

*На правах рукописи*



**БАКЛАНОВ**  
**Илья Андреевич**

**Накопление, распределение и действие никеля  
на растения-гипераккумуляторы и исключатели  
из рода *Alyssum***

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена в лаборатории физиологии корня Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва.

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор

**Иванов Виктор Борисович**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук

кандидат биологических наук, доцент

**Носов Александр Владимирович**

**Пильщикова Наталия Владимировна**

**Ведущая организация:** Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова

Защита состоится «15» ноября 2011 г. в 11 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.

Факс: (495) 977 8018, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

Автореферат размещен на сайте ИФР РАН по адресу [www.ippras.ru](http://www.ippras.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

**Автореферат разослан «13» октября 2011 г.**

Ученый секретарь

совета по защите докторских

и кандидатских диссертаций

кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** В настоящее время одним из актуальных вопросов экофизиологии растений является изучение действия тяжелых металлов и устойчивости к ним. Действие никеля (Ni) на растения до сих пор остается мало изученным. Ионы тяжелых металлов, поступая в растительный организм, способны связываться с различными функциональными группами биоорганических молекул. По сравнению с наиболее изученными тяжелыми металлами – цинком, кадмием и свинцом, которые образуют связь преимущественно с сульфгидрильными группами, Ni способен связываться с имидазольной группой гистидина. Вследствие этого для Ni характерна специфика подавляемых в клетке реакций по сравнению с другими тяжелыми металлами, но, несомненно, есть и общие закономерности их токсического действия. Поэтому изучение действия Ni весьма актуально как для понимания общих закономерностей реакции растений на тяжелые металлы, так и для установления особенностей накопления, распределения Ni и его действия на растения.

Разные виды растений отличаются по устойчивости к тяжелым металлам и способности к их накоплению. Baker предложил классификацию, по которой разделил растения на две основные группы: исключатели, накапливающие тяжелые металлы преимущественно в подземной части и ограничивающие их поступление в побег, и аккумуляторы, способные накапливать тяжелые металлы в значительных количествах в надземных органах (Baker et al., 1981). Небольшую группу среди аккумуляторов составляют растения-гипераккумуляторы, накапливающие в побеге, в случае Ni, более 1000 мкг/г сухой массы.

Хотя исследования накопления и тканевого распределения Ni у растений-гипераккумуляторов и исключателей начали проводиться достаточно давно и продолжаются в настоящее время, но до сих пор не было проведено сравнительного изучения физиологии этих растений. Механизмы гипераккумуляции Ni и их физиологические основы остаются мало изученными. Одним из подходов для их понимания и объяснения является сравнительный анализ близкородственных видов растений-гипераккумуляторов и исключателей на разных уровнях организации –

организменном, тканевом и клеточном. Такие исследования проводились ранее (Krämer U. et al., 2000; Küpper H. et al., 2001; Серегин, Кожевникова, 2008; Richau et al., 2009; Серегин, 2010), но пока еще на малом числе объектов и настоящая работа является продолжением исследований в этом направлении. В ней впервые было проведён комплексный сравнительный анализ некоторых аспектов физиологии гипераккумуляторов и исключателей из рода *Alyssum*.

**Цели и задачи исследования.** Целью диссертационной работы являлся сравнительный анализ действия Ni на рост, его передвижения, распределения и накопления в растениях-гипераккумуляторах и исключателях из рода *Alyssum*.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить действие Ni на рост растений-гипераккумуляторов и исключателей из рода *Alyssum*.
2. Установить закономерности накопления и тканевого распределения Ni в этих растениях.
3. Исследовать ультраструктуру клеток корней сравниваемых видов растений в связи с особенностями ближнего транспорта Ni.
4. Сопоставить эффективность загрузки Ni в ксилему и поток воды по ксилеме в побег у сравниваемых видов.

**Научная новизна.** В работе впервые дан сравнительный анализ физиологических особенностей растений-гипераккумуляторов и исключателей из рода *Alyssum*. Дана количественная оценка токсичности Ni по степени развития некрозов на листьях и замедлению роста растений. Сопоставлено действие Ni на скорость роста и накопление сухой массы, определено накопление Ni в разных органах и рассчитана интенсивность накопления Ni, эффективность поглощения Ni корнями и его транслокация в побег у разных видов. Показано, что тканевое распределение Ni у различных видов растений из рода *Alyssum*, контрастных по устойчивости к действию Ni (гипераккумуляторы и исключатели), существенно различается. Установлены существенные различия в ультраструктуре корней сравниваемых видов. Обнаружены четкие различия между исключателями и

гипераккумуляторами по интенсивности транспирации и концентрации  $N_i$  в пасоке, что позволило объяснить возможные причины различий между сравниваемыми видами по скорости транслокации  $N_i$  в побег.

**Теоретическая и практическая значимость.** Полученные результаты вносят существенный вклад в экологическую физиологию растений и экологическую ботанику. Выявленные особенности физиологии гипераккумуляторов рекомендуется учитывать при разработке методов очистки загрязненных территорий с помощью растений (фиторемедиации). Полученные данные можно использовать в курсах лекций по физиологии растений.

**Апробация работы.** Материалы данной работы представлены на XVI, XVII и XVIII Международных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов" (Москва, 2009-2011), на Международной научной конференции "Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера" (Апатиты, 2009), на Всероссийском симпозиуме "Растение и стресс" (Москва, 2010), на XV Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых "БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА" (Пущино, 2011), а также на конференциях молодых ученых ИФР РАН (Москва, 2009, 2010) и семинарах лаборатории физиологии корня ИФР РАН (Москва, 2008-2011).

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 163 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследований, результатов и обсуждения, заключения, выводов и приложения. Работа содержит 41 таблицу и 42 рисунка. Список литературы включает 158 источников, из них 137 иностранных авторов.

## **ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Выращивание растений.** Семена гипераккумуляторов *Alyssum lesbiacum* (Candargy) Rech.f., *A. obovatum* (C.A. Mey.) Turcz. и исключателей *A. saxatile* L. ssp. *saxatile*, *A. saxatile* L. ssp. *orientale* (Ard.) Rech. проращивали в вермикулите, смоченном водой. Недельные проростки пересаживали в вегетационные пластиковые

сосуды объемом 1 литр (по 4 проростка в один сосуд) на  $\frac{1}{4}$  питательного раствора Хогланда. Растения выращивали в течение одного месяца, после чего переносили их на раствор Хогланда с добавлением  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (10, 30, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 1000 мкМ для гипераккумуляторов и 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50 мкМ для исключателей) и выращивали в течение ещё одного месяца. Питательный раствор сменяли еженедельно. Контролем служили растения, выращенные без добавления  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Проращивание семян и выращивание растений осуществляли в факторостатной камере Lab-Line Biotronette Mark II Plant Growth Chamber (Barnstead, США) при 16-часовом световом дне, 23/18°C дневной/ночной температуре, относительной влажности воздуха ~75%.

**Измерение морфометрических показателей.** Измеряли длину главного побега (от основания до апекса главного побега) и длину самого длинного корня (от корневой шейки до кончика самого длинного корня), а также подсчитывали число листьев у контрольных и опытных растений. После этого отделяли друг от друга листья, стебли и корни растений, взвешивали, высушивали их в термошкафу при 60°C в течение суток и определяли их сухую массу. Измерения проводили не менее чем на 8 растениях на вариант в двух независимых экспериментах.

**Оценка развития и состояния листьев.** От растений отделяли листья, раскладывали на стекле сканера CanoScan LiDE 70 (Canon, Япония) и осуществляли их сканирование. Полученные изображения листьев анализировали с помощью программ Adobe Photoshop 7.0 и ImageJ 1.41o и измеряли площадь здоровых и покрытых хлорозами и некрозами участков листьев, а также общую площадь листовой поверхности.

**Количественное определение Ni.** Подготовку проб растительного материала осуществляли по модифицированной методике (Shaumlöffel, 1960). Корни, стебли и листья контрольных и опытных растений высушивали до воздушно-сухого веса и озоляли в смеси кислот (1,5 мл 65%  $\text{HNO}_3$ , 0,8 мл 65%  $\text{HClO}_4$ , 0,2 мл концентрированной  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Измерение концентрации Ni проводили на пламенном атомно-абсорбционном спектрофотометре Hitachi 207 (Hitachi, Япония), не менее чем

в 8 пробах на вариант в двух независимых экспериментах.

**Гистохимический анализ распределения Ni** проводили с помощью диметилглиоксимной методики (Серегин и др., 2003). Стальным лезвием от руки приготавливали тонкие срезы апикального, среднего и базального участков корней, стеблей и листьев контрольных и опытных растений, выращенных при 30 (гипераккумуляторы и исключатели) и 300 (гипераккумуляторы) мкМ  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Срезы обрабатывали раствором диметилглиоксима (1%-ный раствор диметилглиоксима в 1,5%-ном растворе NaOH, содержащий 0,05 М  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , рН 9,8-10,4), приготавливали временные препараты и просматривали на световом микроскопе CX 41 (Olympus, Япония). О присутствии Ni судили по малиново-красному окрашиванию его комплексов с диметилглиоксимом, концентрацию ионов в клетках тканей оценивали полуколичественно по интенсивности окрашивания. Анализ распределения Ni для каждого варианта проводили не менее чем на 4 растениях в двух независимых экспериментах.

**Электронно-микроскопические исследования.** Отбирали 10-12 небольших фрагментов (по 3-5 мм) апикальных и средних участков корней растений *A. lesbiacum* и *A. saxatile* L. ssp. *saxatile*, выращенных при 30 мкМ  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (опыт) и в его отсутствие (контроль). Фрагменты корней фиксировали глутаральдегидом и  $\text{OsO}_4$  по стандартной методике, обезвоживали путем проводки через спирты возрастающей концентрации и ацетон и заливали в смесь эпоксидных смол на основе эпон 812. Полутонкие и ультратонкие срезы получали на ультратоме OM U3 (Reichert, Австрия). Срезы переносили на медные сетки с подложкой, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу и просматривали на трансмиссионном электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, Германия).

**Сбор пасоки и определение содержания Ni в ней.** 1-месячные растения *Alyssum* spp. пересаживали в вегетационные сосуды на  $\frac{1}{4}$  питательного раствора Хогланда с добавлением 30 мкМ  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Контролем служили растения, пересаженные на питательный раствор без добавления  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Через 4 часа после пересадки у каждого растения удаляли побег и на корневую шейку надевали

мягкую силиконовую трубку, соединенную с микропробиркой. Сосуды с растениями оставляли в темноте на одни сутки. Аликвоты полученной пасоки разбавляли бидистиллированной водой. Измерение концентрации Ni в пасоке проводили на атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно-связанной плазмой SA-2000 (LECO, США), не менее чем в 8 пробах на вариант в двух независимых экспериментах.

**Измерение интенсивности транспирации** осуществляли весовым методом по стандартной методике (Сказкин и др., 1958). Массу испарившейся воды фиксировали каждые 5 минут. Интенсивность транспирации рассчитывали по формуле:

$$ИТ = \frac{12 \cdot m_{\text{ср.}}}{S_{\text{тр.л.}} + S_{\text{тр.ст.}}},$$

где

ИТ – интенсивность транспирации, г / см<sup>2</sup> · ч,

m<sub>ср.</sub> – масса воды, испарившаяся за 5 минут, средняя по 3 повторностям, г,

S<sub>тр.л.</sub> – транспирирующая (непокрытая некрозами) площадь листьев, см<sup>2</sup>,

S<sub>тр.ст.</sub> – транспирирующая (непокрытая некрозами) площадь стеблей, см<sup>2</sup>.

**Анализ накопления и распределения Ni в растениях *A. obovatum*, собранных в местах природного произрастания.** В августе 2009 и 2010 гг. собирали растения, произрастающие на серпентиновых почвах на склонах долины ручьев Кердвоменшор и Нырдовоменшор горного массива Рай-Из (Полярный Урал, Ямало-Ненецкий автономный округ, Россия). Участки, на которых осуществляли сбор растений, представляли собой типичные экотопы на данной территории. На каждом участке было собрано не менее 10 одновозрастных растений, у которых физико-химическими и гистохимическим методами было определено накопление Ni в различных органах и его тканевое распределение.

**Статистическую обработку полученных данных** проводили с помощью Пакета анализа программы Microsoft Office Excel 2007. Для каждой группы данных рассчитывали среднее, стандартную ошибку среднего. О достоверности различий результатов измерений в контрольных и опытных группах судили по результатам t-статистики по Стьюденту (двухвыборочный t-тест с различными дисперсиями).

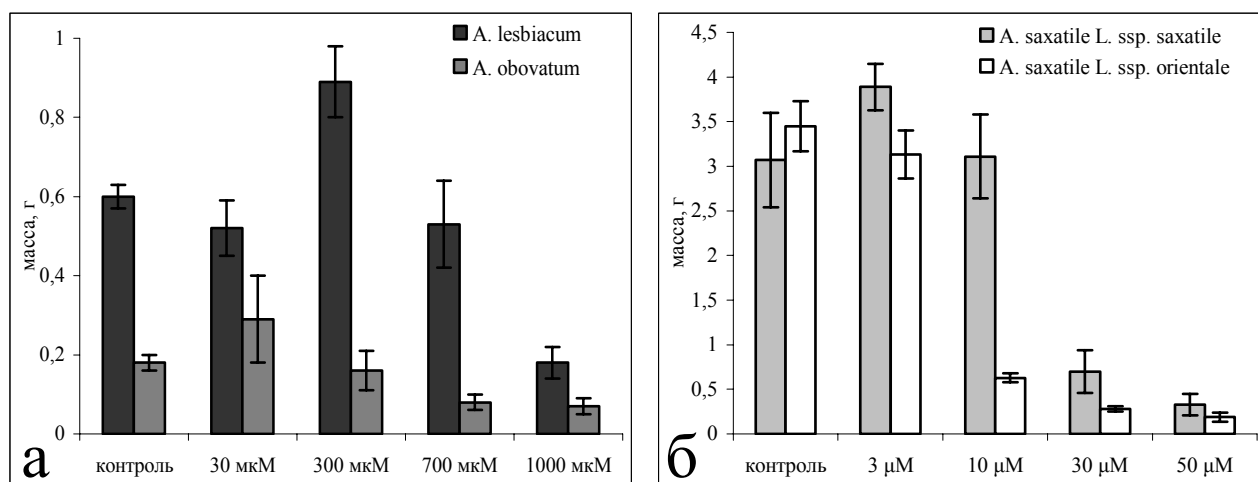


## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Действие Ni на рост растений-гипераккумуляторов и исключателей.

Растения-гипераккумуляторы (выращенные в присутствии  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  и в его отсутствие) характеризовались развитием более компактного побега, по сравнению с исключателями. Разные виды гипераккумуляторов заметно различались по скорости роста (рис.1,а). Для обоих видов максимальная сырая масса наблюдалась при повышении концентрации Ni в среде, но при разных концентрациях (30 и 300 мкМ для *A. lesbiacum* и *A. obovatum*, соответственно). При дальнейшем повышении концентрации Ni (700 и 1000 мкМ) в среде рост растений тормозился и сырая масса уменьшалась.

У исключателей достоверного увеличения сырой массы с увеличением концентрации Ni не отмечалось. Напротив, у них наблюдалось торможение роста и снижение сырой массы растений при гораздо более низких концентрациях  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , чем у гипераккумуляторов (рис.1,б).

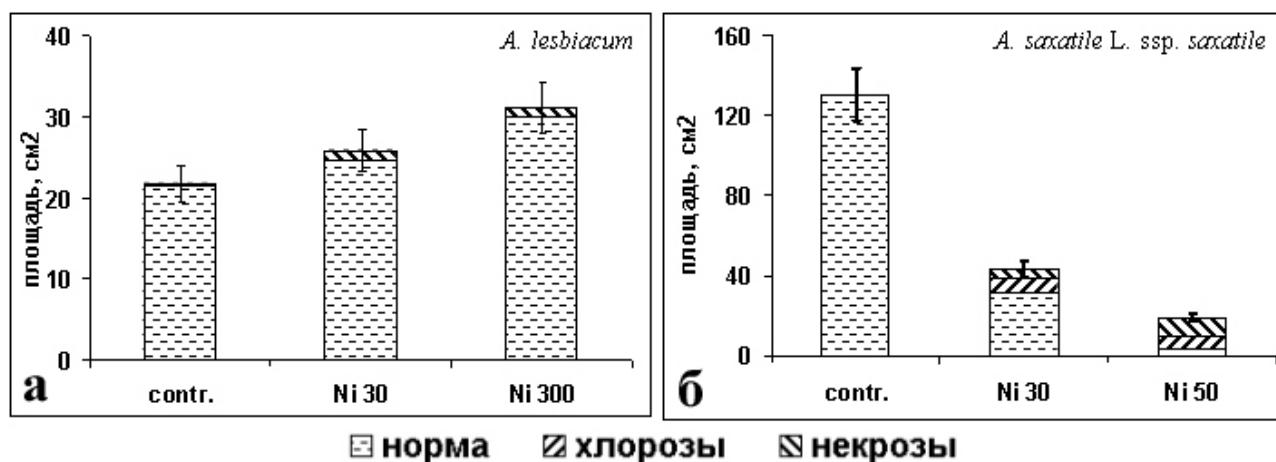


**Рис. 1.** Сырая масса листьев гипераккумуляторов *A. lesbiacum* и *A. obovatum* (а) и исключателей *A. saxatile* ssp. *saxatile* и *A. saxatile* ssp. *orientale* (б), выращенных при различных концентрациях  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Представлены средние значения и их стандартные ошибки для 8 растений из двух независимых экспериментов; данные для отдельных экспериментов статистически не отличались.

Линейные показатели (длина главного побега и длина наиболее длинного корня) были менее подвержены действию Ni. Увеличение длины главного побега наблюдалось лишь у *A. lesbiacum* при 10 мкМ  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , а при высоких

концентрациях  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  в питательном растворе (600-1000 мкМ) она снижалась у обоих гипераккумуляторов. У исключателя *A. saxatile* ssp. *saxatile* Ni не подавлял рост главного побега и самого длинного корня до концентрации 50 мкМ, тогда как у исключателя *A. saxatile* ssp. *orientale* наблюдалось уменьшение длины главного побега при 5-50 мкМ  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  и уменьшение длины самого длинного корня при 3 и 20-50 мкМ  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

Как для гипераккумуляторов, так и для исключателей было установлено изменение площади листовой поверхности при действии Ni. У гипераккумуляторов, она возрастала с увеличением концентрации Ni в среде выращивания и лишь при высоких концентрациях (700 и 1000 мкМ) она снижалась и наблюдались хлорозы апексов главных побегов, а также по сравнению с контролем возрастала доля некрозов листьев (рис.2,а). У исключателей при значительно более низких концентрациях площадь листьев резко уменьшалась и при этом увеличивалась доля хлорозных и некрозных участков (рис.2,б), но некрозов апексов побегов не было.



**Рис. 2.** Площадь поверхности листьев гипераккумулятора *A. lesbiacum* (а) и исключателя *A. saxatile* L. ssp. *saxatile* (б), выращенных при различных концентрациях  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Представлены средние значения и их стандартные ошибки для 8 растений из двух независимых экспериментов; данные для отдельных экспериментов статистически не отличались.

**Накопление Ni в различных органах растений-гипераккумуляторов и исключателей.** У растений, выращенных при 30 мкМ  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , существенно различалось накопление Ni в различных органах. У гипераккумуляторов Ni накапливался преимущественно в побегах, а в корнях его было меньше. У

исключателей Ni накапливался в корнях и присутствовал в надземных органах в значительно меньших количествах.

Как разные гипераккумуляторы, так и разные исключатели отличались по способности накапливать Ni. В побеге *A. lesbiacum* Ni накапливалось больше по сравнению с *A. obovatum*, причем у *A. lesbiacum* Ni накапливался практически в одинаковых количествах как в листьях, так и в стеблях, а у *A. obovatum* отмечалось преимущественное накопление Ni в листьях. У исключателя *A. saxatile* L. ssp. *saxatile* Ni во всех органах накапливался в больших количествах по сравнению с *A. saxatile* L. ssp. *orientale*. Однако для обоих исключателей было характерно уменьшение концентрации Ni в ряду "корни – стебли – листья" (табл. 1). С увеличением концентрации Ni в среде выращивания гипераккумуляторов увеличивалось его накопление, однако характер накопления не изменялся: при всех концентрациях Ni в среде он преимущественно накапливался в побегах (табл. 2).

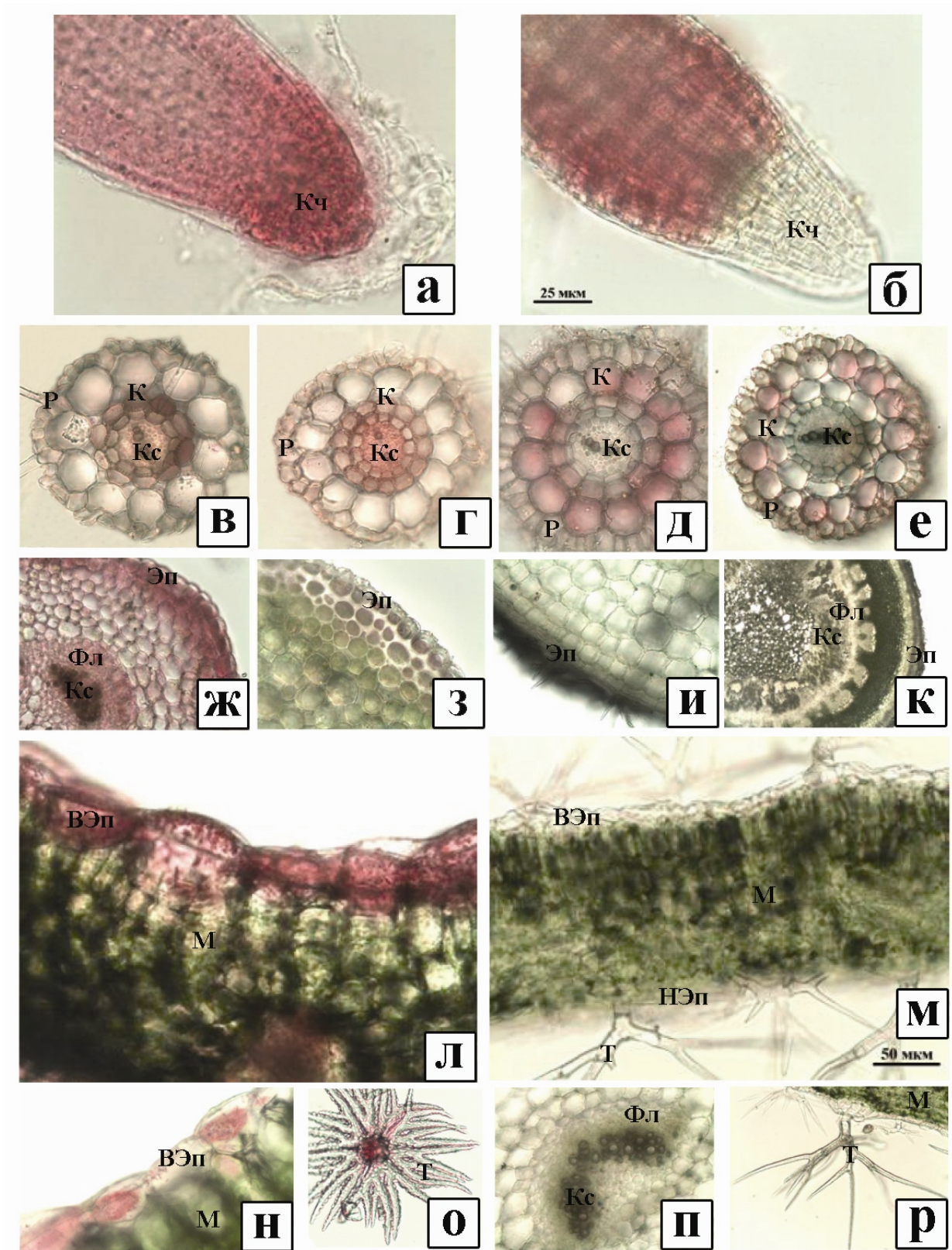
**Таблица 1.** Содержание Ni в различных органах *Alyssum* spp., выращенных при 30 мкМ Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, мкг/г сухой массы. Представлены средние и их стандартные ошибки.

Органы растений	<i>A. lesbiacum</i>	<i>A. obovatum</i>	<i>A. saxatile</i> L. ssp. <i>saxatile</i>	<i>A. saxatile</i> L. ssp. <i>orientale</i>
листья	1217,2 ± 70,5	668,8 ± 93,9	315,6 ± 28,1	82,0 ± 13,6
стебли	1477,2 ± 46,3	299,2 ± 54,8	454,4 ± 73,5	181,6 ± 13,5
корни	646,5 ± 22,1	243,7 ± 43,4	950,0 ± 154,7	355,0 ± 11,0

**Таблица 2.** Содержание Ni в различных органах растений-гипераккумуляторов из рода *Alyssum*, выращенных при 300 мкМ Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, мкг/г сухой массы. Представлены средние и их стандартные ошибки.

Органы растений	<i>A. lesbiacum</i>	<i>A. obovatum</i>
листья	4242,1 ± 691,9	2377,5 ± 258,3
стебли	4835,6 ± 690,8	1079,3 ± 162,4
корни	2556,2 ± 701,9	1148,3 ± 223,8

**Распределение Ni по тканям растений-гипераккумуляторов и исключателей.** Во всех исследованных видах было изучено распределение Ni по тканям и установлено, что оно принципиально различается у гипераккумуляторов и исключателей, а также по некоторым деталям различается у разных гипераккумуляторов. Распределение Ni в апикальной части корня существенно разли-



**Рис. 3.** Выявление Ni в тканях различных органов *Alyssum* spp., выращенных в присутствии 30 мкМ Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Представлены давленные препараты апексов корней (а, б), срезы средней части корней (в, г, д, е), средней части стеблей (ж, з, и, к), листьев (л, м, н, п), препараты трихом (о, р) *A. lesbiacum* (а, в, ж, л, н, о), *A. obovatum* (г, з), *A. saxatile* ssp. *saxatile* (б, д, и, м, п, р), *A. saxatile* ssp. *orientale* (е, к). ВЭп – верхняя эпидерма, К – кора, Кс – ксилема, КЧ – корневой чехлик, М – мезофилл, НЭп – нижняя эпидерма, Р – ризодерма, Т – трихома, Ф – флоэма, Эп – эпидерма.

чалось у исключателей и гипераккумуляторов. При выращивании растений при 30 мкМ  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  в апикальной части корня у исключателей Ni не выявлялся в корневом чехлике, тогда как выше по корню четко выявлялся. В корнях гипераккумуляторов наблюдалась обратная картина: в чехлике Ni выявлялся, а выше по корню его было существенно меньше (рис. 3, а, б).

В средней части корня (от конца зоны растяжения до перехода корня к вторичному строению) как у гипераккумуляторов, так и у исключателей интенсивность окрашивания тканей была несколько выше, чем в апикальной части. В этой части корней гипераккумуляторов Ni накапливался в клетках внутреннего слоя коры (рис. 3, в, г). У исключателей Ni обнаружен практически во всех клетках внешнего слоя коры. В клетках внутреннего слоя коры он был обнаружен в корнях *Alyssum saxatile ssp. saxatile* (рис. 3, д) и не был обнаружен в *A. saxatile ssp. orientale* (рис. 3, е). Важно отметить, что, в отличие от исключателей, в этой части корней гипераккумуляторов Ni выявлялся в центральном цилиндре.

В более крупных клетках средней части корня можно было выявить особенности внутриклеточного распределения Ni, которые было трудно обнаружить в более мелких меристематических клетках. В коре корней гипераккумуляторов Ni был обнаружен в области ядер и лишь в некоторых случаях отмечалось интенсивное окрашивание протопластов клеток. В корнях исключателя *Alyssum saxatile ssp. saxatile* Ni выявлялся в протопласте и клеточных стенках ризодермы и коры, которые окрашивались в ряде случаев интенсивнее, чем протопласты.

В базальной части корня (от места перехода корня к вторичному строению до корневой шейки) Ni выявлялся в меньших количествах по сравнению с другими частями корня. В корнях гипераккумуляторов его было больше, чем у исключателей.

Таким образом, нами было показано, что тканевое распределение Ni в корнях растений-гипераккумуляторов и исключателей существенно различается. В корнях гипераккумуляторов Ni выявляется в небольших количествах, главным образом в чехлике и клетках внутреннего слоя коры и центрального цилиндра. В корнях исключателей он выявляется в большей степени во внешнем слое корня, а в чехлике

его концентрация была незначительна и Ni практически не выявлялся.

В апикальной части стебля гипераккумулятора *A. lesbiacum* Ni был обнаружен практически во всех тканях, но его было больше в эпидерме и проводящих тканях. В базальной и средней частях стебля Ni сосредотачивался преимущественно в проводящих тканях и в клетках эпидермы (рис. 3, ж). У гипераккумулятора *A. obovatum* Ni выявлялся в тех же тканях, но его было существенно меньше (рис. 3, з). У исключателей Ni в стеблях не выявлялся (рис. 3, и, к).

Во всех листьях растений исключателей, как в контрольном варианте, так и при концентрации 30 мкМ Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (рис. 3, м, п, р), количество металла было ниже предела определения гистохимического метода. Лишь в единичных случаях Ni в малых количествах выявлялся в ксилеме центральной жилки базальных листьев. В отличие от исключателей, Ni выявлялся в листьях растений гипераккумуляторов.

У *A. lesbiacum*, выращенного при 30 мкМ Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, в листьях Ni выявлялся в проводящих тканях центральной жилки листа и в клетках верхней и нижней эпидермы данного участка листа (рис. 3, л). По краю листа Ni выявлялся в эпидерме, но не был обнаружен в проводящих тканях. В средней части листа интенсивность окрашивания тканей была меньше по сравнению с другими частями листа; Ni локализовался преимущественно в клетках эпидермы (причем в верхней эпидерме его было больше, чем в нижней) и не выявлялся в мезофилле (рис. 3, н). Для трихом этой части листа было характерно накопление Ni лишь в основаниях и телах данных клеток (рис. 3, о); в трихомах верхней эпидермы Ni было больше по сравнению с трихомами нижней эпидермы.

При высокой концентрации Ni (300 мкМ) в питательном растворе Ni выявлялся в тканях центральной жилки листа и в клетках мезофилла вблизи жилки, а также накапливался в высоких концентрациях в равной степени как в верхней, так и в нижней эпидерме. По краю листа Ni также выявлялся в проводящих тканях, накапливался в клетках эпидермы, однако присутствовал в клетках мезофилла в более низкой концентрации. Средняя часть листа характеризовалась преимущественным накоплением Ni в верхней эпидерме по сравнению с нижней эпидермой, а также

присутствием металла в верхнем слое палисадного и нижнем слое губчатого мезофилла – слоях, прилегающих к эпидерме. В трихомах как верхней, так и нижней эпидермы Ni накапливался в основаниях, телах и лучах, причем, как и при 30 мкМ, в трихомах верхней эпидермы Ni было больше по сравнению с нижней эпидермой.

У гипераккумулятора *A. obovatum*, выращенного при невысокой концентрации Ni (30 мкМ), в листьях в области центральной жилки листа металл выявлялся в клетках эпидермы (в верхней больше, чем в нижней) и в малых количествах присутствовал в проводящих тканях. В средней части листа Ni накапливался как в верхней, так и в нижней эпидерме, причём интенсивность окрашивания тканей была практически одинакова. В трихомах верхней и нижней эпидермы Ni не выявлялся. В данных участках листа металл выявлялся в нижнем, приэпидермальном слое губчатого мезофилла. По краю листа накопление Ni не обнаружено ни в одной ткани.

При высокой концентрации Ni в среде выращивания (300 мкМ) в области центральной жилки Ni накапливался в равной степени как в верхней, так и в нижней эпидерме. В данной части листа Ni в низких концентрациях присутствовал в приэпидермальных слоях палисадного и губчатого мезофилла. Сходным образом Ni выявлялся по краю листа: Ni накапливался в эпидерме и в небольших количествах выявлялся в приэпидермальных слоях мезофилла и проводящих тканях. В средней части листа интенсивность окрашивания эпидермы была несколько меньше по сравнению с другими частями листа, причем практически не отличалась для верхней и нижней эпидермы. Ni накапливался в небольших количествах в основаниях и телах трихом, но не выявлялся в их лучах. Интенсивность окрашивания трихом верхней эпидермы было больше по сравнению с трихомами нижней эпидермы.

В обоих гипераккумуляторах Ni локализовался преимущественно в протопластах клеток листьев. В некоторых случаях на срезах наблюдались неразрезанные клетки, для которых было видно накопление Ni в вакуолях. Для апикальных листьев обоих гипераккумуляторов была характерна наибольшая интенсивность окрашивания тканей (и, соответственно, наибольшая концентрация Ni) по сравнению с листьями из средней и базальной частей побега.

**Накопление и распределение Ni в растениях *A. obovatum*, собранных в местах природного произрастания.** У этих растений нами были обнаружены те же закономерности накопления Ni в различных органах, которые мы наблюдали при выращивании растений этого вида в лабораторных условиях. Преимущественно накопление Ni происходило в побегах растений, содержание Ni в листьях было больше по сравнению со стеблями и составляло 2194,15 и 820,50 мкг/г сухой массы, соответственно. Содержание Ni в корнях было в 7 раз меньше по сравнению с содержанием Ni в побеге и составляло 361,83 мкг/г сухой массы.

Распределение Ni по тканям растений *Alyssum obovatum*, собранных в местах природного произрастания и выращенных в лабораторных условиях, было сходным. Однако у первых нами был обнаружен ряд особенностей тканевого распределения Ni.

Таким образом, распределение Ni в растениях-гипераккумуляторах и исключателях существенно различается. Чтобы охарактеризовать возможные пути и механизмы, обеспечивающие различное распределение поглощенного Ni в гипераккумуляторах и исключателях, нами были изучены 1) скорость поглощения Ni корнями, 2) интенсивность загрузки Ni в ксилему, 3) интенсивность транспирации; 4) интенсивность транслокации Ni из корня в побег; 5) особенности ультраструктурной организации транспорта ионов Ni в корнях.

**Скорость поглощения Ni корнями.** Определив концентрацию Ni в разных органах растений *Alyssum sp.*, выращенных в лабораторных условиях, и их массу мы смогли вычислить, сколько Ni находится в разных органах растений. Содержание Ni в одном растении было у гипераккумуляторов значительно больше, чем у исключателей и составляло в среднем 1386,0 и 616,1 мкг на одно растение, соответственно, для *A. lesbiacum* и *Alyssum saxatile ssp. saxatile*, выращенных при 30 мкМ  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Так как время эксперимента было одним и тем же, то такие вычисления показывают, как различалась средняя скорость накопления Ni у исключателей и гипераккумуляторов. Разная скорость поглощения при расчёте на одно растение может быть обусловлена различным размером корневой системы и различной интенсивностью поглощения корнем в расчёте на единицу массы. Оценить



это различие можно, если поделить общее количество Ni в растении на вес корневой системы. Эффективность поглощения Ni была выше в корнях гипераккумуляторов, чем исключателей и составляла 4617,2 и 2404,4 мкг на грамм корня, соответственно, для *A. lesbiacum* и *Alyssum saxatile ssp. saxatile*, выращенных при 30 мкМ Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O. Механизм этих различий остается неясным.

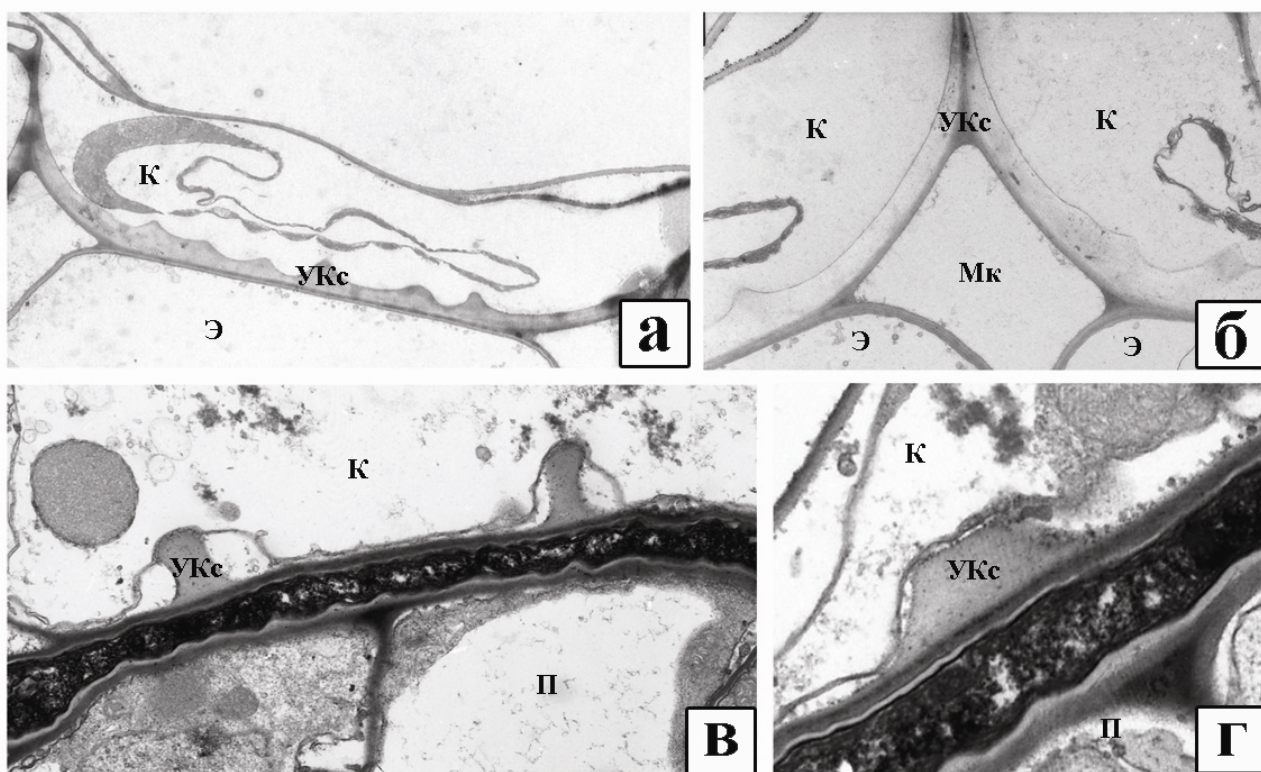
**Интенсивность загрузки Ni в ксилему.** Было установлено, что при инкубации в течение суток на питательном растворе, содержащем 30 мкМ Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, концентрация Ni в пасоке гипераккумулятора *A. lesbiacum* была в 54 раза больше по сравнению с исключателем *A. saxatile ssp. saxatile* и составляла соответственно  $272,52 \pm 82,88$  и  $5,02 \pm 1,60$  нМ/мл. Поток Ni в побег зависит от скорости загрузки Ni в ксилему и скорости потока воды по ксилеме в побег. О нем можно судить, измерив скорость транспирации растений, что и было сделано нами.

**Особенности транспирации и организация дальнего транспорта Ni.** Интенсивность транспирации была измерена как в расчете на одно растение, так и в пересчете на площадь транспирирующей поверхности. Было установлено, что у гипераккумулятора *A. lesbiacum*, выращенного при концентрациях до 600 мкМ Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O происходило увеличение интенсивности транспирации, а при больших концентрациях она уменьшалась. У исключателя *A. saxatile ssp. saxatile* с увеличением концентрации Ni в среде выращивания при расчете на одно растение интенсивность транспирации снижалась, а при расчете на единицу площади транспирирующей поверхности она увеличивалась. Последнее можно объяснить увеличением числа устьиц на единицу площади поверхности молодых листьев, которые оставались открытыми даже при высокой концентрации Ni в среде выращивания, и за счет которых, возможно, в основном происходило испарение воды растениями. Контрольные растения гипераккумулятора характеризовались более интенсивной транспирацией (в 1,5 раза больше при расчете на единицу площади листа), чем исключатели.

Таким образом, у гипераккумуляторов по сравнению с исключателями наблюдается более эффективное поглощение Ni корнями, более интенсивная загрузка

его в ксилему и более интенсивная транспирация, а, следовательно, и ток ксилемного раствора в побег.

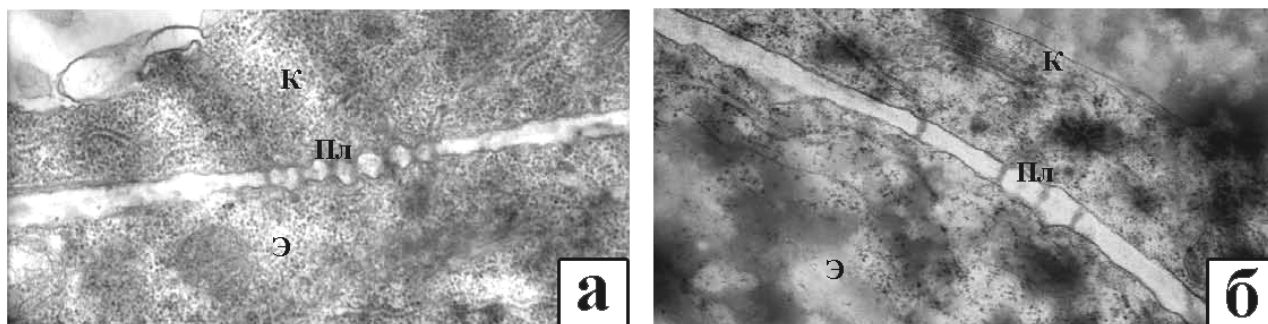
**Особенности анатомического строения корней *Alyssum* spp. и ближний транспорт Ni в корне.** При исследовании срезов корней гипераккумулятора *A. lesbiacum* и исключателя *Alyssum saxatile* ssp. *saxatile* методом светлопольной микроскопии нами были найдены утолщения внутренних тангентальных клеточных стенок внутреннего слоя коры. Сходные утолщения были описаны ранее M.R. Broadley с соавт. (2007) в корнях *Noccaea caerulea*. Наличие утолщений подтверждается и при флуоресцентной микроскопии по яркой автофлуоресценции утолщений. Они развивались в корнях гипераккумулятора от области окончания зоны растяжения до базальной части корня, тогда как у исключателя этих утолщений обнаружено не было. Однако детальный анализ анатомии корня с применением метода электронной микроскопии позволил нам установить присутствие утолщений клеточных стенок как у гипераккумулятора, так и у исключателя (рис. 4).



**Рис. 4.** Утолщения внутренних тангентальных клеточных стенок перизендоремального слоя коры в корнях *Alyssum* spp. Представлены поперечные срезы в зоне корневых волосков гипераккумулятора *Alyssum lesbiacum* (а, б) и исключателя *Alyssum saxatile* ssp. *saxatile* (в, г). К – кора, Мк – межклетник, П – перицикл, УКс – утолщения клеточной стенки, Э – эндодерма.

У гипераккумулятора данные утолщения имеют волнистую форму внутренней стороны и образуют непрерывный слой (рис. 4, а, б). Те же стенки клеток коры у исключателя не имеют подобных утолщений, но на них образуются выросты, распределяющиеся нерегулярно по поверхности клеточной стенки (рис. 4, в, г). Действие Ni не вызывало изменений в утолщениях клеточных стенок коры гипераккумулятора *A. lesbiacum* и не индуцировало образования утолщений с той же организацией у исключателя *Alyssum saxatile* ssp. *saxatile*.

При исследовании срезов корней гипераккумулятора в зоне деления и молодой части зоны растяжения методом электронной микроскопии было установлено, что у гипераккумулятора (рис. 5, а), по сравнению с исключателем (рис. 5, б), отмечается развитие большого числа плазмодесм преимущественно на тангентальных стенках клеток. В большинстве случаев они были сгруппированы в крупные плазмодесмные поля. Наибольшее их количество развивались на границе между клетками внутреннего слоя коры и эндодермы, а также на границе трихобластов и клеток внешнего слоя коры.



**Рис. 5.** Особенности развития плазмодесм на границе внутренней коры и эндодермы в корнях *Alyssum* spp. Представлены поперечные срезы в зоне деления корней гипераккумулятора *Alyssum lesbiacum* (а) и исключателя *Alyssum saxatile* ssp. *saxatile* (б). К – кора, Пл – плазмодесмы, Э – эндодерма.

Такая ультраструктурная организация корней свидетельствует о более развитом симпластном пути транспорта у гипераккумулятора по сравнению с исключателем. Описанные особенности анатомии корней гипераккумуляторов могут вносить существенный вклад в организацию ближнего транспорта Ni в корнях этих растений и его дальнейшую загрузку в ксилему.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Способность некоторых растений накапливать большие количества различных тяжелых металлов представляют большой интерес. До сих пор механизмы этого явления малопонятны и его физиологическая роль остается до конца не ясна. Для их изучения большой интерес представляет сравнительный анализ видов одного рода, различающихся по способности накапливать тяжелые металлы. В данной работе в этом отношении были изучены виды гипераккумуляторы и исключатели из рода *Alyssum*: как растения, выращенные в лабораторных условиях в водной культуре, так и растения, собранные в природных условиях (на серпентиновых почвах Полярного Урала).

Гипераккумуляторы, выращенные в среде без Ni, отличаются более замедленным ростом, относительно большей долей массы корневой системы и более интенсивной транспирацией по сравнению с исключателями. Растения-гипераккумуляторы проявляют высокую устойчивость к действию Ni, который при невысоких концентрациях оказывает стимулирующее действие на их рост, тогда как в концентрациях на порядок ниже он оказывает токсическое действие на растения-исключатели и подавляет их рост. Механизм стимулирующего действия Ni на растения-гипераккумуляторы неясен. Для исключателей стимулирующего действия Ni при малых концентрациях почти не проявляется, а его токсическое действие начинает быть заметным при концентрациях больше 20 мкМ Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O. При этом следует заметить, что гипераккумуляторы поглощают Ni гораздо интенсивнее, чем исключатели. Это связано не только с различиями в размерах корневых систем, так как даже на единицу веса поглощение Ni у гипераккумуляторов происходит значительно интенсивнее, чем исключателями. Механизмы этих различий, которые были впервые выявлены в данной работе, пока неясны и, безусловно, их расшифровка будет иметь важное значение для понимания феномена гипераккумуляции.

Проведенные нами исследования показали, что у гипераккумуляторов Ni более интенсивно загружается в ксилему и у них выше интенсивность транспирации, т.е. интенсивнее поток ксилемного сока в побег. Это приводит к большему накоплению

Ni в надземных частях растений-гипераккумуляторов по сравнению с исключателями.

Несмотря на интенсивный транспорт Ni в побег у гипераккумуляторов, его токсическое действие проявляется только при гораздо больших концентрациях, чем у исключателей. Эта устойчивость растений-гипераккумуляторов к действию Ni обеспечивается способностью его накопления в клетках эпидермы листа. Преимущества данного механизма состоят в "инактивации" ионов металла и их компартиментации в той части клеток, где не происходят активные процессы жизнедеятельности растительного организма. Как это достигается пока еще далеко неясно. Для решения этой проблемы большой интерес представляет выявление и изучение переносчиков Ni, которые уже выявлены (Ingle et al., 2008), но физиологическая роль которых еще мало изучена.

Кроме того, существенную роль могут играть различия в ультраструктуре корней у гипераккумуляторов и исключателей. Нами было показано, что у растений-гипераккумуляторов тангентальные клеточные стенки периэндодермального слоя коры утолщены, как это было описано ранее для таких видов из рода *Noccaea* (Broadley et al., 2007). В корнях исключателей нами с помощью электронной микроскопии обнаружены только утолщения отдельных участков, без образования сплошных утолщений, как у гипераккумуляторов. Возможно, образование подобного рода утолщений клеточных стенок у растений-гипераккумуляторов может служить для ограничения апопластного транспорта ионов тяжелых металлов в корне и их более эффективного перемещения в симпласт и, таким образом, участвовать в организации загрузки металлов в ксилему. Однако необходимы дальнейшее исследования для расшифровки физиологического значения такого утолщения клеточных стенок.

Для дальнейшего исследования механизмов гипераккумуляции очень важно понять, как происходит компартиментация поглощенного Ni в клетках, в которых важную роль играют его связывание клеточными стенками и загрузка в вакуоль.

Таким образом, проведенные нами исследования показали существование четких различий между растениями-гипераккумуляторами и исключателями по ряду

физиологических процессов. Они, несомненно, играют заметную роль в способности сравниваемых растений поглощать и накапливать разные количества Ni, но для дальнейшего решения этой проблемы необходимы дальнейшие исследования с привлечением большего арсенала методов, включая методы молекулярной биологии.

## ВЫВОДЫ

1. Сравнение видов гипераккумуляторов и исключателей Ni из рода *Alyssum* позволило выявить ряд физиологических особенностей этих видов. Гипераккумуляторы характеризуются более медленным ростом, большей долей массы корневой системы в весе растения и более интенсивной транспирацией по сравнению с исключателями.
2. Гипераккумуляторы отличаются большей устойчивостью к действию Ni, хотя по сравнению с исключателями поглощают Ni более интенсивно как в расчете на одно растение, так и на единицу массы корневой системы.
3. Распределение Ni в корнях растений-гипераккумуляторов и исключателей существенно отличается: у гипераккумуляторов Ni локализуется в корневом чехлике, клетках внутренней коры и тканях центрального цилиндра, тогда как у исключателей накапливается преимущественно в клетках коры корня и его транспорт в центральный цилиндр ограничен.
4. Распределение и накопление Ni в листьях у гипераккумуляторов и исключателей принципиально различается. У исключателей Ni в листьях практически не выявляется, в то время как у гипераккумуляторов Ni преимущественно накапливается в эпидерме листьев, а его поступление в активно фотосинтезирующие клетки мезофилла ограничено.
5. Гипераккумуляторы отличаются не только большим поглощением Ni, но и более интенсивной загрузкой его в ксилему. Это наряду с более интенсивной транспирацией обеспечивает интенсивный поток Ni в побег.
6. Корни гипераккумуляторов и исключателей отличаются своей ультраструктурной организацией. У гипераккумулятора развиты непрерывные

утолщения тангентальных клеточных стенок периэнтодермального слоя коры в зоне корневых волосков и развивается большее число плазмодесм в меристеме и начале зоны растяжения, что способствует более интенсивному симпластному потоку Ni в корне.

### СПИСОК РАБОТ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Бакланов И.А.** (2009) Сравнительный анализ анатомического строения корня и тканевого распределения никеля в растениях-гипераккумуляторах и исключателях из рода *Alyssum* L. // Ломоносов – 2009: Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых; секция «Биология»; 13-18 апреля 2009 г.; Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет: Тезисы докладов / Сост.: А.Н. Демидова и др. – М.: МАКС Пресс, 2009. – С. 223-224.
2. **Бакланов И.А.** (2009) Гистохимический анализ распределения и накопления никеля в гипераккумуляторах и исключателях из рода *Alyssum* L. // Труды Международной научной конференции "Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера". Апатиты, 2009. – С. 40.
3. **Бакланов И.А.**, Серегин И.В., Иванов В.Б. (2009) Гистохимический анализ распределения никеля в гипераккумуляторе и исключателе из рода *Alyssum* L. *Доклады РАН*, 429 (5), 698-700.
4. **Бакланов И.А.** (2010) Анализ распределения и накопления никеля в тканях гипераккумулятора *Alyssum obovatum* (С.А. Mey.) Turcz. и исключателя *Alyssum montanum* L. // Ломоносов – 2010: XVII международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых; секция «Биология»; 12-15 апреля 2010 г.; Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет: Тезисы докладов / Сост.: Г.В. Кочетова. – М.: МАКС Пресс, 2010. – С. 247-248.
5. **Бакланов И.А.** (2010) Токсическое действие Ni на рост и транспирацию гипераккумулятора и исключателя из рода *Alyssum* L. // Тезисы докладов

- Всероссийского симпозиума "Растение и стресс", 09-12 ноября 2010 г., ИФР им. К.А. Тимирязева РАН. Москва, 2010. – С. 47-48.
6. **Бакланов И.А.** (2011) Анализ накопления Ni в растениях-гипераккумуляторах и исключателях из рода *Alyssum* L. // Ломоносов – 2011: XVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых; секция «Биология»; 11-15 апреля 2011 г.; Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет: Тезисы докладов / Сост.: Н.П. Карасева. – М.: МАКС Пресс, 2011. – С. 229.
  7. **Бакланов И.А.** (2011) Действие Ni на рост растений-гипераккумуляторов и исключателей из рода *Alyssum* L. // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 15-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 18-22 апреля 2011 года). Сборник тезисов. Пушино, 2011. – С. 414-415.
  8. **Бакланов И.А.** (2011) Особенности тканевого распределения Ni в растениях-гипераккумуляторах и исключателях из рода *Alyssum* L. // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 15-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 18-22 апреля 2011 года). Сборник тезисов. Пушино, 2011. – С. 415-416.
  9. **Бакланов И.А.** (2011) Гетерогенность клеток эпидермы в отношении накопления никеля у гипераккумуляторов из рода *Alyssum* L. *Цитология*, 53 (7), 572-579.

Автор выражает благодарность к.б.н., с.н.с. лаборатории солевого обмена и солеустойчивости ИФР РАН Курковой Е.Б. за обучение методу электронной микроскопии и помощь в работе. Отдельная благодарность д.б.н., зав. лабораторией механизмов роста растительных клеток КИББ КазНЦ РАН Горшковой Т.А. и д.б.н., зав. лабораторией микроскопии КИББ КазНЦ РАН Сальникову В.В. за участие в совместной работе и ценные консультации.