

На правах рукописи



**Башмакова Елена Борисовна**

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ  
МИМУЛЮСА КРАПЧАТОГО (*Mimulus guttatus* DC.) К СОВМЕЩНОМУ  
ДЕЙСТВИЮ ЦИНКА И НИКЕЛЯ**

Специальность 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2017

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:** доктор биологических наук  
**Радюкина Наталия Львовна**

**Научный консультант:** доктор биологических наук, профессор, чл.-корр. РАН  
**Кузнецов Владимир Васильевич**

**Официальные оппоненты:** **Кошкин Евгений Иванович** – доктор биологических наук, профессор, Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, профессор кафедры физиологии растений;  
**Назаренко Людмила Владимировна** – кандидат биологических наук, доцент, ГАОУ ВО Московский городской педагогический университет, Институт математики, информатики и естественных наук, доцент кафедры биологии, экологии и методики обучения биологии

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук

Защита состоится «17» октября 2017 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, e-mail: [m-azarkovich@ippras.ru](mailto:m-azarkovich@ippras.ru); [ifr@ippras.ru](mailto: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 «\_\_» июля 2017 г.

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



Азаркович Марина Ивановна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Проблема антропогенного загрязнения окружающей среды поллютантами различной природы в настоящее время приобретает все большую актуальность. Среди многочисленных загрязнителей токсичными для живых организмов являются тяжелые металлы (ТМ). Особое место среди эссенциальных ТМ занимают элементы цинк (Zn) и никель (Ni), поскольку их избыточное содержание в почве может быть результатом не только хозяйственной деятельности человека, но и естественных почвообразовательных процессов (Kabata-Pendias, Pendias, 2001; Yadav, 2010). В почвах, загрязненных этими ТМ, содержание Zn составляет от 150 до 300 мг/кг, а содержание Ni может достичь 26000 мг/кг воздушно-сухой почвы, что приводит к аккумуляции этих металлов в растениях, вызывая целый ряд негативных эффектов на их метаболизм (Yadav, 2010).

К настоящему времени в литературе накоплен обширный фактический материал, посвященный изучению механизмов адаптации растений к повреждающему действию тех или иных ТМ, тогда как исследованию совместного действия ТМ уделено чрезвычайно мало внимания. Вместе с тем в природных экосистемах растения часто подвергаются комбинированному воздействию ТМ, которое может иметь антагонистический или синергический характер влияния на различные физиологические и биохимические процессы в растении, в частности, на клеточный редокс-статус и статус Fe (Ghasemi *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2009; Orcutt *et al.*, 2010; DalCorso, 2012). Это делает крайне важным исследование механизмов стрессорного ответа растений на совместное действие ТМ. Поскольку антагонистическое взаимодействие ТМ с Fe приводят к его дефициту в ассимилирующих органах и, как следствие, снижению продуктивности растений, то, очевидно, особый интерес с этой точки зрения представляют элементы-антагонисты Fe — Zn и Ni (Krämer, Clemens, 2005; Yusuf *et al.*, 2011; Broadley *et al.*, 2012). Таким образом, исследование характера взаимодействия процессов поглощения, транслокации и межорганного распределения Zn и Ni, установление причины развития Fe-дефицита, изучение совместного действия Zn и Ni на клеточный окислительно-восстановительный баланс, а также механизмов антиоксидантной защиты у растений в условиях совместного действия солей Zn и Ni является крайне актуальным.

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящей работы являлось изучение физиологических механизмов адаптации растений *M. guttatus* к отдельному и совместному действию  $ZnSO_4$  и  $NiSO_4$  в условиях водной культуры.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить действие  $Zn$  и  $Ni$  на прирост сухой биомассы; поглощение, транслокацию, аккумуляцию  $Zn$  и  $Ni$  и их распределение в надземных органах.
2. Установить действие  $Zn$  и  $Ni$  на поглощение, транслокацию и содержание  $Fe$  в листьях.
3. Исследовать морфологический и биохимический ответы растений на недостаток  $Fe$ , вызванный действием  $Zn$  и  $Ni$ .
4. Установить физиологические причины снижения содержания  $Fe$  в листьях при совместном действии  $Zn$  и  $Ni$ .
5. Исследовать возможную роль никотианамина (НА) в детоксикации и дальнейшем транспорте  $Ni$  у растений при совместном действии  $Zn$  и  $Ni$ .
6. Оценить степень окислительного стресса и функциональное состояние глутатион–пероксидазной системы в корнях и листьях растений при действии  $Zn$  и  $Ni$ .

**Научная новизна.** Впервые у растений *M. guttatus* проведены изучение и сравнительный анализ поглощения, транслокации, аккумуляции и распределения в надземных органах  $Zn$  и  $Ni$  при их отдельном и совместном действии; установлено влияние  $Zn$  и  $Ni$  (как при отдельном, так и совместном действии) на поглощение, транслокацию  $Fe$  и его содержание в листьях. При совместном действии  $Zn$  и  $Ni$  обнаружена конкуренция между  $Ni$  и  $Fe$  в корнях за дальний транспорт в побег, о чем свидетельствовали данные о транслокации  $Ni$  и  $Fe$  и содержании  $Ni$  и  $Fe$  в листьях, с одной стороны, а также анализ содержания  $Fe$  и активности  $Fe(III)$ -хелатредуктазы (FRO2) в корнях – с другой. Продемонстрировано, что в основе развития дефицита  $Fe$  у растений *M. guttatus*, подвергнутых совместному действию  $ZnSO_4$  и  $NiSO_4$ , лежит конкуренция между ионами  $Ni^{2+}$  и  $Fe^{2+}$  за хелатор, которым, по-видимому, является НА. Впервые обнаружен антагонистический и синергический характер взаимодействия  $Zn$  и  $Ni$  в функционировании глутатион–пероксидазной системы. Обнаруженные изменения в функционировании глутатионовой (GR-GSH) системы были направлены на поддержание более восстановленного состояния

внутриклеточной среды, что, по-видимому, обеспечивало снижение интенсивности окислительного стресса в клетках корней и листьев у растений *M. guttatus* при совместном действии солей  $ZnSO_4$  и  $NiSO_4$ .

**Теоретическая и практическая значимость.** Материалы диссертационного исследования расширяют и углубляют современное понимание механизмов, лежащих в основе развития Fe-дефицита и адаптации растений в условиях комбинированного действия Zn и Ni. Результаты нашего исследования могут быть использованы в практике растениеводства при выращивании растений на территориях загрязненных Zn и Ni, а сделанные на их основе теоретические обобщения – для разработки курсов лекций по экологической физиологии растений для студентов биологических специальностей университетов.

**Апробация работы.** Результаты данной работы были представлены на Всероссийском симпозиуме «Экология мегаполисов: фундаментальные основы и инновационные технологии» (Москва, 2011); VIII Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы экологии – 2012» (Гродно, 2012); IX Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы экологии – 2013» (Гродно, 2013); Международной научной конференции по биологии и биотехнологии растений (Алматы, 2014); X Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы экологии – 2014» (Гродно, 2014); Межинститутском научном молодежном семинаре ИФР РАН «Актуальные проблемы физиологии, молекулярной биологии и биотехнологии растений» (Москва, 2015); Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 125-летию Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева «Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений» (Москва, 2015), а также на конференциях молодых ученых ИФР РАН (Москва, 2013, 2014) и семинаре лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации ИФР РАН (Москва, 2015, 2016).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, из которых 2 статьи в рецензируемом журнале «Физиология растений».

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из следующих разделов, включающих список основных сокращений, введение, обзор литературы, объект и методы исследований, результаты исследований и их обсуждение,

заключение, выводы и список цитируемой литературы. Материалы диссертации изложены на 150 страницах машинописного текста и содержат 6 таблиц и 25 рисунков. Список цитируемой литературы включает 270 наименований, из которых 215 – на иностранных языках.

## ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Объект.** Для изучения совместного действия Zn и Ni в растении большой интерес представляет высоко устойчивое к действию этих металлов растение-исключатель ТМ из семейства Фримовых (Phrymaceae) мимулус крапчатый (*Mimulus guttatus* Fischer ex DC.) (Tilstone, Macnair, 2001; Pollard *et al.*, 2002).

**Условия проведения экспериментов.** Ювенильные растения подвергали раздельному (50, 100 и 200 мкМ ZnSO<sub>4</sub>; 20 и 80 мкМ NiSO<sub>4</sub>) и совместному (20 мкМ NiSO<sub>4</sub> + 100 мкМ ZnSO<sub>4</sub>, 20 мкМ NiSO<sub>4</sub> + 200 мкМ ZnSO<sub>4</sub>, 80 мкМ NiSO<sub>4</sub> + 50 мкМ ZnSO<sub>4</sub> и 80 мкМ NiSO<sub>4</sub> + 100 мкМ ZnSO<sub>4</sub>) воздействию солей ТМ в модифицированной питательной среде Роризона (Башмакова и др., 2015). Контрольные растения выращивали на питательной среде, концентрация ZnSO<sub>4</sub> в которой составляла 1 мкМ, в отсутствие NiSO<sub>4</sub>. Растворы меняли через каждые 3 суток на протяжении 4-недельного периода воздействия солями ТМ, используя свежеприготовленный раствор FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (без Na<sub>2</sub>ЭДТА); величину pH растворов поддерживали в диапазоне 6.8–6.5. Эксперименты были проведены в условиях фитотрона при температуре воздуха 23/18°C (день/ночь), с 12-часовым световым периодом при интенсивности света 140 ± 20 мкмоль/(м<sup>2</sup> с) и относительной влажности воздуха 65 и 75% днем и ночью соответственно.

**Определение биомассы растений, подготовка проб растительного материала и анализ содержания металлов.** Определение сухой биомассы образцов корней и побегов проводили гравиметрическим методом с точностью до 0.1 мг на аналитических весах AB54-S («Mettler Toledo», Германия).

Для оценки способности растений накапливать Zn, Ni и Fe и проведения биохимических анализов использовали корни и листья среднего яруса. Металлы десорбировали с поверхности корней в 10 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА в течение 10 мин, затем корни тщательно промывали в дистиллированной воде. Сырой растительный материал корней и листьев делили на две части: одну часть материала фиксировали

жидким азотом и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$  до проведения биохимических анализов, в то время как другую часть материала сушили при  $70^{\circ}\text{C}$ . Высушенные образцы озоляли по модифицированной методике Голубкиной (1995). Содержание металлов определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре ФМ-400 («Лабист», Россия).

Для изучения распределения Zn и Ni в надземных органах растений определяли содержание этих ТМ в стеблях и листьях нижнего, среднего и верхнего ярусов. Оценку интенсивности дальнего транспорта Zn, Ni и Fe из корневой системы в побег проводили путем расчета коэффициента транслокации ( $K_{\text{тр}}$ ), представляющего собой отношение содержания металла в листьях среднего яруса к его содержанию в корнях.

**Микроскопический анализ корней.** Распределение Zn и Ni в тканях корня проводили гистохимическим методом с помощью металлохромных индикаторов (Серегин, Кожевникова, 2011). Исследование образцов проводили под световым микроскопом Axio Imager D1 («Carl Zeiss», Германия). Микрофотографии получали с помощью фотоаппарата Canon PowerShot A650 IS («Canon», США). О присутствии Zn судили по синему окрашиванию его комплексов с цинконом, Ni – по малиново-красному окрашиванию его комплексов с диметилглиоксимом (ДГ). Содержание металла в расчете на единицу площади поперечного сечения корня оценивали по интенсивности окрашивания.

**Определение активности Fe(III)-хелатредуктазы.** Активность FRO2 определяли в интактных корнях спектрофотометрическим методом согласно ранее описанной методике Yi и Guerinot (1996).

**Определение содержания свободного никотианамина.** Анализ содержания свободного НА проводили по модифицированной методике Wada с соавт. (2007). Содержание НА определяли на масс-спектрометре AB SCIEX 3200 QTRAP («AB SCIEX», США). Разделение проводили на колонке Dionex-Acclaim 120 C18 и хроматографе Dionex UltiMate 3000 («Dionex», США).

**Определение содержания малонового диальдегида (МДА).** Содержание МДА определяли спектрофотометрическим методом по модифицированной методике Heath и Packer (1968).

**Определение содержания фотосинтетических пигментов.** Содержание хлорофиллов (Хл) *a* и *b*, а также суммарное содержание каротиноидов *x* и *c* (ксантофиллов и  $\beta$ -каротина) определяли в ацетоновых экстрактах

спектрофотометрическим методом. Для расчета использовали формулы, предложенные Lichtenthaler (1987).

**Определение содержания глутатиона.** Общее содержание глутатиона (GSHt) и содержание окисленного глутатиона (GSSG) определяли методом ферментативной рециклизации по модифицированной методике Griffith (1980). Интенсивность поглощения раствора 5-тио-2-нитробензойной кислоты (TNB) регистрировали на спектрофотометре. Содержание восстановленного глутатиона (GSH) рассчитывали вычитанием содержания GSSG из GSHt ( $GSH + 2 GSSG$ ).

**Активность глутатионредуктазы (GR)** определяли спектрофотометрическим методом, согласно методике, предложенной Smith с соавт. (1988).

**Общую активность пероксидазных глутатион-S-трансфераз (GST)** определяли спектрофотометрическим методом по модифицированной методике Gaullier с соавт. (1994).

**Содержание белка** в экстрактах ферментов определяли по методике Esen (1978). Все спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Genesys 10UV («Thermo Electron Corporation», США).

**Статистический анализ.** Каждый эксперимент повторяли по три раза. Физиолого-биохимические исследования проводили в 4 биологических и 3 аналитических повторностях. Для микроскопического анализа корней использовали по 4 растения в трех независимых экспериментах. На рисунках представлены средние арифметические значения биологических повторностей и их стандартные ошибки. Корреляционная зависимость между суммарными концентрациями  $ZnSO_4$  и  $NiSO_4$  в культуральной среде и накоплением Zn и Ni в листьях экспериментальных растений, а также между суммарным накоплением Zn и Ni в листьях экспериментальных растений, с одной стороны, и содержанием Fe в листьях экспериментальных растений – с другой, была оценена с помощью коэффициента детерминации ( $R^2$ ). Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Excel 2007 («Microsoft», США).

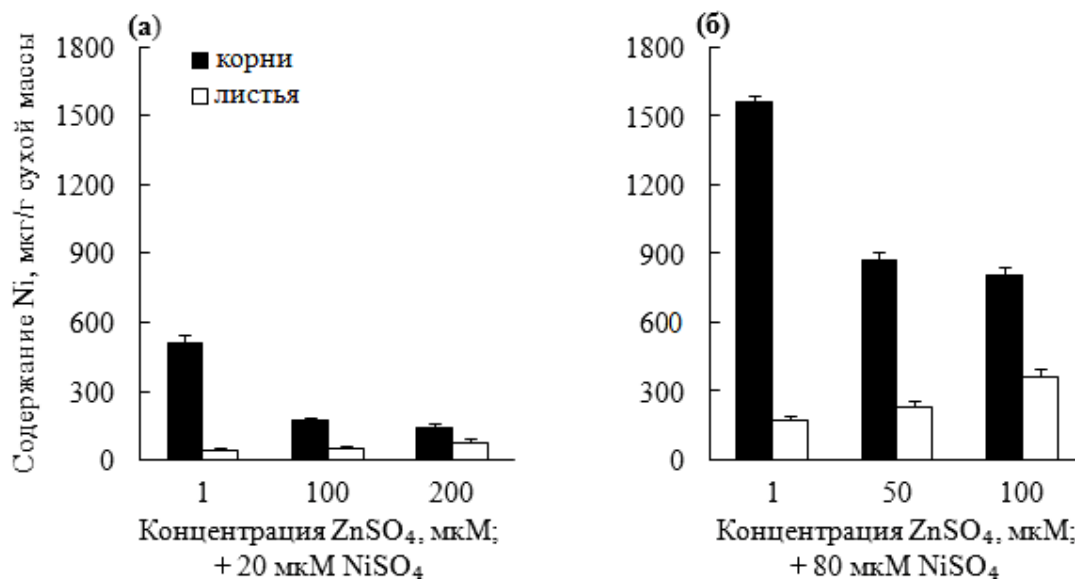
## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Накопление и распределение по органам цинка и никеля**

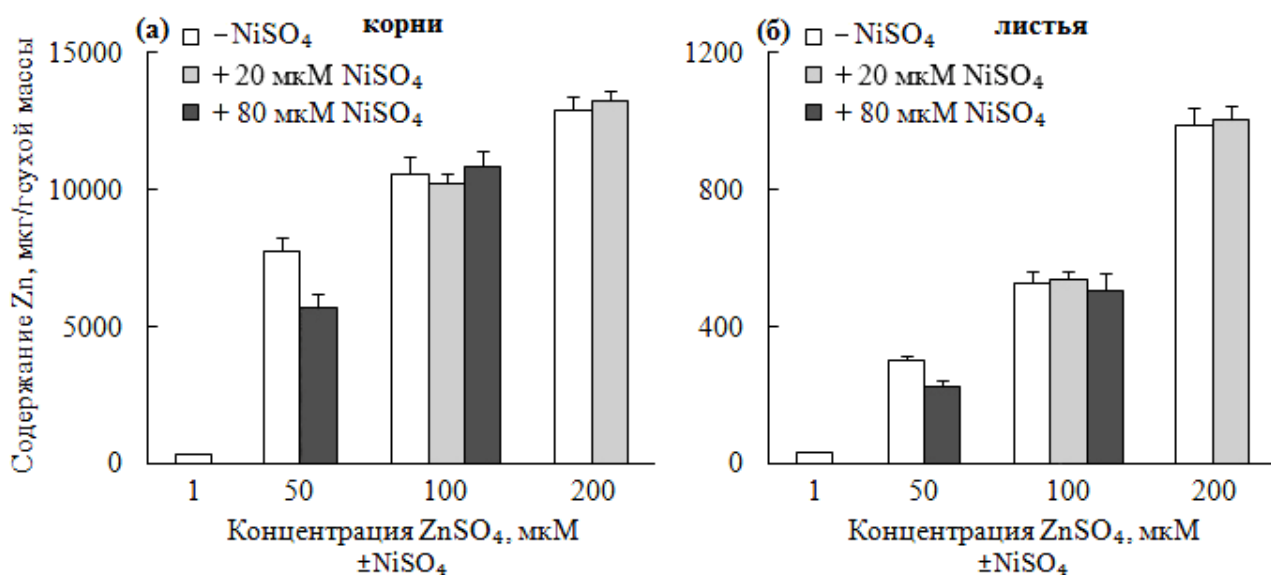
Установлено, что в условиях отдельного воздействия  $NiSO_4$  и  $ZnSO_4$  содержание Ni и Zn в корнях и листьях возрастало с увеличением концентрации



NiSO<sub>4</sub> и ZnSO<sub>4</sub> в культуральной среде, причем уровень обоих металлов был значительно выше в корнях, чем в листьях (рис. 1а, 1б; 2а, 2б).



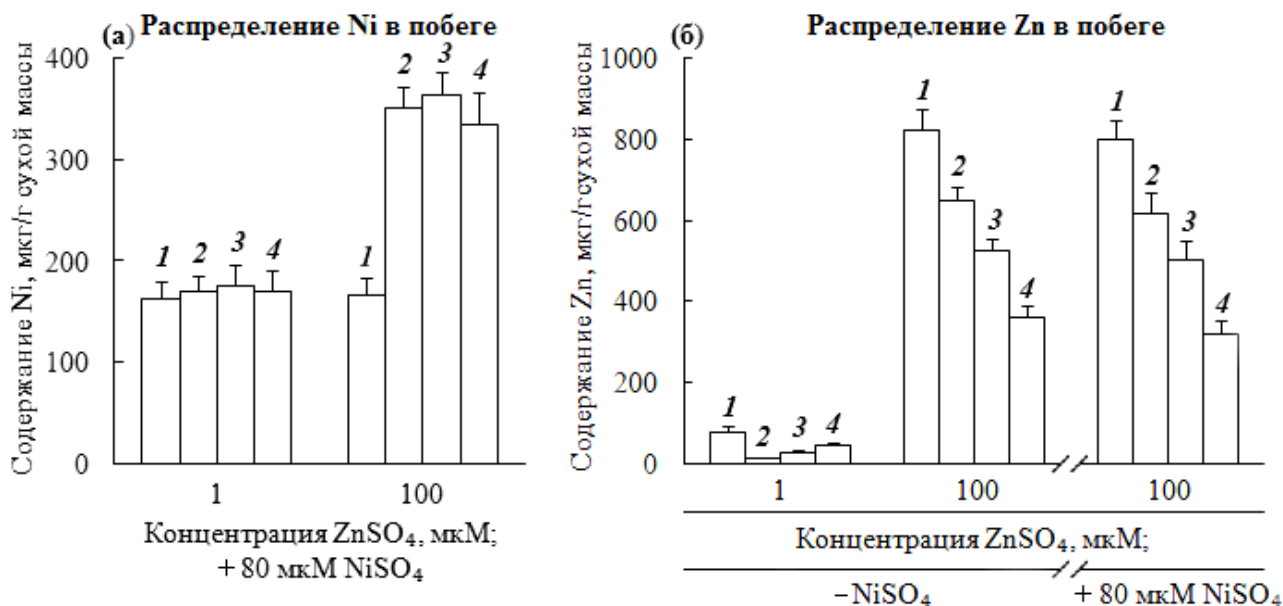
**Рис. 1.** Аккумуляция Ni в корнях и листьях среднего яруса (а, б) у растений *M. guttatus*, выращенных в условиях избыточных концентраций ZnSO<sub>4</sub> и NiSO<sub>4</sub> в течение 4 нед. Растения выращивали на питательной среде, концентрация ZnSO<sub>4</sub> в которой составляла 1 мкМ.



**Рис. 2.** Аккумуляция Zn в корнях (а) и листьях среднего яруса (б) у растений *M. guttatus*, выращенных в контрольных условиях (1 мкМ ZnSO<sub>4</sub>) и в условиях избыточных концентраций ZnSO<sub>4</sub> и NiSO<sub>4</sub> в течение 4 нед.

При совместном воздействии 20 мкМ NiSO<sub>4</sub> и 100 (или 200) мкМ ZnSO<sub>4</sub>, а также 80 мкМ NiSO<sub>4</sub> и 50 (или 100) мкМ ZnSO<sub>4</sub> содержание Ni в корнях снижалось, а в листьях возрастало с увеличением концентрации ZnSO<sub>4</sub> в культуральной среде (рис. 1а, 1б). При этом содержание Zn в корнях и листьях практически не изменялось, а

снижалось лишь при совместном действии 80 мкМ NiSO<sub>4</sub> и 50 мкМ ZnSO<sub>4</sub>, когда в культуральной среде концентрация NiSO<sub>4</sub> превосходила концентрацию ZnSO<sub>4</sub> в 1.6 раза (рис. 2а, 2б).



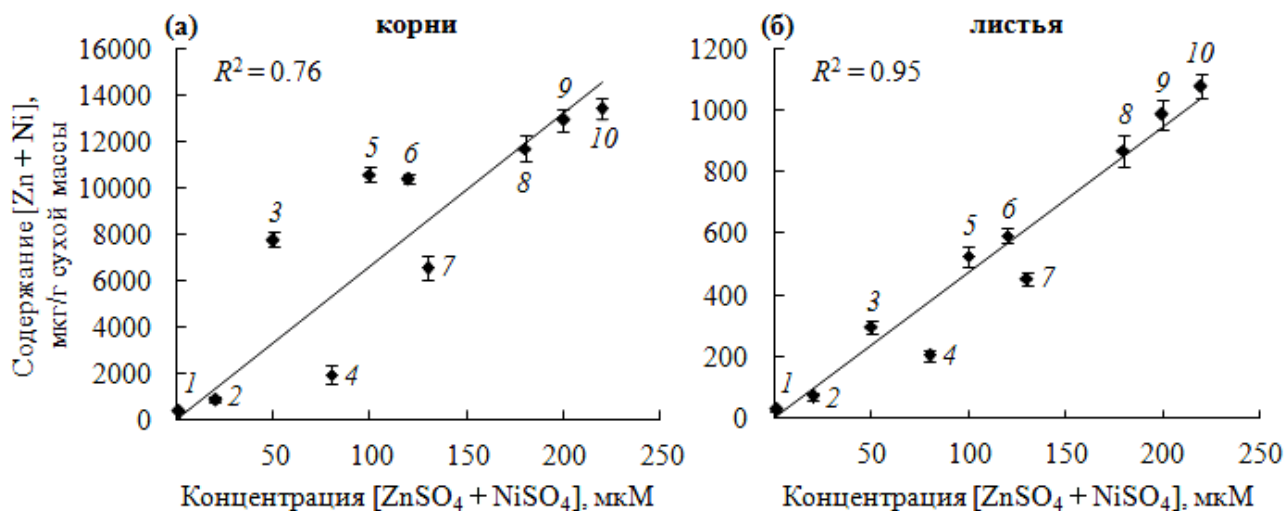
**Рис. 3.** Распределение Ni (а) и Zn (б) в надземных органах растений *M. guttatus*, выращенных в контрольных условиях (1 мкМ ZnSO<sub>4</sub>) и в условиях избыточных концентраций ZnSO<sub>4</sub> и NiSO<sub>4</sub> в течение 4 нед.

Обозначения: 1 – стебли, 2 – листья нижнего яруса, 3 – листья среднего яруса, 4 – листья верхнего яруса.

При воздействии 20 (или 80) мкМ NiSO<sub>4</sub> на растения Ni достаточно равномерно распределялся в побеге, в то время как в растениях, подвергнутых совместному воздействию 20 мкМ NiSO<sub>4</sub> и 100 (или 200) мкМ ZnSO<sub>4</sub>, а также 80 мкМ NiSO<sub>4</sub> и 50 (или 100) мкМ ZnSO<sub>4</sub>, содержание Ni в стебле не изменилось, а в листьях увеличилось в 1.5–2.0 раза по сравнению с его содержанием в этих органах у растений, подвергнутых соответствующему воздействию 20 (или 80) мкМ NiSO<sub>4</sub> (приведены данные вариантов 80 мкМ NiSO<sub>4</sub> и 80 мкМ NiSO<sub>4</sub> + 100 мкМ ZnSO<sub>4</sub>; см. рис. 3а). Zn распределялся в растении иначе: во всех вариантах воздействий ZnSO<sub>4</sub> наблюдалось снижение содержания Zn от листьев нижнего яруса к листьям верхнего яруса, и аккумуляция Zn в стебле была значительно выше, чем в листьях (приведены данные вариантов 100 мкМ ZnSO<sub>4</sub> и 80 мкМ NiSO<sub>4</sub> + 100 мкМ ZnSO<sub>4</sub>; см. рис. 3б). Однако у контрольных растений была установлена противоположная тенденция накопления Zn в листьях (рис. 3б).

Анализ металл-аккумулирующей способности растений *M. guttatus* показал, что увеличение суммарной концентрации ZnSO<sub>4</sub> и NiSO<sub>4</sub> в культуральной среде

приводило к пропорциональному возрастанию содержания Zn и Ni как в корнях, так и листьях (рис. 4) до установленных для этих ТМ токсических уровней (Krämer, 2010).

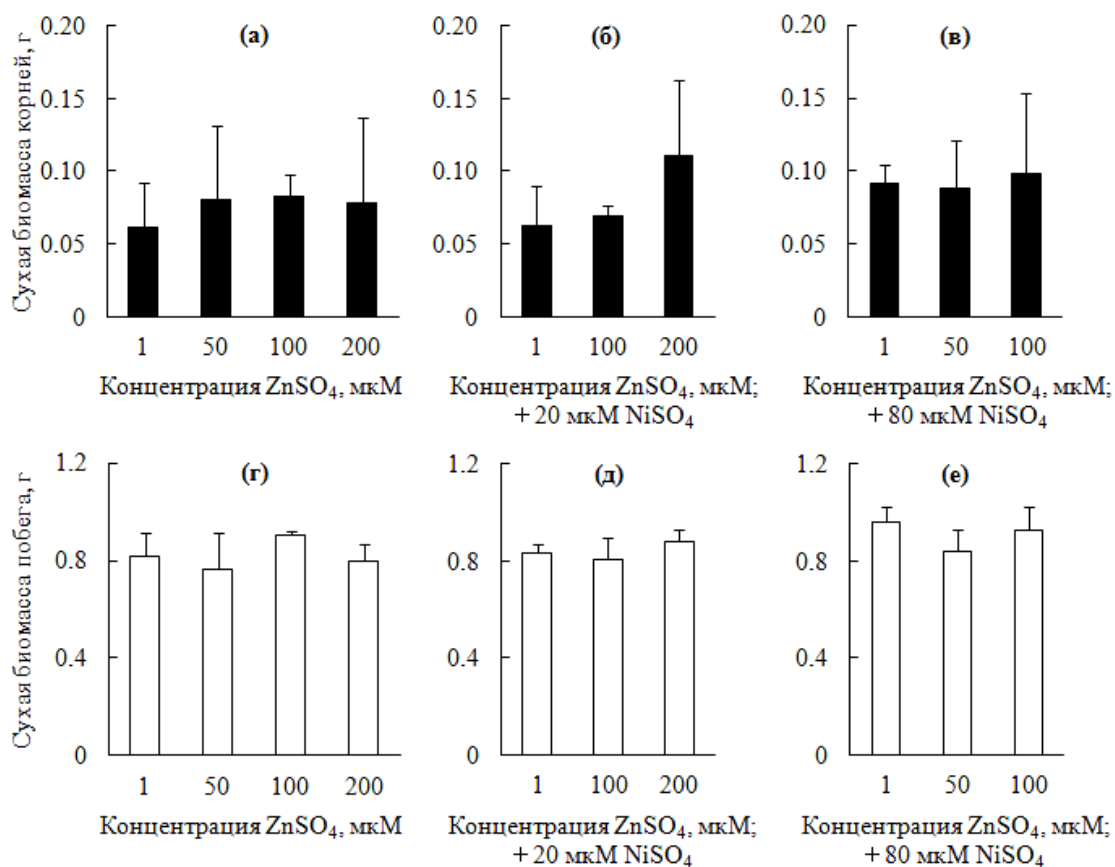


**Рис. 4.** Графики корреляций между суммарной концентрацией ZnSO<sub>4</sub> и NiSO<sub>4</sub> в модифицированной жидкой среде Роризона и содержанием Zn и Ni в корнях (а) и листьях (б), установленные в опытах с растениями *M. guttatus*, выращенными в контрольных условиях (1 мкМ ZnSO<sub>4</sub>) и в условиях избыточных концентраций ZnSO<sub>4</sub> и NiSO<sub>4</sub> в течение 4 нед.

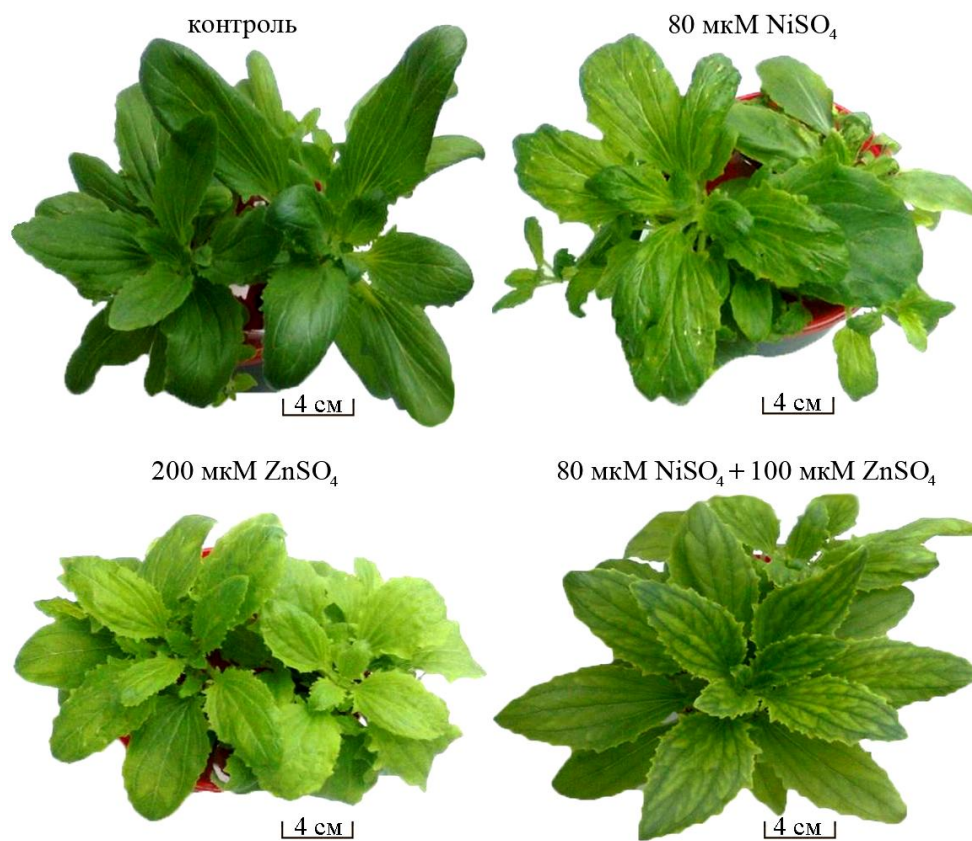
Обозначения: 1 – контроль, 2 – 20 мкМ NiSO<sub>4</sub>, 3 – 50 мкМ ZnSO<sub>4</sub>, 4 – 80 мкМ NiSO<sub>4</sub>, 5 – 100 мкМ ZnSO<sub>4</sub>, 6 – 20 мкМ NiSO<sub>4</sub> + 100 мкМ ZnSO<sub>4</sub>, 7 – 80 мкМ NiSO<sub>4</sub> + 50 мкМ ZnSO<sub>4</sub>, 8 – 80 мкМ NiSO<sub>4</sub> + 100 мкМ ZnSO<sub>4</sub>, 9 – 200 мкМ ZnSO<sub>4</sub>, 10 – 20 мкМ NiSO<sub>4</sub> + 200 мкМ ZnSO<sub>4</sub>.

### Индикаторы антагонизма железа, цинка и никеля в растении

Ингибирующего влияния Zn и Ni на прирост сухой биомассы у растений *M. guttatus* в условиях совместного действия ZnSO<sub>4</sub> и NiSO<sub>4</sub> обнаружено не было (рис. 5). На 5-е сутки эксперимента во всех вариантах воздействий NiSO<sub>4</sub> и ZnSO<sub>4</sub>, за исключением варианта 20 мкМ NiSO<sub>4</sub>, обнаружили характерный признак дефицита Fe в растении – межжилковый хлороз листьев (данные не приведены). К концу эксперимента хлоротичность листьев усиливалась и была максимальной в вариантах 200 мкМ ZnSO<sub>4</sub> и 80 мкМ NiSO<sub>4</sub> + 100 мкМ ZnSO<sub>4</sub>, в то время как в варианте 80 мкМ NiSO<sub>4</sub> наблюдали незначительные точечные некрозы и уменьшение хлоротичности листьев. Примечательно, что внесение в культуральную среду 50 (или 100) мкМ ZnSO<sub>4</sub>, помимо 80 мкМ NiSO<sub>4</sub>, приводило к полному исчезновению точечных некрозов листьев (рис. 6), что, по-видимому, свидетельствует о нормализации гомеостаза некоторых эссенциальных элементов вследствие антагонизма Zn и Ni в растении (Kabata-Pendias, Pendias, 2001; Chen *et al.*, 2009; DalCorso, 2012).



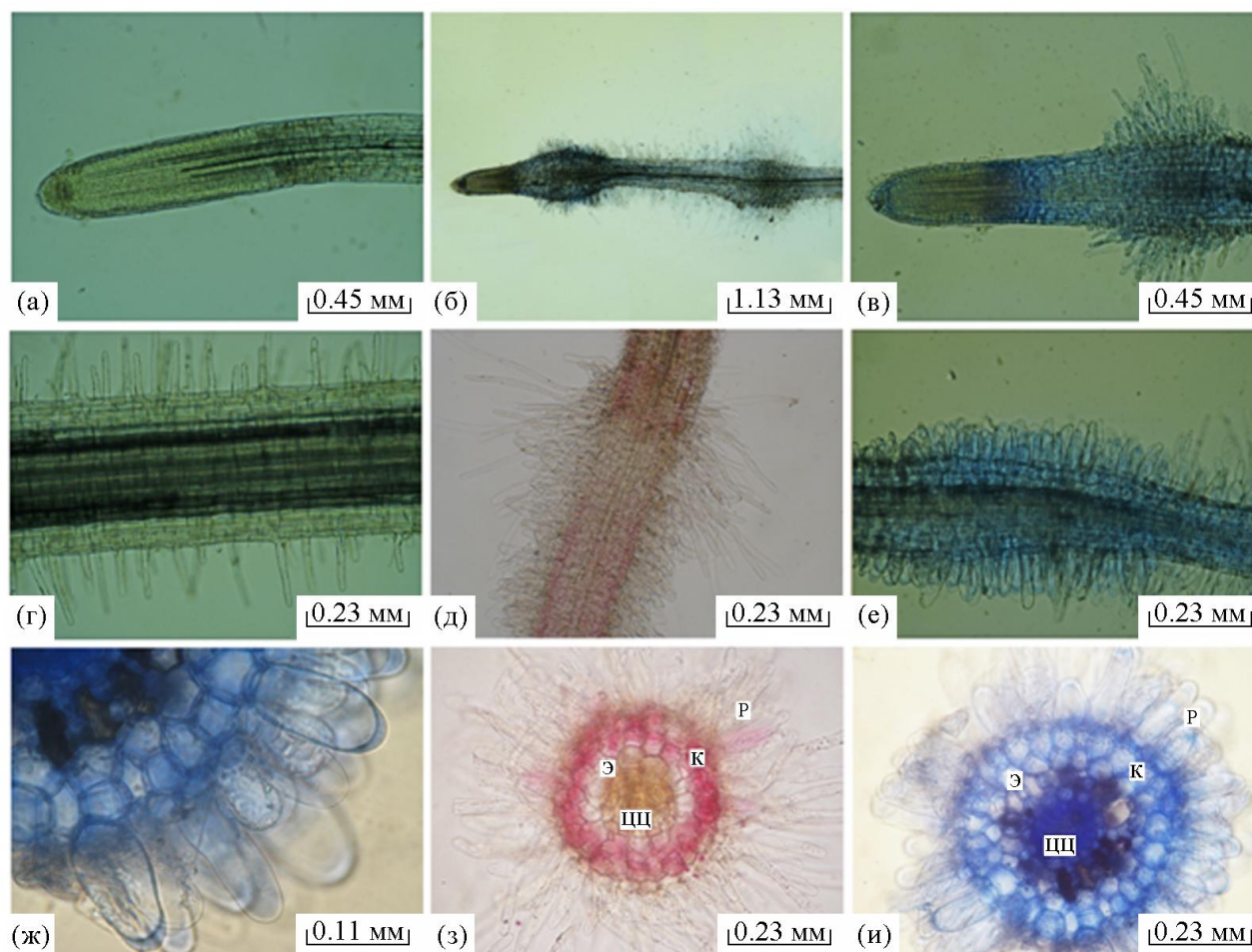
**Рис. 5.** Сухая биомасса корней (а–в) и побегов (г–е) растений *M. guttatus*, выращенных в контрольных условиях (1 мкМ ZnSO<sub>4</sub>) и в условиях избыточных концентраций ZnSO<sub>4</sub> и NiSO<sub>4</sub> в течение 4 нед.



**Рис. 6.** Внешний вид растений *M. guttatus*, выращенных в контрольных условиях (1 мкМ ZnSO<sub>4</sub>) и в условиях избыточных концентраций ZnSO<sub>4</sub> и NiSO<sub>4</sub> в течение 4 нед.

## Микроскопическое исследование корней

Для того чтобы понять, каким образом Ni и Zn влияют на рост и развитие корневой системы у растений *M. guttatus*, было проведено микроскопическое исследование распределения этих металлов в тканях корня и морфологии корней в зоне корневых волосков.



**Рис. 7.** Морфология корня (а–в), корневых волосков (г–ж) и распределение Ni и Zn по тканям корня в зоне корневых волосков (з, и) у растений *M. guttatus*, выращенных в контрольных условиях (1 мкМ ZnSO<sub>4</sub>) и в условиях избыточных концентраций ZnSO<sub>4</sub> и NiSO<sub>4</sub> в течение 4 нед.

**Обозначения:** а, г – контроль; б, в, е, ж, и – ZnSO<sub>4</sub> (50 мкМ); д, з – NiSO<sub>4</sub> (80 мкМ). На (з) и (и): Р – ризодерма, К – кора, Э – эндодерма, ЦЦ – центральный цилиндр.

Известно, что у растений разных видов присутствие в перicycle Ni приводило к ингибированию процессов дифференциации в корне, следствием которого являлось уменьшение количества боковых корней (Серегин, Кожевникова, 2006; Серегин, Кожевникова, 2008). Однако у *M. guttatus* было обнаружено весьма ограниченное поступление Ni в эндодерму и перicycle (рис. 7з). Несмотря на то, что Zn выявлялся во всех тканях корня *M. guttatus* (рис. 7и), процессы ветвления в корневой системе

этих растений при действии Zn могли не нарушаться, т.к. в клетках пероцикла Zn накапливается преимущественно в метаболически малоактивном компартменте – клеточных оболочках (Серегин и др., 2011). При совместном воздействии 80 мкМ NiSO<sub>4</sub> + 50 мкМ ZnSO<sub>4</sub> распределение Zn по тканям корня не изменялось, в то время как локализацию Ni в корне данным методом установить не удалось.

Более того, у растений *M. guttatus* при воздействии 80 мкМ NiSO<sub>4</sub>, 50 мкМ ZnSO<sub>4</sub> и 80 мкМ NiSO<sub>4</sub> + 50 мкМ ZnSO<sub>4</sub> было идентифицировано характерное для железодефицитного состояния изменение морфологии корней и корневых волосков (см. контроль на рис. 7г): в зоне корневых волосков образовывались регулярные утолщения, на которых количество корневых волосков в расчете на единицу площади всасывающей поверхности корня резко увеличивалось (приведены данные варианта 50 мкМ ZnSO<sub>4</sub>; см. рис. 7б, 7в). При этом образовавшиеся корневые волоски были укороченными и утолщенными (приведены данные вариантов 80 мкМ NiSO<sub>4</sub> и 50 мкМ ZnSO<sub>4</sub>; см. рис. 7д, 7е). При воздействии ZnSO<sub>4</sub> в концентрации 50 мкМ корневые волоски принимали фактически шаровидную форму (рис. 7ж).

### **Содержание железа и активность Fe(III)-хелатредуктазы в корнях**

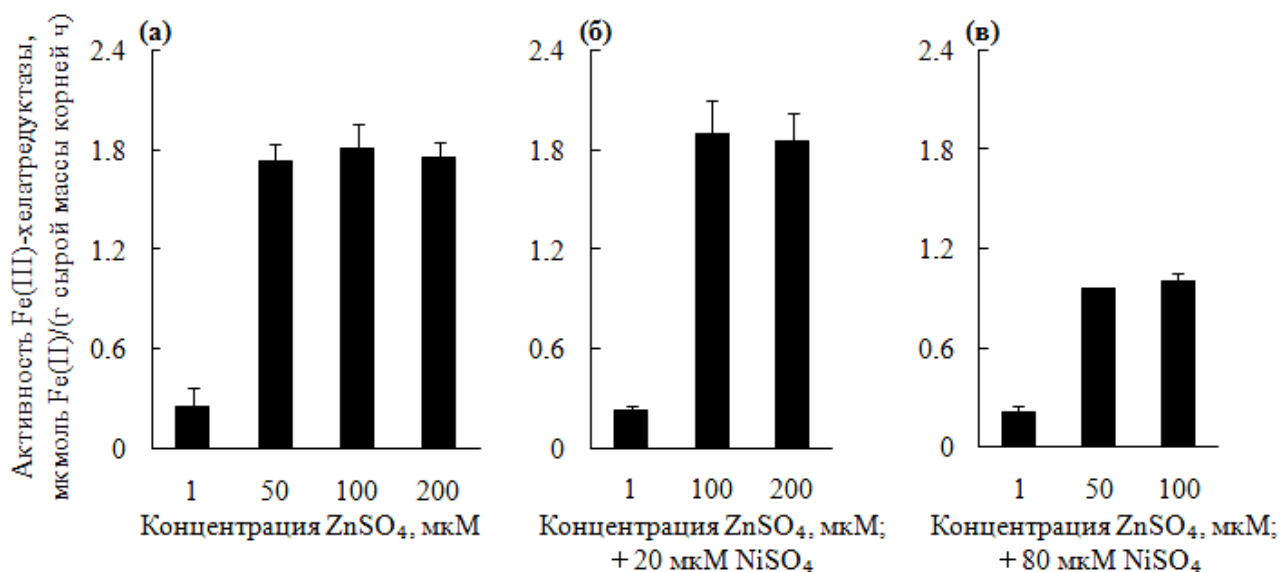
Большинство растений, в том числе *M. guttatus*, благодаря способности снижать рН почвенного раствора ризосферы и восстанавливать Fe<sup>+3</sup> до Fe<sup>+2</sup> при помощи ферментов H<sup>+</sup>-АТФазы и FRO2 поглощает восстановленное железо (ионы Fe<sup>2+</sup>) посредством IRT1 транспортеров (Стратегия I).

Известно, что индикаторами Fe-дефицита у растений со Стратегией I помимо характерного изменения морфологии их корней будут являться увеличение активности H<sup>+</sup>-АТФаз и FRO2, транспорта ионов Fe<sup>2+</sup> посредством IRT1 транспортеров, а также содержания НА в корневой системе (Schmidt *et al.*, 2000; Schikora, Schmidt, 2001; Santi, Schmidt, 2008; Kobayashi, Nishizawa, 2014).

Можно было предполагать, что недостаток Fe в растениях *M. guttatus* является следствием конкуренции ионов Ni<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup> с ионами Fe<sup>2+</sup> при поглощении корнями, либо результатом ингибирования транспорта ионов Fe<sup>2+</sup> в корни из-за снижения в корнях активности фермента FRO2. Однако полученные нами данные не согласуются с высказанными предположениями.

**Таблица.** Содержание Fe в корнях растений *M. guttatus*, выращенных в контрольных условиях (1 мкМ ZnSO<sub>4</sub>) и в условиях избыточных концентраций ZnSO<sub>4</sub> и NiSO<sub>4</sub> в течение 4 нед.

Вариант	Содержание Fe, мкг/г сухой массы	Вариант	Содержание Fe, мкг/г сухой массы
Контроль	9603 ± 480	80 мкМ NiSO <sub>4</sub>	9290 ± 465
50 мкМ ZnSO <sub>4</sub>	9610 ± 384	20 мкМ NiSO <sub>4</sub> + 100 мкМ ZnSO <sub>4</sub>	9433 ± 283
100 мкМ ZnSO <sub>4</sub>	8732 ± 699	20 мкМ NiSO <sub>4</sub> + 200 мкМ ZnSO <sub>4</sub>	9390 ± 470
200 мкМ ZnSO <sub>4</sub>	8541 ± 854	80 мкМ NiSO <sub>4</sub> + 50 мкМ ZnSO <sub>4</sub>	9766 ± 488
20 мкМ NiSO <sub>4</sub>	9423 ± 471	80 мкМ NiSO <sub>4</sub> + 100 мкМ ZnSO <sub>4</sub>	9317 ± 373



**Рис. 8.** Активность Fe(III)-хелатредуктазы в интактных корнях растений *M. guttatus*, выращенных в контрольных условиях (1 мкМ ZnSO<sub>4</sub>) и в условиях избыточных концентраций ZnSO<sub>4</sub> и NiSO<sub>4</sub> в течение 4 нед.

Мы обнаружили, что во всех изученных нами вариантах воздействия солей NiSO<sub>4</sub> и ZnSO<sub>4</sub> содержание Fe в корнях оставалось практически на уровне контроля (таблица), и несмотря на то, что при совместном действии 80 мкМ NiSO<sub>4</sub> и 50 (или 100) мкМ ZnSO<sub>4</sub> происходило ингибирование никелем ZnSO<sub>4</sub>-зависимой стимуляции активности FRO2, уровень активности FRO2 при совместном действии 80 мкМ NiSO<sub>4</sub>

и 50 (или 100) мкМ  $ZnSO_4$  все же значительно превышал уровень активности FRO2 в контрольных условиях (рис. 8а, 8в).

### **Транслокация металлов и содержание железа в листьях**

Zn способствовал увеличению транслокации Ni (рис. 9а, 9б), тогда как Ni на транслокацию Zn не влиял (рис. 9в). При воздействии  $NiSO_4$  транслокация Fe достоверно не изменялась (рис. 9а, 9б), в то время как при воздействии  $ZnSO_4$  она умеренно снижалась с увеличением концентрации  $ZnSO_4$  в культуральной среде (рис. 9а, 9б). При совместном действии 20 мкМ  $NiSO_4$  и 100 (или 200) мкМ  $ZnSO_4$ , а также 80 мкМ  $NiSO_4$  и 50 (или 100) мкМ  $ZnSO_4$  транслокация Fe значительно снижалась при возрастании транслокации Ni (рис. 9а, 9б). Представленные на рис. 9г данные свидетельствуют о наличии строгой обратной корреляции между содержанием Fe и суммарной аккумуляцией Zn и Ni в листьях растений.

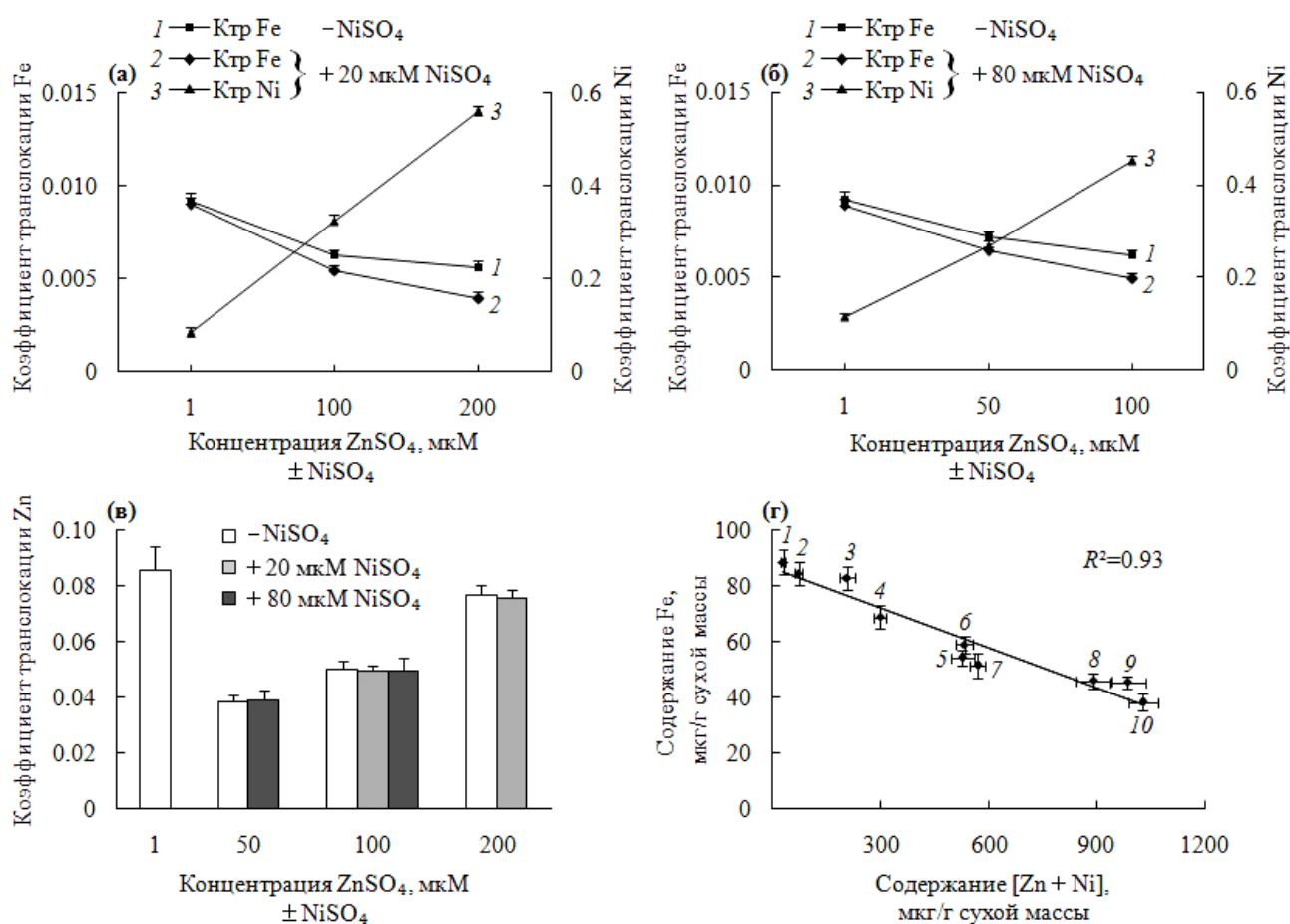
Таким образом, полученные данные убедительно показали, что содержание Fe в листьях *M. guttatus* снижалось по мере увеличения в них аккумуляции Zn, а также суммарной аккумуляции Zn и Ni.

Оценивая интенсивность дальнего транспорта Ni и Fe в растениях *M. guttatus* при совместном действии  $ZnSO_4$  и  $NiSO_4$ , мы обнаружили отрицательную корреляцию между транслокацией Fe и транслокацией Ni (рис. 9а, 9б). На основании этих результатов и уже имеющихся литературных данных нами было высказано предположение, что при совместном действии солей Zn и Ni на растения имеет место конкуренция между ионами  $Ni^{2+}$  и  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  в корнях за комплексообразование с неселективным хелатором ионов этих металлов, возможно, НА, который участвует в радиальном транспорте этих ионов в корнях (Haydon, Cobbett, 2007), а также в дальнем транспорте из корней в побег ионов  $Ni^{2+}$  (Mari *et al.*, 2006; Callahan *et al.*, 2007) и ионов  $Fe^{2+}$  (Hell, Stephan, 2003), и, таким образом, эта конкуренция может явиться причиной снижения содержания Fe в ассимилирующих органах растений.

Эту гипотезу подтвердили результаты проведенного нами микроскопического исследования. В корнях растений, подвергнутых воздействию 80 мкМ  $NiSO_4$ , окрашенные комплексы Ni с ДГ были идентифицированы в ризодерме и коре корня (рис. 7з), в то время как в корнях растений, подвергнутых совместному действию 80 мкМ  $NiSO_4$  и 50 мкМ  $ZnSO_4$ , окрашивания не наблюдалось, несмотря на то, что



содержание Ni в корнях превышало предел чувствительности данного гистохимического метода. Это свидетельствует о том, что стабильность комплексов Ni, присутствовавших в клетках корней *M. guttatus*, была выше стабильности комплексов Ni с ДГ. Так, установлено, что константа устойчивости комплексов Ni с НА ( $\lg K[\text{Ni-НА}] = 16.1$ ) выше константы устойчивости комплексов Ni с ДГ ( $\lg K[\text{Ni-ДГ}] = 14.6$ ) (Furia, 1973; Callahan *et al.*, 2007).



**Рис. 9.** Графики изменения коэффициентов транслокации железа (Ктр Fe), никеля (Ктр Ni) (а, б) и цинка (Ктр Zn) (в) и график корреляции между содержанием Fe и суммарной аккумуляцией Zn и Ni в листьях (г), установленные в опытах с растениями *M. guttatus*, выращенными в контрольных условиях (1 мкМ ZnSO<sub>4</sub>) и в условиях избыточных концентраций ZnSO<sub>4</sub> и NiSO<sub>4</sub> в течение 4 нед.

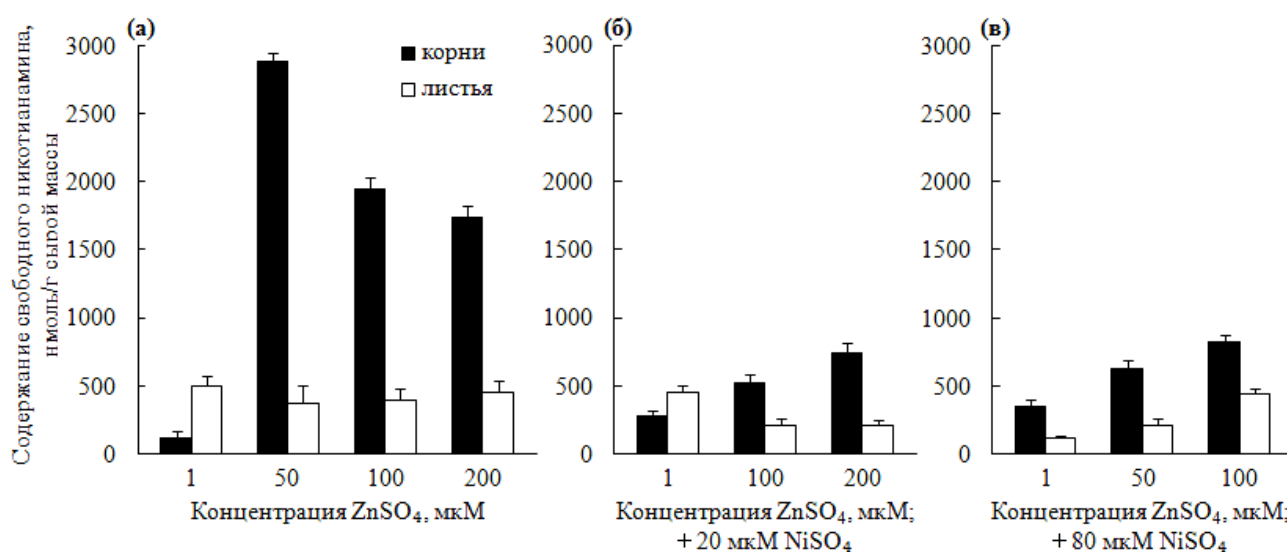
Обозначения на (г): 1 – контроль, 2 – 20 мкМ NiSO<sub>4</sub>, 3 – 80 мкМ NiSO<sub>4</sub>, 4 – 50 мкМ ZnSO<sub>4</sub>, 5 – 100 мкМ ZnSO<sub>4</sub>, 6 – 80 мкМ NiSO<sub>4</sub> + 50 мкМ ZnSO<sub>4</sub>, 7 – 20 мкМ NiSO<sub>4</sub> + 100 мкМ ZnSO<sub>4</sub>, 8 – 80 мкМ NiSO<sub>4</sub> + 100 мкМ ZnSO<sub>4</sub>, 9 – 200 мкМ ZnSO<sub>4</sub>, 10 – 20 мкМ NiSO<sub>4</sub> + 200 мкМ ZnSO<sub>4</sub>.

Принимая во внимание полученные нами результаты анализа распределения Ni в тканях корня, а также литературные данные, касающиеся радиального транспорта ТМ в корне и их транслокации, можно предположить, что у растений *M. guttatus* при воздействии NiSO<sub>4</sub> радиальный транспорт Ni в эндодерме осуществляется

ограниченно, а при совместном действии  $\text{NiSO}_4$  и  $\text{ZnSO}_4$  – интенсивно в составе комплексов Ni–НА, которые затем по ксилеме транспортируются в побег (Mari *et al.*, 2006; Callahan *et al.*, 2007; Серегин, Кожевникова, 2008).

### Содержание свободного никотианамина

Наряду с морфологическими изменениями и увеличением активности FRO2, в ответ на недостаток Fe в листьях в корнях растений *M. guttatus* увеличивалось содержание свободного НА. При этом значительное увеличение содержания свободного НА было установлено при действии  $\text{ZnSO}_4$ . Так, добавление в культуральную среду 50 мкМ  $\text{ZnSO}_4$  вызвало у растений почти 25-кратное увеличение содержания свободного НА (рис. 10а). В то же время в ответ на действие 20 (или 80) мкМ  $\text{NiSO}_4$  уровень свободного НА увеличивался незначительно (рис. 10). При совместном действии 20 мкМ  $\text{NiSO}_4$  и 100 (или 200) мкМ, а также 80 мкМ  $\text{NiSO}_4$  и 50 (или 100) мкМ  $\text{ZnSO}_4$  обнаружено снижение уровня свободного НА относительно уровня свободного НА при действии  $\text{ZnSO}_4$  (рис. 10).

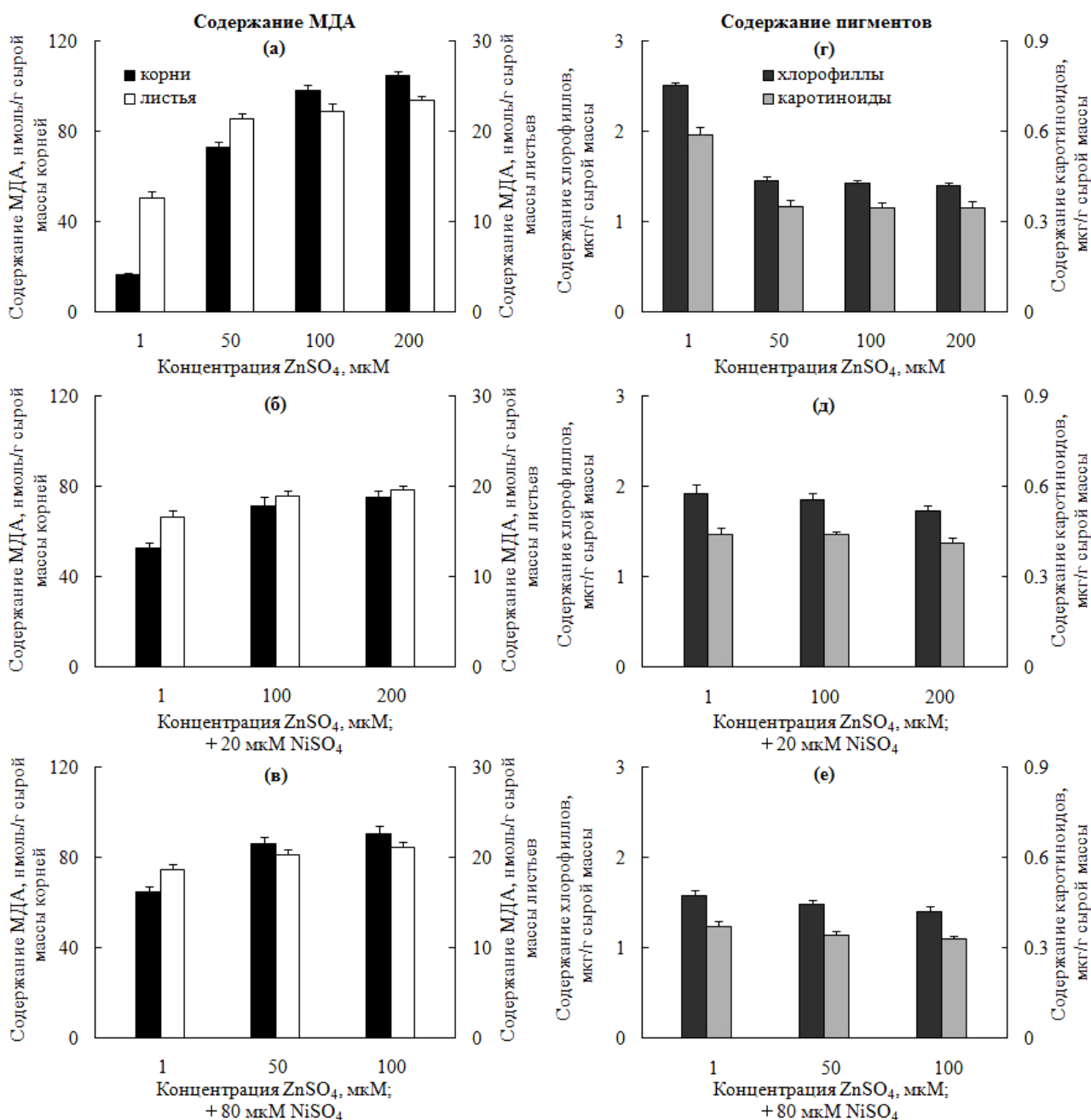


**Рис. 10.** Содержание свободного никотианамина в корнях и листьях растений *M. guttatus*, выращенных в контрольных условиях (1 мкМ  $\text{ZnSO}_4$ ) и в условиях избыточных концентраций  $\text{ZnSO}_4$  и  $\text{NiSO}_4$  в течение 4 нед.

Таким образом, анализ полученных данных совместного действия Zn и Ni на активность FRO2, содержание Fe в корнях и листьях и НА в корнях в дополнение к результатам гистохимического анализа распределения Ni в тканях корня, а также транслокации Fe и Ni и аккумуляции Ni в надземных органах убедительно свидетельствует о том, что в основе прогрессирующего дефицита Fe у растений *M.*

*guttatus* в условиях совместного действия  $\text{NiSO}_4$  и  $\text{ZnSO}_4$  лежит конкуренция между ионами  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$  за неселективный хелатор НА, вовлеченный в дальний транспорт ионов этих ТМ.

### Индикаторы окислительного стресса



**Рис. 11.** Содержание МДА в корнях и листьях (а–в), уровни хлорофиллов (а + б) и каротиноидов (х + с) (г–е) у растений *M. guttatus*, выращенных в контрольных условиях (1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ) и в условиях избыточных концентраций  $\text{ZnSO}_4$  и  $\text{NiSO}_4$  в течение 4 нед.

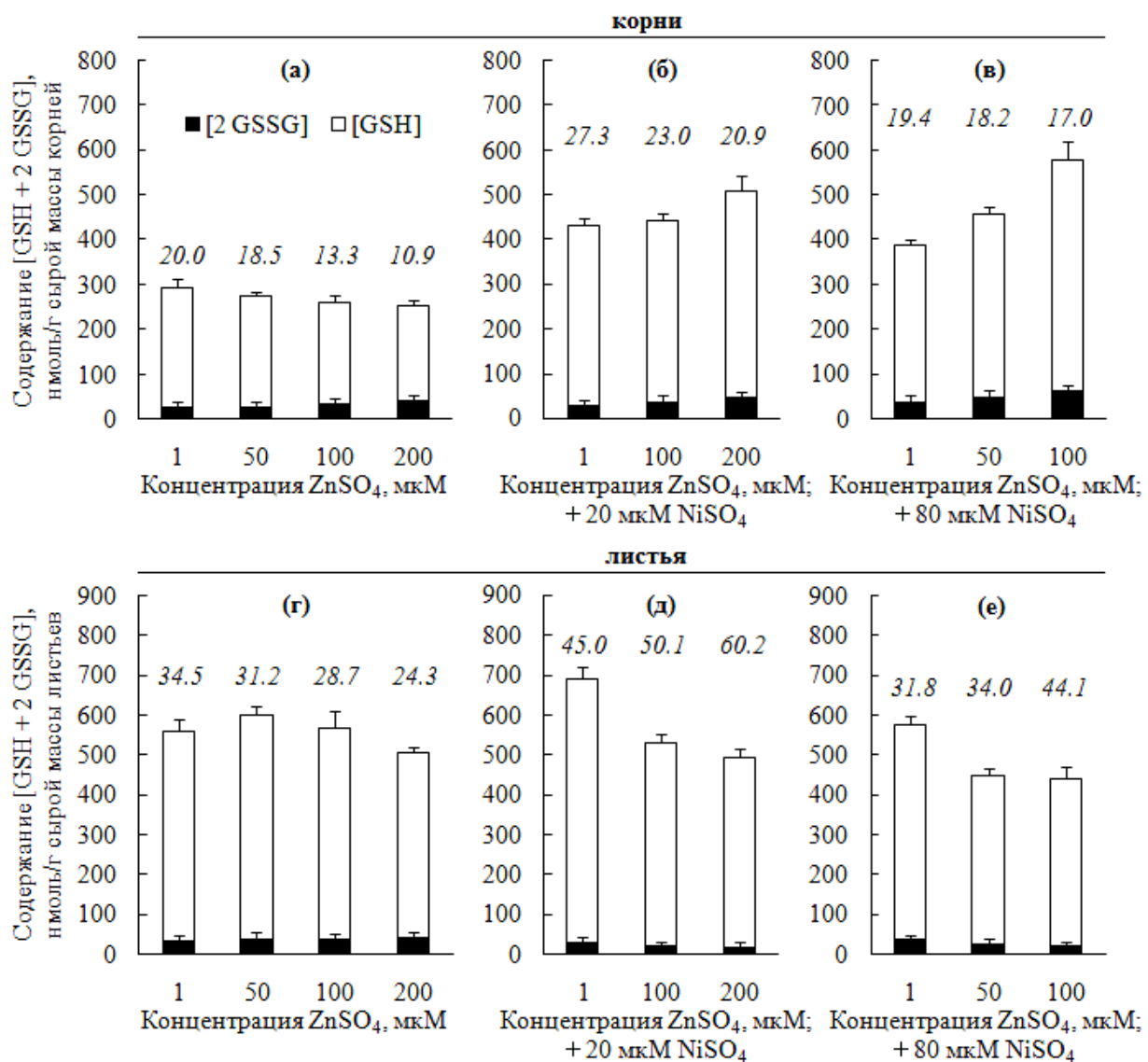
Zn и Ni не являются редокс-активными ТМ, поэтому окислительный стресс индуцируется ими косвенно, посредством нарушения функционирования ферментов и электрон-транспортных цепей (Krämer, Clemens, 2005; Chen *et al.*, 2009).

Интенсивность свободно-радикальных процессов в растительных тканях мы оценивали по уровню перекисного окисления липидов (ПОЛ), используя в качестве его показателя содержание МДА. Как следует из данных, приведенных на рис. 11а–11в, интенсивность ПОЛ в корнях и листьях возрастала с увеличением концентрации солей ТМ в культуральной среде, причем при действии ZnSO<sub>4</sub> она была значительно выше, чем при действии NiSO<sub>4</sub>. При совместном воздействии 20 мкМ NiSO<sub>4</sub> и 100 (или 200) мкМ ZnSO<sub>4</sub>, а также 80 мкМ NiSO<sub>4</sub> и 50 (или 100) мкМ ZnSO<sub>4</sub> уровни МДА как в корнях, так и в листьях достоверно не различались (рис. 11б, 11в) и были несколько выше, чем при раздельном действии NiSO<sub>4</sub>, но ниже, чем при воздействии 100 (или 200) мкМ ZnSO<sub>4</sub> (рис. 11а–11в). При этом установлено, что содержание Хл ( $a + b$ ) и каротиноидов ( $x + c$ ) снижалось по мере увеличения уровня МДА в листьях (рис. 11), отражая этим самым степень нарушения баланса между процессами биосинтеза и деградации пигментов вследствие негативного действия активных форм кислорода (АФК) (Gajewska *et al.*, 2006; Yusuf *et al.*, 2011). Примечательно, что внесение в культуральную среду NiSO<sub>4</sub>, помимо ZnSO<sub>4</sub>, приводило к снижению окислительного статуса в клетках корней и листьев (рис. 11).

### **Функциональное состояние глутатион–пероксидазной системы**

Среди неферментативных антиоксидантов важную роль в детоксикации АФК (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, •ОН, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>) играет трипептид глутатион (γ-Glu-Cys-Gly) (Noctor *et al.*, 2011; Anjum *et al.*, 2012). Известно, что детоксикация пероксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и органических пероксидов (ROOH) при участии GSH может осуществляться глутатион–пероксидазной системой, либо компонентами аскорбат–глутатионового (AsA-GSH) цикла, которые играют ведущую антиоксидантную роль в стрессовых условиях (Прадедова и др., 2010; Gill *et al.*, 2013). Глутатион–пероксидазная система вовлекается в цепь реакций AsA-GSH цикла через реакцию восстановления дигидроаскорбиновой кислоты и включает, помимо GSH, ключевые ферменты его метаболизма: глутатионредуктазы (GR) и пероксидазные глутатион-S-трансферазы

(GST) (Калинина и др., 2008; Kumar *et al.*, 2010; Foyer, Noctor, 2011; Noctor *et al.*, 2012). Peroxidase GST catalyze reactions of  $H_2O_2$  and ROOH reduction with GSH (Noctor *et al.*, 2012), and GR, using as electron donor NADPH, catalyze the reaction of GSSG reduction, thus contributing to the maintenance of a high ratio of reduced/oxidized glutathione (GSH/GSSG) and to the increase of antioxidant status in the cell (Jozefczak *et al.*, 2012; Gill *et al.*, 2013).

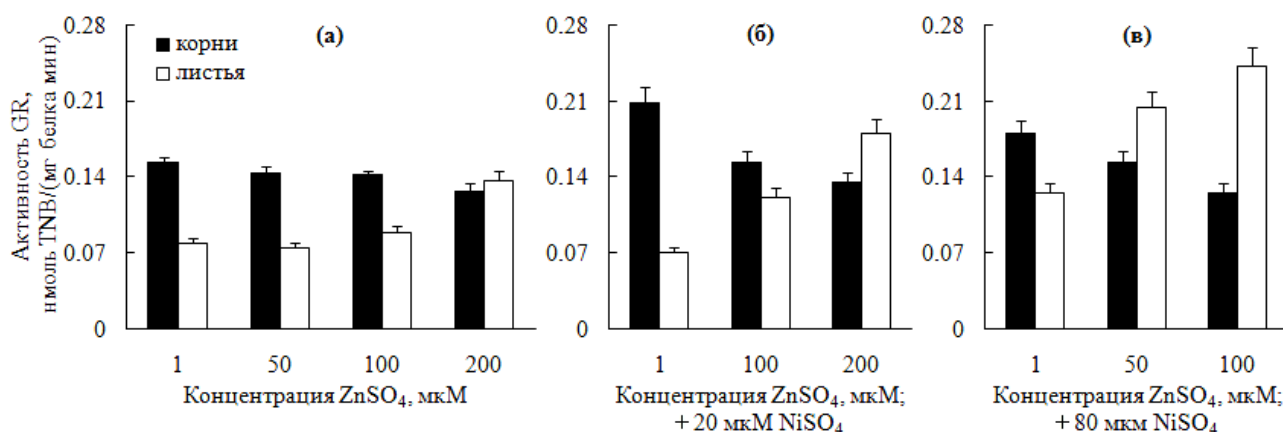


**Рис. 12.** Содержание и статус глутатиона в корнях (а–в) и листьях (г–е) у растений *M. guttatus*, выращенных в контрольных условиях (1 мкМ ZnSO<sub>4</sub>) и в условиях избыточных концентраций ZnSO<sub>4</sub> и NiSO<sub>4</sub> в течение 4 нед.

Обозначения на (а–е): светлый столбик плюс черный столбик – содержание GSHt [GSH + 2 GSSG]; светлый столбик – содержание GSH [GSHt – 2 GSSG]; черный столбик – содержание GSSG [2 GSSG]; цифры над столбиками – соотношение GSH/GSSG.

Считается, что компенсаторными механизмами в функциональном состоянии GR-GSH системы в условиях стресса являются повышение уровня GSht в ответ на аккумуляцию GSSG и увеличение соотношения GSH/GSSG в ответ на снижение уровня GSht (Noctor *et al.*, 2012). Так, у растений *M. guttatus* при совместном действии ZnSO<sub>4</sub> и NiSO<sub>4</sub> одновременное увеличение содержания GSht и GSSG явилось причиной незначительного изменения в соотношении GSH/GSSG в корнях (рис. 12а–12в), а незначительное понижение уровня GSht на фоне снижения содержания GSSG приводило к увеличению соотношения GSH/GSSG в листьях (рис. 12г–12е). Таким образом, мы установили, что у растений *M. guttatus* совместное действие Zn и Ni увеличивает уровень GSht в ответ на аккумуляцию GSSG в корнях и снижает уровень GSSG в ответ на снижение содержания GSht в листьях, что является важной адаптационной реакцией, позволяющей снизить редокс-потенциал в тканях этих органов.

Анализ экспериментальных данных показывает, что ответ растений *M. guttatus* на действие Zn и Ni, оцениваемый по активности GR и пероксидазных GST, является дозозависимым, а также металл- и органоспецифическим.

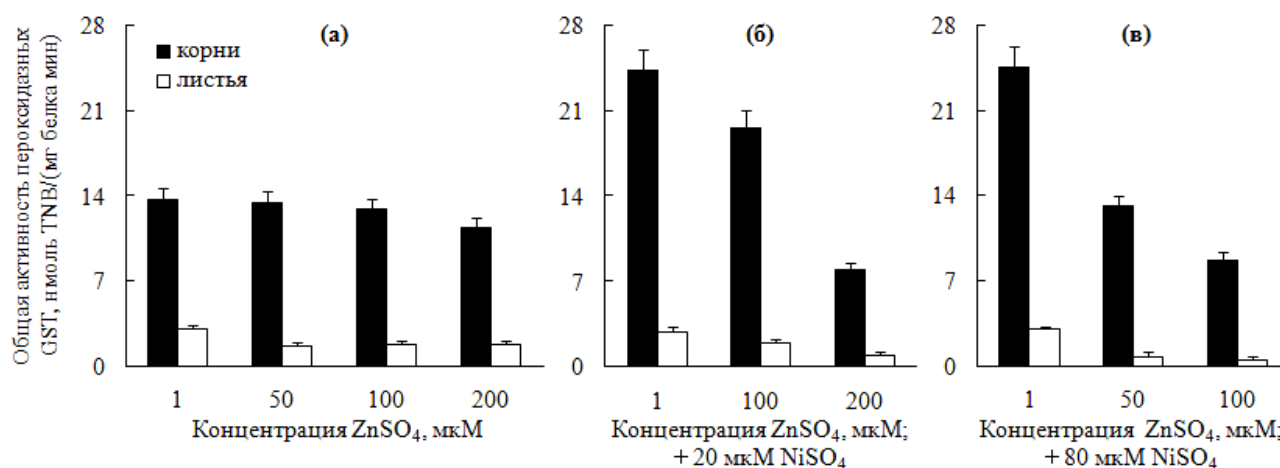


**Рис. 13.** Активность GR в корнях (черные столбики) и листьях (светлые столбики) у растений *M. guttatus*, выращенных в контрольных условиях (1 мкМ ZnSO<sub>4</sub>) и в условиях избыточных концентраций ZnSO<sub>4</sub> и NiSO<sub>4</sub> в течение 4 нед.

С увеличением концентрации ZnSO<sub>4</sub> в культуральной среде активность GR в корнях снижалась, а в листьях возрастала (рис. 13а). В то же время наблюдалось увеличение активности GR при действии 20 (или 80) мкМ NiSO<sub>4</sub> в корнях, а при воздействии 80 мкМ NiSO<sub>4</sub> также и в листьях (рис. 13б, 13в). При увеличении концентрации ZnSO<sub>4</sub> в присутствии NiSO<sub>4</sub> активность GR в корнях снижалась, а в

листьях, напротив, сильно возростала (рис. 13б, 13в). Очевидно, в листьях растений *M. guttatus* синергическое действие Zn и Ni на активность GR является адаптационным механизмом, направленным на снижение интенсивности окислительного стресса и защиту фотосинтетического аппарата от повреждения АФК.

Общая активность пероксидазных GST у растений *M. guttatus* как в корнях, так и в листьях снижалась с увеличением концентрации ZnSO<sub>4</sub> в культуральной среде (рис. 14а), тогда как NiSO<sub>4</sub>, напротив, стимулировал активность этих ферментов (рис. 14). С другой стороны, ZnSO<sub>4</sub>-дозозависимое снижение активности пероксидазных GST наблюдали как в корнях, так и в листьях растений в условиях совместного действия с NiSO<sub>4</sub> (рис. 14б, 14в).



**Рис. 14.** Общая активность пероксидазных GST в корнях (черные столбики) и листьях (светлые столбики) у растений *M. guttatus*, выращенных в контрольных условиях (1 мкМ ZnSO<sub>4</sub>) и в условиях избыточных концентраций ZnSO<sub>4</sub> и NiSO<sub>4</sub> в течение 4 нед.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранее антагонизм процессов поглощения ионов Zn<sup>2+</sup> и Ni<sup>2+</sup> был установлен у растений разных видов – *N. montanum*, *N. caerulea*, *Streptanthus poligaloides*, *Dichapetalum gelonioides* (Серегин, Кожевникова, 2006). Более того, у растений *N. montanum* (гипераккумулятора Ni) было обнаружено увеличение аккумуляции Ni на фоне недостатка Fe и накопления Zn в надземных органах (Boyd, Martens, 1998). Однако при этом не была установлена причина снижения содержания Fe в надземных органах этих растений. В то же время вопрос о том, как функционирует глутатион–пероксидазная система у растений при совместном действии Zn и Ni также до сих пор не изучался. Проведенные нами исследования морфофизиологических и биохимических параметров у растений *M. guttatus* при избытке ионов Zn<sup>2+</sup> и Ni<sup>2+</sup> в

культуральной среде позволили идентифицировать дефицит Fe в надземных органах и установить одну из возможных причин его развития, а также определить двойственный характер (антагонизм и синергизм) совместного действия Zn и Ni на функциональное состояние глутатион–пероксидазной системы. Обнаруженные изменения в функционировании GR-GSH системы были направлены на поддержание более восстановленного состояния внутриклеточной среды, что, по-видимому, обеспечивало снижение интенсивности окислительного стресса в клетках корней и листьев. При этом снижение активности пероксидазных GST, обусловленное антагонистическим характером взаимодействия Zn и Ni на уровне активности этих ферментов, дало основание полагать, что в восстановлении H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> принимают активное участие другие ферменты его метаболизма – аскорбатпероксидазы или/и каталазы. Наряду с этим, полученные нами результаты исследования других физиологических показателей (накопления сухой биомассы, аккумуляции металлов и их транслокации) также явились серьезными дополнительными аргументами в пользу двойственного характера влияния Zn и Ni на физиологические процессы. Таким образом, результаты нашего исследования способствует более глубокому пониманию физиологических реакций и механизмов адаптации растений в условиях комбинированного загрязнения окружающей среды солями Zn и Ni.

## ВЫВОДЫ

1. Установлено, что растения *M. guttatus* способны ограничивать поступление Zn и Ni в надземные органы, аккумулируя их преимущественно в корнях, что явилось подтверждением ранее полученных экспериментальных данных о принадлежности растений этого вида к группе исключателей ТМ.

2. Обнаружена взаимная конкуренция ионов Zn<sup>2+</sup> и Ni<sup>2+</sup> при поглощении корнями *M. guttatus*. Так, поглощение корнями ионов Ni<sup>2+</sup> снижалось в присутствии ионов Zn<sup>2+</sup> в промежутке соотношений концентраций ионов Zn<sup>2+</sup> и Ni<sup>2+</sup> в культуральной среде  $0.625 \leq [Zn^{2+}]/[Ni^{2+}] \leq 10$ , и только при соотношении  $[Zn^{2+}]/[Ni^{2+}] = 0.625$  ионы Ni<sup>2+</sup> также ингибировали поглощение корнями ионов Zn<sup>2+</sup>.

3. Стимулирующее влияние Zn на транслокацию Ni из корней в побег явилось причиной изменения характера распределения Ni в растении, а именно: снижения аккумуляции Ni в корнях и увеличения аккумуляции Ni в листьях. По-видимому,



такой физиологический ответ растений *M. guttatus* на совместное действие  $ZnSO_4$  и  $NiSO_4$  является защитной реакцией, позволяющей избежать сильного повреждения корневой системы двумя ТМ.

4. Следствием антагонизма ионов  $Zn^{2+}$  и  $Ni^{2+}$  при поглощении корнями явилось снижение аккумуляции  $Zn$  в листьях растений *M. guttatus*, когда в культуральной среде соотношение  $[Zn^{2+}]/[Ni^{2+}]$  составило 0.625.

5. Свидетельством более высокой подвижности  $Ni$ , чем  $Zn$  в растении *M. guttatus* явилось равномерное распределение накопления  $Ni$  в побеге, в отличие от  $Zn$ , который накапливался главным образом в стебле и листьях нижнего яруса.

6. По-видимому, конкуренция ионов  $Ni^{2+}$  и  $Fe^{2+}$  за хелатор НА в корневой системе является причиной увеличения аккумуляции  $Ni$  и снижения содержания  $Fe$  в листьях растений *M. guttatus* в условиях совместного действия  $ZnSO_4$  и  $NiSO_4$ .

7. Внесение в культуральную среду  $NiSO_4$ , помимо  $ZnSO_4$ , приводило к снижению окислительного статуса в клетках корней и листьев растений *M. guttatus*, о чем свидетельствовали показатели содержания МДА и фотосинтетических пигментов.

8. Изменения в функционировании GR-GSH системы, обусловленные антагонистическим и синергическим характером действия  $Zn$  и  $Ni$ , были направлены на поддержание более восстановленного состояния внутриклеточной среды, что способствовало снижению интенсивности окислительного стресса в клетках корней и листьев у растений *M. guttatus* в условиях совместного действия солей этих ТМ.

9. Антагонистическое влияние  $Zn$  и  $Ni$  на активность пероксидазных GST, свидетельствует о возможном снижении роли этих ферментов в детоксикации  $H_2O_2$  и ROOH.

10. По-видимому, двойственный характер взаимодействия (антагонизм и синергизм) ионов  $Zn^{2+}$  и  $Ni^{2+}$  на уровне различных физиологических и биохимических процессов направлен на увеличение устойчивости растений к их совместному токсическому действию.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Башмакова Е.Б., Холодова В.П. (2011) Исследование физиологических эффектов взаимодействия избытка  $CuSO_4$  и  $ZnSO_4$  на растения *Mimulus guttatus* DC. В сб.: *Всероссийский симпозиум и школа для молодых ученых по экологической физиологии*

растений «Экология мегаполисов: фундаментальные основы и инновационные технологии», Москва, с. 32.

**2. Башмакова Е.Б.,** Радюкина Н.Л. (2012) Физиологический ответ растений *Mimulus guttatus* DC. на совместное действие NiSO<sub>4</sub> и ZnSO<sub>4</sub> в избыточных концентрациях. В сб.: *VIII Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы экологии – 2012»*, Гродно, с. 10–11.

**3. Башмакова Е.Б.,** Кожевникова А.Д., Радюкина Н.Л. (2013) Эффект увеличения транслокации никеля при совместном действии NiSO<sub>4</sub> и ZnSO<sub>4</sub> на растения *Mimulus guttatus* DC. В сб.: *IX Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы экологии – 2013»*, Гродно, с. 125–126.

**4. Башмакова Е.Б.,** Радюкина Н.Л. (2014) Распределение и аккумуляция никеля и цинка в растениях *Mimulus guttatus* DC. при совместном действии NiSO<sub>4</sub> и ZnSO<sub>4</sub> в питательной среде. В сб.: *Международная научная конференция по биологии и биотехнологии растений*, Алматы, с. 381.

**5. Башмакова Е.Б.,** Радюкина Н.Л. (2014) Возможная роль никотианамина в детоксикации и транспорте никеля при совместном действии NiSO<sub>4</sub> и ZnSO<sub>4</sub> в растениях *Mimulus guttatus* DC. В сб.: *X Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы экологии – 2014»*, Гродно, с. 157–159.

**6. Башмакова Е.Б.,** Пашковский П.П., Радюкина Н.Л. (2015) Физиологические механизмы адаптации растений *Mimulus guttatus* в условиях совместного действия сульфатов никеля и цинка. В сб.: *Всероссийская научная конференция с международным участием и школа для молодых ученых, посвященная 125-летию Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева «Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений»*, Москва, с. 90–93.

**7. Башмакова Е.Б.,** Пашковский П.П., Радюкина Н.Л., Кузнецов Вл.В. (2015) Возможные механизмы развития дефицита железа у растений мимулюса крапчатого в условиях совместного действия солей никеля и цинка. *Физиология растений*, 62, 814–826.

**8. Башмакова Е.Б.,** Пашковский П.П., Радюкина Н.Л., Кузнецов Вл.В. (2016) Совместное действие цинка и никеля на состояние глутатионовой системы у растений мимулюса крапчатого. *Физиология растений*, 63, 668–678.