меди на плазматическую мембрану клеток покрытосеменных растений (Meharg, 1993). Т.к. при действии высокой концентрации меди наблюдалось резкое снижение содержания в корне восстановленного глутатиона (см. рис. 10А), то можно ожидать, что в таких условиях должна быть нарушена

способность клеток восстанавливать SH-группы белков плазмалеммы, что приведет к нарушению нормальной проницаемости клеточных мембран.

С другой стороны, глутатион за счет своей восстановительной активности может служить агентом для восстановления ионов Cu^{2+} до Cu^+ на плазмалемме клеток, приводя тем самым к генерации супероксид-радикала и провоцируя развитие ПОЛ (Hochstein et al., 1980; Kumar et al., 1978). Следовательно, восстановленный глутатион может играть двойственную роль в развитии повреждения плазмалеммы при действии токсических концентраций ионов меди. С одной стороны, он поддерживает нормальную восстановленность сульфгидрильных групп белков плазмалеммы, что предотвращает ее повреждение, а с другой стороны – может провоцировать развитие ПОЛ путем опосредованного участия в восстановлении ионов меди. В связи с тем, что при действии ионов меди в двух исследованных концентрациях наблюдались значительные различия в содержании в клетках корня восстановленного глутатиона, было решено определить, каким образом действие избытка меди отражается на содержании в тканях супероксид-радикала и уровне перекисного окисления липидов мембран.

Уровень ПОЛ в корне оценивали с помощью флуоресцентного красителя image-iT Lipid Peroxidation Kit по изменению соотношения между флуоресценцией в зеленой области, соответствующей окисленной форме красителя, и красной области, соответствующей восстановленной форме – рост соотношения означал возрастание уровня ПОЛ. Содержание супероксид-радикала в тканях корня оценивали по интенсивности окрашивания нитросиним тетразолием.

Воздействие 50 мкМ CuSO_4 уже в первые часы опыта вызывало примерно 2-кратное снижение уровня ПОЛ в тканях корня (рис. 12А). Также при действии высокой концентрации меди уже в первые часы происходило снижение содержания в корне супероксид-радикала, и к окончанию опыта ткани корня практически не окрашивались нитросиним тетразолием (рис. 15).

При действии умеренного избытка меди уровень соотношения 510/591 в корне оставался практически неизменным в ходе всего опыта (рис. 12Б); однако при этом наблюдалось значительное усиление флуоресценции окисленной формы красителя в периферической части клеток при длительном (более 24 часов) действии избытка металла (рис. 13), что свидетельствовало об усилении интенсивности перекисного

окисления липидов при длительном действии ионов меди в умеренной концентрации. Одновременно с этим, при длительном воздействии отмечалось возрастание содержания в тканях корня супероксид-радикала (рис. 15). Ранее было показано (Lukatkin et al., 2014), что наиболее выраженные симптомы окислительного стресса действительно наблюдаются при действии умеренных концентраций ионов меди.

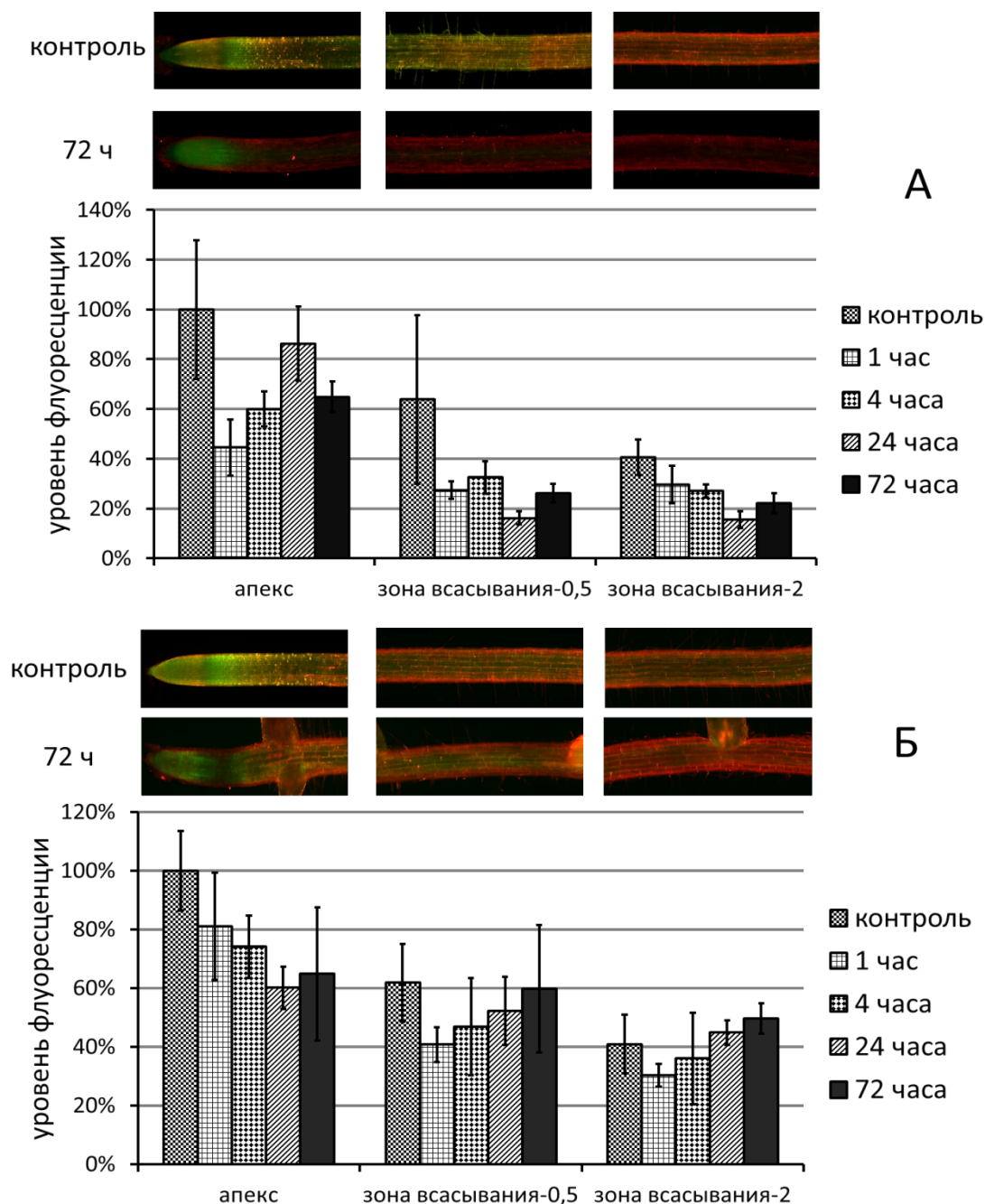


Рис. 12. Соотношение между флуоресценцией красителя image-iT в окисленной (510 нм, зеленая область) и восстановленной (591 нм, красная область) форме при действии ионов меди в высокой (А) и умеренной (Б) концентрации. Фильтры 44 FITC и 45 TR, увеличение x5. За 100% принят уровень флуоресценции в апикальной части корней контрольных растений.

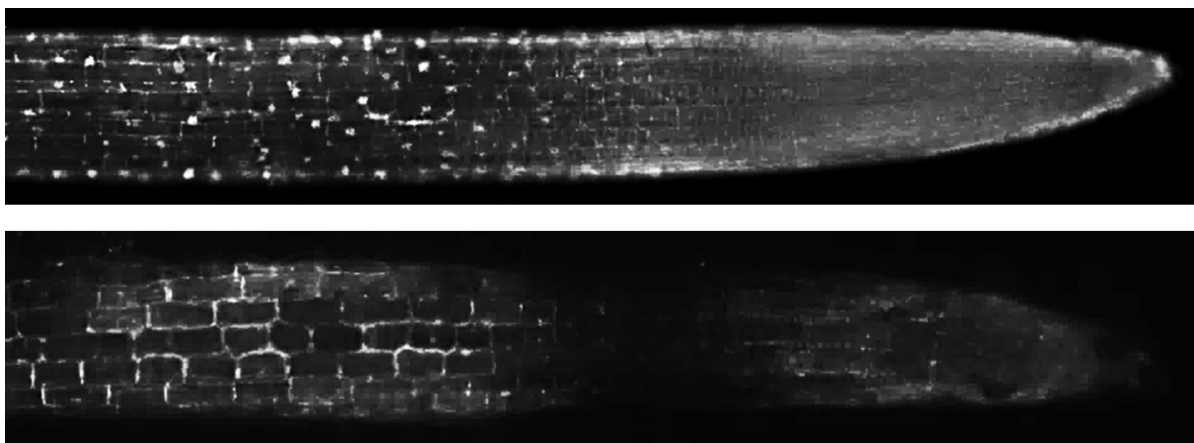


Рис. 13. Изменения в характере распределения флуоресценции окисленной формы красителя image-iT при действии умеренного избытка ионов меди (внизу) по сравнению с контролем (вверху). Фильтр 44 FITC, увеличение x5

Таким образом, при действии высокой концентрации меди в корнях снижались интенсивность ПОЛ и содержание супероксид-радикала, несмотря на наличие большого избытка редокс-активных ионов меди. Вероятно, это можно объяснить резким снижением содержания в клетках корня восстановленного глутатиона, наблюдавшемся при действии избытка меди (рис. 10А), что приводило к невозможности восстановления ионов Cu^{2+} до Cu^+ на плазмалемме. Напротив, при действии умеренного избытка меди, когда в клетках корня имелся значительный пул восстановленного глутатиона (рис. 10Б), наблюдалось усиление процессов ПОЛ и увеличение содержания супероксид-радикала в корне.

При действии избытка цинка к окончанию опыта в тканях апекса корня и в зоне всасывания уровень ПОЛ оставался примерно на уровне контрольных растений (рис. 14), а содержание супероксид-радикала значительно возрастало (рис. 15). Объяснить резкое возрастание содержания супероксид-радикала при действии избытка цинка достаточно трудно, т.к. ион Zn^{2+} редокс-неактивен. При этом, однако, следует отметить, что ранее для растений рапса уже отмечалось значительное возрастание содержания супероксид-радикала в корнях при действии избытка цинка (Feigl et al., 2014), хотя причина этого явления авторами не обсуждается.

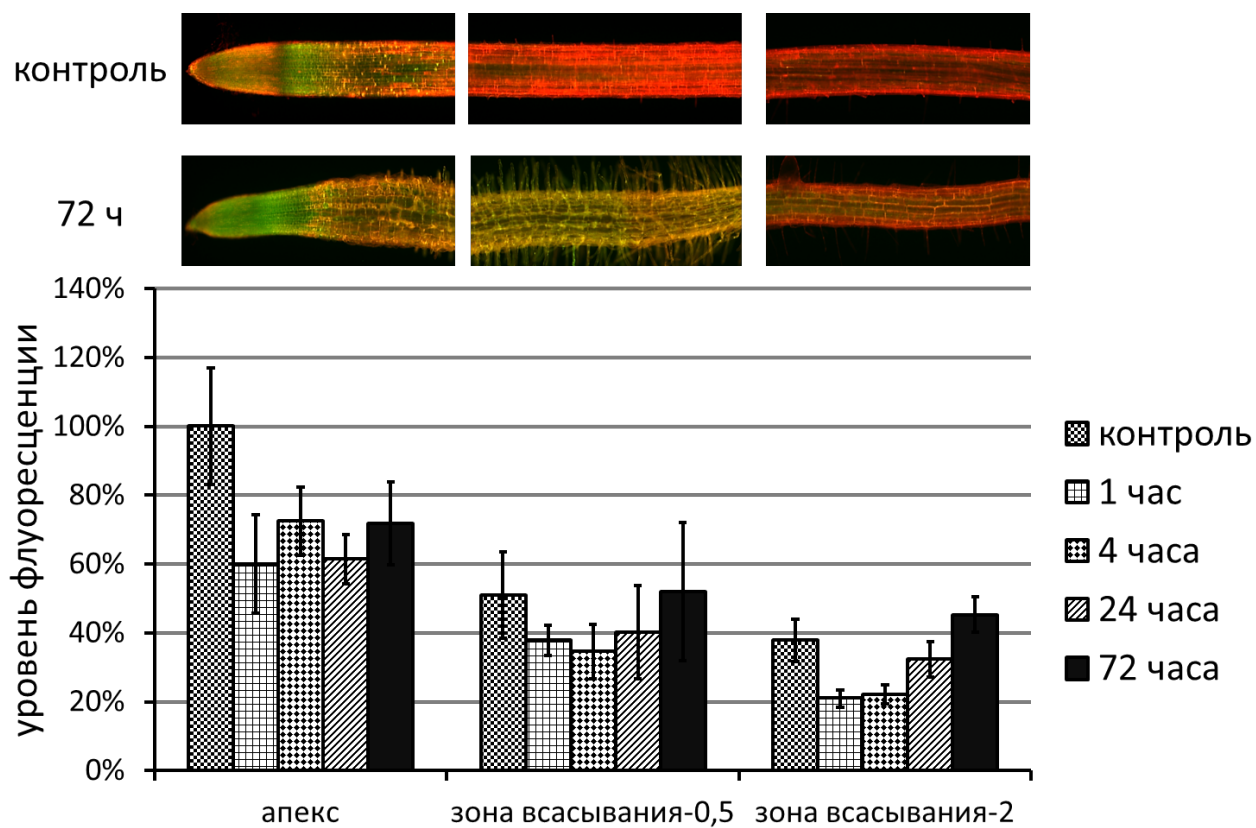


Рис. 14. Соотношение между флуоресценцией красителя image-iG в окисленной (510 нм, зеленая область) и восстановленной (591 нм, красная область) форме при действии избытка ионов цинка. Фильтры 44 FITC и 45 TR, увеличение x5. За 100% принят уровень флуоресценции в апикальной части корней контрольных растений.

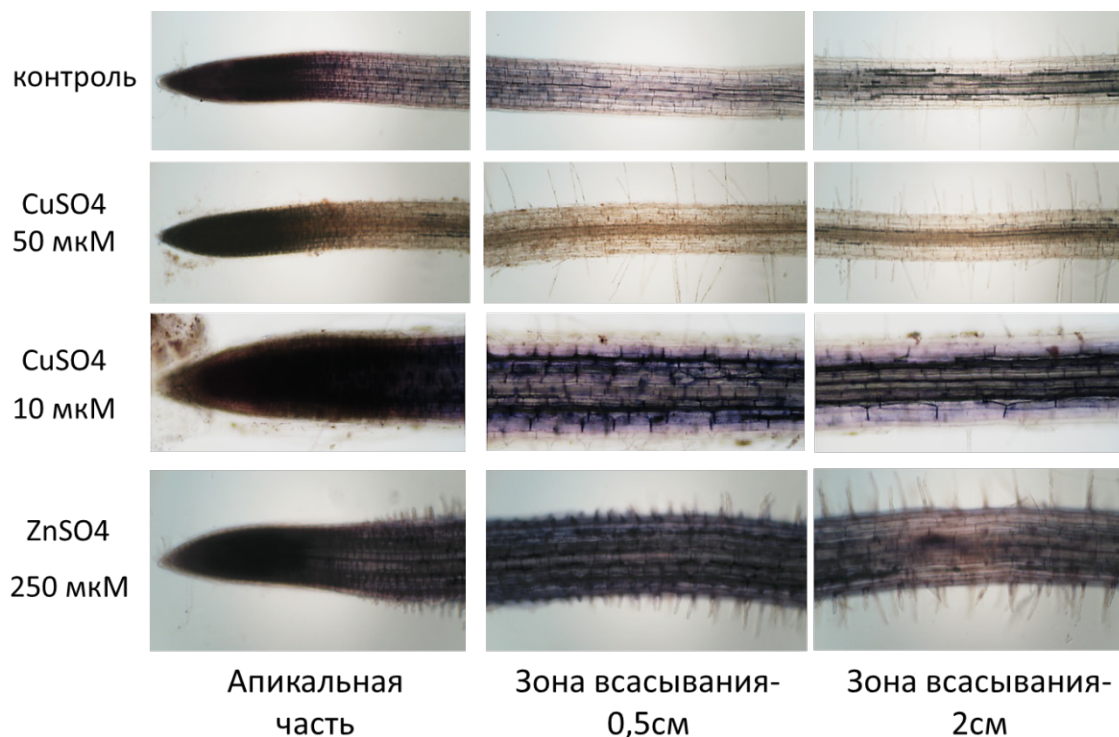


Рис. 15. Окрашивание клеток корня красителем нитросиний тетразолий в контрольных условиях и спустя 72 часа воздействия избытка металлов; светлое поле, увеличение x10.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В выполненной работе была предпринята попытка охарактеризовать связь между уровнем доступности меди и цинка во внутриклеточной среде, характером их связывания и развитием токсических эффектов на растениях рапса. Изучение ранних ответных реакций (начиная от 1 часа и до 3 суток воздействия) позволяло в динамике оценивать прямые токсические эффекты избыточных концентраций этих металлов.

Действие избытка меди приводило к значительному повышению содержания ее лабильных форм в клетках корня уже в первые часы воздействия. Повышение содержания лабильной меди сопровождалось нарушением целостности мембран клеток корня, которое носило дозозависимый характер и проявлялось уже в первые часы при действии высокой концентрации ионов меди. При этом в корне значительно усиливалась экспрессия генов, участвующих в хелатировании и транспорте ионов данного металла, а содержащийся в клетках восстановленный глутатион вовлекался в образование комплексов с ионами меди.

При действии избытка цинка в клетках ризодермы избирательно увеличивалось содержание лабильных форм этого металла и наблюдалось выраженное повреждение мембран, малозаметное в других клетках корня. При этом восстановленный глутатион не играл значительной роли в хелатировании избытка ионов цинка, в отличие от ионов меди.

Медь является редокс-активным металлом, способным напрямую участвовать в генерации активных форм кислорода. Тем не менее, при действии высокой концентрации ионов меди не было отмечено развития симптомов окислительного стресса: увеличения уровня перекисного окисления липидов мембран, повышения содержания в тканях корня супероксид-радикала и степени окисленности внутриклеточного пула глутатиона. Вероятной причиной этого может быть обнаруженный на фоне высокой концентрации меди дефицит восстановленного глутатиона. Напротив, при действии умеренного избытка ионов меди, при котором в клетках корня рапса обнаруживался значительный пул восстановленного глутатиона, значительно усиливались процессы перекисного окисления липидов мембран и генерации супероксид-радикала.

ВЫВОДЫ

1. Повышение экспрессии ряда генов детоксикации меди является одним из самых ранних стрессорных ответов растений рапса на избыточный уровень меди в питательной среде.

2. В клетках корня экспрессировалась большая группа генов раннего ответа на избыток меди, включая гены хелаторов (*PCS1*, *HIP06*) и транспортеров (*MRP1*, *MRP3*, *ZIP5*, *YSL2*) тяжелых металлов, уровень транскрипции которых был связан со скоростью увеличения содержания меди в тканях.

3. С помощью флуоресцентных красителей Phen Green SK и Newport Green DCF показано быстрое и дифференцированное по длине корня формирование значительного фонда лабильных форм меди и цинка в клетках корней рапса в ответ на повышение содержания этих ионов в среде.

4. Как для меди, так и для цинка наблюдалась зависимость между нарушением целостности мембран клеток корня и уровнем содержания в них лабильных форм этих металлов.

5. Действие избытка меди и цинка не вызывало истощения внутриклеточного пула глутатиона путем его окисления или расходования на синтез фитохелатинов.

6. Установлено, что восстановленный глутатион активно вовлекался в хелатирование ионов меди. При высокой концентрации меди в среде практически весь восстановленный глутатион уже на ранних стадиях стрессорного ответа расходовался на формирование комплексов с лабильными ионами меди.

7. При действии ионов меди в умеренной концентрации установлено усиление перекисного окисления липидов и генерации супероксида в клетках корней рапса, но такой эффект не проявлялся при высокой концентрации меди в среде. Возможной причиной могут быть различия в способности клеток восстанавливать сульфгидрильные группы мембранных белков.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1). **Zlobin I.E.**, Kholodova V.P., Rakhmankulova Z.F., Kuznetsov V.I.V. (2015) *Brassica napus* responses to short-term excessive copper treatment with decrease of photosynthetic pigments, differential expression of heavy metal homeostasis genes including activation of gene *NRAMP4* involved in photosystem II stabilization. *Photosynthesis Research*, 125, 141-150.
- 2). **Злобин И.Е.** (2015) Лабильный пул ионов меди как необходимый компонент системы ее клеточного гомеостатирования. *Вестник Томского государственного университета. Биология*, 31, 67–83.
- 3). **Злобин И.Е.**, Карташов А.В., Иванов Ю.В., Холодова В.П. (2015) Роль восстановленного глутатиона в хелатировании избытка ионов меди и цинка в клетках корня рапса. В сб.: *Научная конференция и школа для молодых ученых «Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений»*, Москва, стр. 270-274.
- 4). **Злобин И.Е.**, Холодова В.П. (2013) Возможное участие транспортеров ряда семейств в детоксикации избытка ионов меди растениями рапса. В сб. тезисов: *Всероссийская научная конференция с международным участием «Инновационные направления современной физиологии растений»*, Москва, стр. 274-275.
- 5). **Злобин И.Е.**, Холодова В.П. (2013) Воздействие избыточных концентраций ионов меди на экспрессию ряда генов гомеостаза тяжелых металлов в растениях *Brassica napus*. В сб. тезисов: *IX Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы экологии – 2013»*, Гродно (Беларусь), стр. 140-142.
- 6). **Злобин И.Е.**, Холодова В.П. (2013) Воздействие избыточных концентраций ионов меди в среде на экспрессию ряда генов гомеостаза тяжелых металлов в растениях *Brassica napus*. В сб. тезисов: *V Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины»*, Ростов-на-Дону, стр. 164-165.

7). Kuznetsov V.I.V., **Zlobin I.E.** and Kholodova V.P. (2013) Copper excess differently affects a set of heavy metal-related genes in roots and leaves of juvenile oil rape plants. В сб. тезисов: *3rd national conference on science and technology*, Луанда (Ангола), стр. 23.

8). **Злобин И.Е.** (2013) Воздействие избыточных концентраций ионов меди в среде на экспрессию ряда генов гомеостаза тяжелых металлов в растениях *Brassica napus*. В сб. тезисов: *XIII Международная конференция молодых учёных «Леса Евразии – удмуртский лес»*, Ижевск, стр. 119-121.

9). **Злобин И.Е.**, Карташов А.В., Холодова В.П. (2015) Ранние физиологические эффекты избыточных концентраций меди и цинка на растениях *Brassica napus*. В сб. тезисов: *VIII съезд общества физиологов растений России «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий»*, Петрозаводск, стр. 207.