



**Савочкин Юрий Валерьевич**

**МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ  
РАЗВИТИЯ СЕЯНЦЕВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В  
УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ  
ИОНОВ ЦИНКА**

03.01.05 - Физиология и биохимия растений

**Автореферат**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2012

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

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук

Иванов Юрий Валерьевич

**Официальные оппоненты:**

**Иванов Виктор Борисович**, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, лаборатория физиологии корня, заведующий лабораторией

**Тараканов Иван Германович**, доктор биологических наук, профессор, Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, кафедра физиологии растений, заведующий кафедрой

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет

Защита состоится «9» октября 2012 г. в 13:00 ч. 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, г. Москва, ул. Ботаническая, 35.

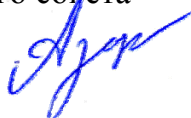
Факс: (495)977-80-18, e-mail: ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук.

Автореферат разослан «8» сентября 2012 года.

Учёный секретарь диссертационного совета

кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Тяжёлые металлы составляют особую группу загрязнителей, неподверженных биодеструкции и способных аккумулироваться в почвах до токсических концентраций. Токсическое действие тяжёлых металлов проявляется в нарушении метаболизма, снижении продуктивности и даже гибели растений (Титов, 2007). В связи с этим изучение реакции растений на действие тяжёлых металлов имеет не только большой научный, но и практический интерес. Среди группы тяжёлых металлов уникальная роль принадлежит цинку, который в качестве кофактора входит в состав всех известных классов ферментов. Цинк характеризуется высокой интенсивностью поглощения растительностью (до 5160 тыс. т/год) (Никонов, 2004), а увеличение техногенной эмиссии в окружающую среду делает его одним из опасных загрязнителей биоты.

Воздействие ионов цинка на растения начали изучать сравнительно недавно, в основном на сельхозкультурах: рис, пшеница (Lichtfouse, 2009); хлопок (Stewart, 2010); сахарный тростник (Jain, 2010); томат (Muschitz, 2009). Большинство исследований выполнено на дикорастущих травянистых растениях: смолёвка приморская (Lichtfouse, 2009); полевица тонкая, овсяница красная, щетинник зелёный (Kaznina, 2009); очиток (Ли, 2008). Существенный вклад в понимание механизмов действия ионов цинка внесло изучение модельных объектов: резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana* L.) (Lichtfouse, 2009) и хрустальной травки (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) (Холодова, 2005). Однако данные о влиянии тяжёлых металлов на хвойные растения носят лишь фрагментарный характер и, в основном, связаны с изучением симбиотического взаимодействия микоризообразователей с сеянцами сосны (Hartley-Whitaker, 2000; Krupa, 2007). Вместе с тем, возрастающая эмиссия тяжёлых металлов создаёт опасность их аккумуляции в почвах лесных земель до токсических уровней, следствием чего может стать деградация наиболее ценных хвойных лесов. Всё это делает актуальным изучение физиологических и молекулярных механизмов устойчивости древесных растений, прежде всего хвойных, к высоким концентрациям тяжёлых металлов.

**Цель и задачи исследования.** Целью работы являлось изучение особенностей развития сеянцев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в условиях повышенного содержания ионов цинка в среде.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние ионов цинка в широком диапазоне концентраций на прорастание семян сосны обыкновенной.
2. Исследовать особенности развития сеянцев сосны обыкновенной на раннем ювенильном этапе онтогенеза в условиях хронического действия ионов цинка.
3. Установить особенности накопления и транслокации ионов цинка в органах сеянцев (корневая система, гипокотиль, семядоли, хвоя), а также оценить влияние их избытка на аккумуляцию ряда элементов минерального питания (K, Ca, Mg, Mn, Fe).
4. Исследовать влияние повышенных концентраций ионов цинка на антиоксидантный статус (содержание  $H_2O_2$  и малонового диальдегида) и функционирование ключевых антиоксидантных систем сеянцев (активности супероксиддисмутазы, каталазы, содержание низкомолекулярных антиоксидантов и пролина).

**Научная новизна.** Впервые изучены особенности развития сеянцев сосны обыкновенной в условиях хронического действия избытка ионов цинка в среде выращивания. Установлены минимальные токсические концентрации ионов цинка, вызывающие раннюю гибель сеянцев. Исследованы особенности аккумуляции и транслокации ионов цинка в органах сеянцев и влияние их избытка на поглощение ряда необходимых элементов минерального питания. Исследовано функционирование ключевых компонентов антиоксидантной системы сосны обыкновенной на ранних этапах онтогенеза в условиях хронического действия ионов цинка. Установлен органоспецифический ответ антиоксидантных систем сеянцев, характеризующийся реципрокным взаимодействием антиоксидантных ферментов и низкомолекулярных антиоксидантов. Впервые показано, что стратегия адаптации сеянцев сосны обыкновенной к токсическому действию ионов цинка направлена на замедление процессов роста и развития, о чем косвенно свидетельствует снижение активности основных компонен-

тов ферментативной антиоксидантной системы.

**Практическая значимость.** Полученные экспериментальные данные могут иметь широкое практическое применение в лесном хозяйстве при оценке перспектив закладки лесных питомников для выращивания стандартного посадочного материала и посадки лесных культур на землях, подверженных загрязнению тяжелыми металлами. Теоретические обобщения диссертационной работы могут быть использованы для разработки программ научных исследований по изучению адаптации древесных видов растений к действию различных стрессоров абиотической природы. Совокупность экспериментальных данных может быть использована для разработки курсов лекций для студентов лесохозяйственных и общебиологических специальностей.

**Апробация работы.** Результаты работы докладывались на 14-й Пущинской международной школе-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2010); школе-конференции «Фундаментальная наука для биотехнологии и медицины» (Москва, 2010); X Международной конференции молодых учёных «Леса Евразии – Подмосковные вечера» (Мытищи, 2010); Всероссийском симпозиуме «Растение и стресс (Plants under Environmental Stress)» (Москва, 2010); Международной научно-практической конференции «Наука о лесе XXI века» (Гомель, 2010); XI Международной конференции молодых учёных «Леса Евразии – Брянский лес» (Брянск, 2011).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, из которых 6 статей в рецензируемых журналах.

**Структура и объём диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Материалы диссертации изложены на 112 страницах машинописного текста и содержат 15 таблиц, 22 формулы и 15 рисунков. Список цитируемой литературы включает 232 наименования, в т. ч. 173 иностранных.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Сосна обыкновенная** (*Pinus sylvestris* L.) – представитель рода сосна (*Pinus*), семейства Сосновые (*Pinaceae*). Обширный ареал произрастания сосны обыкновенной (Shutyaev, 2003) может свидетельствовать о её высоком адаптационном потенциале. Благодаря своим морфофизиологическим особенностям, сосна обыкновенная на ранних этапах онтогенеза является удобным модельным объектом для изучения физиологических механизмов устойчивости хвойных видов к неблагоприятным факторам окружающей среды (Иванов, 2011а).

**В условиях водной культуры** сеянцы сосны выращивали в камере фитотрона со световым периодом 16 ч при мощности освещения 37,6 Вт/м<sup>2</sup> люминесцентных ламп Philips (F36W/54, Голландия), температуре воздуха 23±1°C и 15±1°C и относительной влажности воздуха 55 и 70% днем и ночью соответственно.

**Условия проведения опытов.** Семена сосны проращивали в условиях водной культуры с содержанием 1,26 (контроль), 25, 50, 100, 150 и 300 мкМ ZnSO<sub>4</sub>. После развёртывания семядолей, сеянцы выращивали на питательной среде следующего состава: NH<sub>4</sub><sup>+</sup> – 2.0 мМ; K<sup>+</sup> – 1.5 мМ; Mg<sup>2+</sup> – 0.5 мМ; Na<sup>+</sup> – 0.21 мМ; Ca<sup>2+</sup> – 2.0 мМ; B<sup>3+</sup> – 55 мкМ; Mn<sup>2+</sup> – 5 мкМ; Zn<sup>2+</sup> – 1.26 мкМ; Cu<sup>2+</sup> – 0.32 мкМ; Mo<sup>6+</sup> – 0.1 мкМ; Co<sup>2+</sup> – 0.02 мкМ; Fe<sup>2+</sup> – 9.5 мкМ; NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – 2.0 мМ; PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> – 1.5 мМ; SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> – 0.616 мМ; Cl<sup>-</sup> – 2.0 мМ; Γ – 1.0 мкМ; ЭДТА<sup>4-</sup> – 9.5 мкМ, рН 4.5 с соответствующим содержанием ZnSO<sub>4</sub>. Смену растворов проводили раз в 5 дней. При достижении сеянцами возраста 6 недель – ювенильного этапа онтогенеза, характеризующегося устойчивым формированием ассимилирующих органов, эксперимент прекращали. Для проведения биохимических опытов растения фиксировали в жидком азоте и хранили при -70°C.

**Морфометрические показатели сеянцев.** Оценку темпов накопления биомассы сеянцами проводили гравиметрическим методом с точностью до 0,1 мг. Измерения длин органов сеянцев (главный корень, гипокотиль, семядоли, хвоя), протяжённость зоны образования боковых корней, их количества и общей длины, а также подсчёт количества хвоинок проводили в программе MapInfo Professional v.9.5 после сканирования сеянцев с разрешением 800 dpi.

**Содержание металлов** (Zn, K, Ca, Mg, Fe, Mn) в тканях растений определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре Лабист-400 («Лабист», Россия) после минерализации в растворах концентрированных  $\text{HNO}_3$  и  $\text{HClO}_4$  (2:1) в течение 24 ч при комнатной температуре и инкубации в термостате TDB-A-400 («BioSan», Латвия) последовательно при  $150^\circ\text{C}$  – в течение 1,5 ч и  $180^\circ\text{C}$  – в течение 2 ч (Иванов, 2011а).

**Содержание малонового диальдегида (МДА)** определяли спектрофотометрически по образованию окрашенного комплекса МДА с тиобарбитуровой кислотой при нагревании (Heath и Packer, 1968).

**Содержание перекиси водорода** оценивали спектрофотометрически по образованию окрашенного комплексного соединения – пероксида титана из сульфата титана  $\text{Ti}_2(\text{SO}_4)_3$  (Brennan, Frenkel, 1977).

**Экстракцию и определение общей активности супероксиддисмутазы (СОД)** проводили по методу, основанному на ингибировании СОД фотохимического восстановления нитросинего тетразолия до формазана (Beauchamp, Fridovich, 1971), и выражали в условных единицах активности СОД/мг белка.

**Активность каталазы** измеряли спектрофотометрически по скорости разрушения перекиси водорода каталазой грубого экстракта (Maehly and Chance, 1954).

**Нативный электрофорез СОД** проводили в полиакриламидном геле (12% разделяющий и 5% концентрирующий) по стандартной методике Лэмли (Laemmli, 1970) на приборе Bio-Rad, «Mini protein 3», США. Для равномерной загрузки слотов при проведении гель-электрофореза СОД образцы выравнивали по содержанию белка методом, основанном на восстановлении меди при взаимодействии с белками в щелочных условиях в присутствии бицинхониновой кислоты (Smith, 1985). Визуализацию отдельных изоформ СОД проводили методами, предложенными Мизальским (Miszalski, 1998).

**Содержание низкомолекулярных антиоксидантов** измеряли спектрофотометрически по интенсивности обесцвечивания окрашенного ABTS (2,2'-azinobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]) и  $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$  комплекса при восстановлении низкомолекулярными антиоксидантами свободных ABTS-радикалов (Re, 1999) и выражали

в единицах тролокса/г сырой биомассы.

**Экстракцию и определение содержания свободного пролина** проводили по методу предложенному Бэйтсом с соавт. (Bates, 1973).

**Содержание белка в ферментных препаратах** проводили спектрофотометрически с использованием красителя Кумасси R-250 по Эсену (Esen, 1978).

**Определение осмотического потенциала** проводили на осмометре Osmomat 030 «Gonotec» (Германия). Величину осмотического потенциала выражали в мОсм/л клеточного сока.

Каждый эксперимент реализован в трёх независимых повторностях. Сильно отклоняющиеся варианты выборки исключали из анализа на основании критических значений разности между двумя крайними вариантами совокупности на уровне значимости 0,01. Выборочные совокупности обрабатывали методами параметрической статистики (t-критерий Стьюдента) в среде Microsoft Excel 2003. Итоговые данные представляют собой среднюю арифметическую величину  $\pm$  основную ошибку средней величины.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Влияние повышенных концентраций ионов цинка на формирование и развитие сеянцев сосны обыкновенной**

Этап прорастания семени и ранний ювенильный этап являются наиболее критическими этапами в жизни древесных растений (Иванов, 2011а). В связи с этим нами проанализировано влияние повышенных концентраций ионов цинка на посевные качества семян сосны обыкновенной. Руководствуясь требованиями межгосударственного стандарта (ГОСТ 13056.6-97, 1998), энергию прорастания семян оценивали через 7 суток, а их абсолютную всхожесть – через 15 суток после замачивания в растворах  $ZnSO_4$  в дистиллированной воде. Средний семенной покой выражали в днях и определяли путём суммирования произведений числа проросших семян на соответствующий день учёта и последующим делением суммы на число проросших семян.



Таблица 1 – Влияние цинка на посевные качества семян сосны

Наименование показателя	ZnSO <sub>4</sub> , мкМ			
	1,26	50	150	300
Абсолютная всхожесть семян, %	90,3 ± 1,2	91,5 ± 1,9	89,7 ± 0,6	89,7 ± 0,7
Энергия прорастания, %	72,9 ± 1,6	80,8 ± 2,9	73,3 ± 3,5	75,4 ± 4,2
Средний семенной покой, дни	7,3 ± 0,2	6,9 ± 0,1	7,5 ± 0,3	7,2 ± 0,2

Анализ полученных данных свидетельствует об отсутствии выраженного влияния ионов цинка на посевные качества семян (табл. 1), что также показано нами в экспериментах с более высокими концентрациями ZnSO<sub>4</sub> (Иванов, 2011б). Учитывая повышенное количество погибших сеянцев (27% по отношению к контролю) через 6 недель эксперимента при хроническом действии 300 мкМ Zn<sup>2+</sup> и полную гибель сеянцев через 16 недель, в качестве рабочих были выбраны концентрации 25, 50, 100 и 150 мкМ Zn<sup>2+</sup>.

Действие повышенных концентраций ионов цинка вызывало значительное снижение темпов накопления сырой биомассы сеянцев (табл. 2) (коэффициент корреляции ( $r$ ) = 0,89; достоверность коэффициента корреляции ( $t_r$ ) = 2,80). Содержание воды в органах сеянцев во всех экспериментальных вариантах сохранялось на стабильном уровне (табл. 2), что свидетельствует о высокой водоудерживающей способности тканей сеянцев сосны. Наиболее чувствительными к хроническому действию ионов цинка оказались корневая система и хвоя сеянцев. Ингибирование накопления сухой биомассы корневой системой ( $r$  = -0,91;  $t_r$  = 3,01) и хвоей ( $r$  = -0,95;  $t_r$  = 4,18) сеянцев проходило пропорционально увеличению концентрации ионов цинка в среде (табл. 2), тогда как ингибирования роста и развития гипокотилей и семядолей сеянцев не наблюдалось (табл. 2).

Таблица 2 – Развитие сеянцев сосны в условиях хронического действия ионов цинка

Наименование показателя	ZnSO <sub>4</sub> , мкМ			
	1,26 (контроль)	50	100	150
Сырая биомасса, мг				
Сеянец	299,7 ± 8,5	221,6 ± 5,8	239,4 ± 7,5	172,2 ± 5,5
Сухая биомасса органов сеянцев, мг				
Корневая система	7,8 ± 0,6	5,7 ± 0,5	5,6 ± 0,8	4,9 ± 0,9
Гипокотиль	4,6 ± 0,3	3,9 ± 0,3	4,7 ± 0,2	4,1 ± 0,2
Семядоли	5,3 ± 0,3	4,8 ± 0,3	5,3 ± 0,3	5,7 ± 0,1
Хвоя	35,7 ± 3,5	25,5 ± 0,9	24,7 ± 2,6	18,6 ± 1,5
Относительное содержание воды, %				
Корневая система	91,8 ± 0,3	91,3 ± 0,2	90,8 ± 0,3	89,3 ± 0,9
Гипокотиль	71,7 ± 1,0	72,3 ± 0,8	70,7 ± 1,1	73,0 ± 1,0
Семядоли	76,2 ± 0,7	74,9 ± 0,6	74,6 ± 0,7	74,8 ± 0,8
Хвоя	79,5 ± 0,4	80,5 ± 0,3	79,7 ± 0,3	79,7 ± 0,2
Длина, мм				
Главный корень	200,5 ± 4,2	161,7 ± 3,0	149,3 ± 3,1	115,1 ± 2,8
Гипокотиль	30,4 ± 0,3	28,8 ± 0,3	29,1 ± 0,3	29,6 ± 0,3
Семядоли	27,2 ± 0,2	24,4 ± 0,2	25,0 ± 0,3	24,6 ± 0,3
Хвоя	37,0 ± 0,4	34,1 ± 0,4	32,4 ± 0,4	29,7 ± 0,4

Токсическое действие ионов цинка проявлялось в снижении длины хвои сеянцев на 8% при 50 мкМ Zn<sup>2+</sup> ( $t = 5,13$ ,  $p = 0,001$ ), 12% при 100 мкМ ( $t = 8,13$ ;  $p = 0,001$ ), и 20% при 150 мкМ ( $t = 12,90$ ;  $p = 0,001$ ) (табл. 2).

Увеличение концентрации ионов цинка в питательном растворе приводило к пропорциональному снижению количества сформировавшихся хвоинок ( $r = -0,95$ ;  $t_r = 3,96$ ) (рис. 1): на 23% ( $t = 7,33$ ;  $p = 0,001$ ) при действии 50 мкМ ZnSO<sub>4</sub>, 30% ( $t = 9,18$ ;  $p = 0,001$ ) и 37% ( $t = 12,18$ ;  $p = 0,001$ ) при действии 100 и 150 мкМ соответственно.

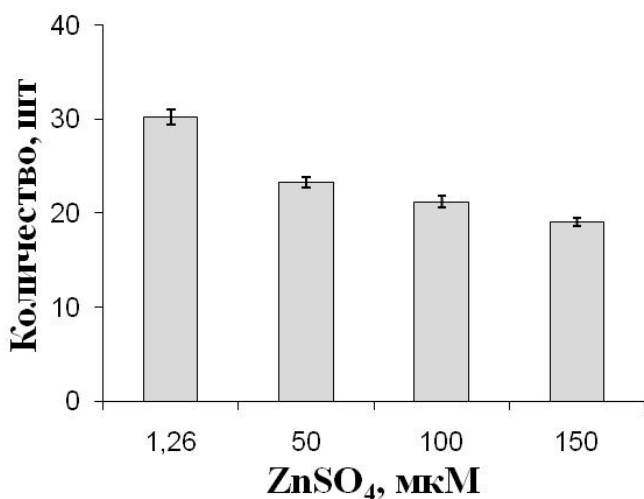


Рисунок 1 – Количество сформированных хвоек в условиях хронического действия ионов цинка

Токсичность ионов цинка в высоких концентрациях проявлялась в ингибировании развития корневой системы сеянцев сосны (рис. 2).

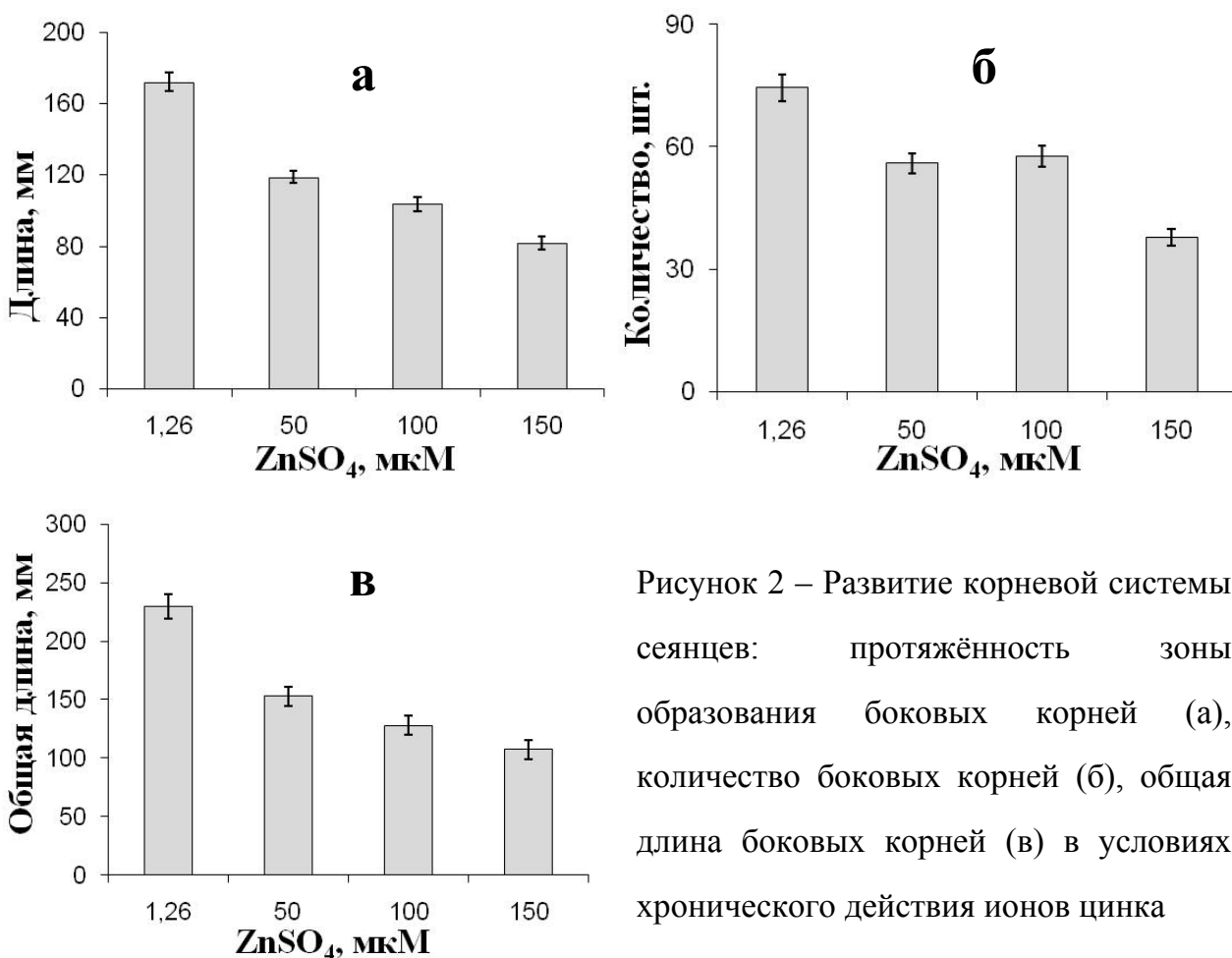


Рисунок 2 – Развитие корневой системы сеянцев: протяжённость зоны образования боковых корней (а), количество боковых корней (б), общая длина боковых корней (в) в условиях хронического действия ионов цинка

Ингибирование прироста главного корня в длину у сеянцев, выращенных при 50 мкМ ZnSO<sub>4</sub>, составило 19% ( $t = 7,48$ ;  $p = 0,001$ ), при 100 мкМ – 26% ( $t = 9,76$ ;  $p = 0,001$ ), и 43% ( $t = 16,73$ ;  $p = 0,001$ ) при 150 мкМ Zn<sup>2+</sup> (табл. 2). Сравнение данных об изменении протяжённости зоны образования боковых корней (рис. 2а) с длиной глав-

ного корня (табл. 2) в условиях повышенных концентраций ионов цинка свидетельствует о её сокращении с 86% в контроле до 76% при 150 мкМ  $Zn^{2+}$ .

Ингибирование формирования боковых корней в условиях токсического действия ионов цинка по отношению к контрольной группе сеянцев составило: 25% ( $t = 4,59$ ;  $p = 0,001$ ) при 50 мкМ  $Zn^{2+}$ , 23% ( $t = 4,08$ ;  $p = 0,001$ ) при 100 мкМ и 49% ( $t = 9,67$ ;  $p = 0,001$ ) при 150 мкМ (рис. 2б). При этом токсическое действие 50 мкМ  $ZnSO_4$  снижало общую протяжённость боковых корней на 33% ( $t = 5,68$ ;  $p = 0,001$ ), 100 мкМ на 44% ( $t = 7,42$ ;  $p = 0,001$ ) и 150 мкМ на 53% ( $t = 9,19$ ;  $p = 0,001$ ) (рис. 2в). Ингибирование роста и развития корневой системы связано с замедлением интенсивности клеточных делений в присутствии ионов тяжелых металлов, уменьшением количества клеток на всех фазах митоза и увеличением продолжительности всего митотического цикла (Серёгин, 2001а).

#### Аккумуляция ионов цинка сеянцами сосны обыкновенной

При всех исследованных концентрациях  $ZnSO_4$  наблюдалась значительная аккумуляция ионов цинка в корневой системе сеянцев ( $r = 0,96$ ;  $t_r = 4,60$ ) (рис. 3).

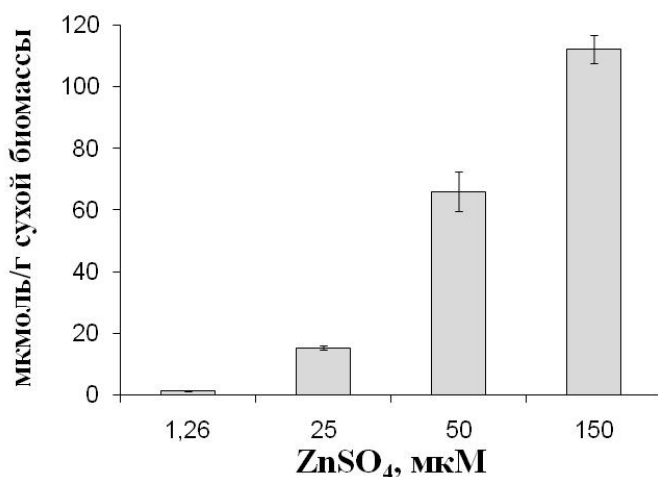


Рисунок 3 – Содержание ионов цинка в корневой системе сеянцев сосны

Отмечено увеличение накопления ионов цинка в корневой системе сеянцев с 15 мкмоль/г сухой биомассы (25 мкМ  $Zn^{2+}$ ) до 112 мкмоль/г сухой биомассы (150 мкМ  $Zn^{2+}$ ) (рис. 3).

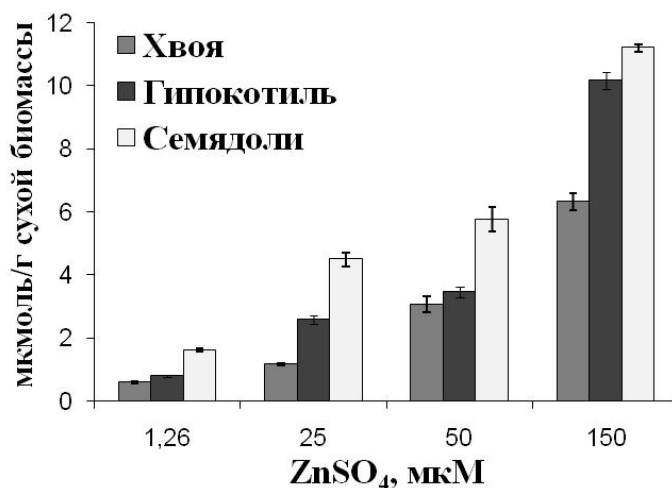


Рисунок 4 – Содержание ионов цинка в надземных органах сеянцев сосны

Анализ полученных данных свидетельствует о выраженной аккумуляции ионов цинка в гипокотилиях и семядолях, по сравнению с хвоей сеянцев (рис. 4). На основании этого можно предположить, что гипокотили и семядоли сеянцев сосны, накапливая ионы цинка, препятствуют их поступлению в хвою.

Особенности накопления и транслокации ионов цинка в органах сеянцев сосны обыкновенной позволяют отнести её к группе типичных индикаторов, накапливающих ионы цинка в надземных органах пропорционально увеличению концентрации ионов металла в субстрате (гипокотили  $r = 0,998$ ;  $t_r = 20,66$ ; семядоли  $r = 0,99$ ;  $t_r = 8,71$ ; хвоя  $r = 0,99$ ;  $t_r = 9,21$ ) (рис. 4).

### **Исследование антиоксидантного статуса сеянцев сосны обыкновенной при действии повышенных концентраций ионов цинка**

Токсическое действие повышенных концентраций ионов цинка практически не приводило к изменению содержания перекиси водорода и малонового диальдегида в органах сеянцев сосны (табл. 3).

Таблица 3 – Содержание перекиси водорода и МДА в органах сеянцев сосны в условиях хронического действия ионов цинка

Наименование органа	ZnSO <sub>4</sub> , мкМ			
	1,26 (контроль)	50	100	150
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , мкмоль/г сырой биомассы				
Корневая система	9,4 ± 0,7	8,9 ± 1,1	8,6 ± 0,2	7,5 ± 0,1
Гипокотиль	11,6 ± 0,3	10,2 ± 0,2	13,2 ± 1,0	12,6 ± 0,1
Семядоли	20,1 ± 1,9	23,5 ± 1,3	24,7 ± 1,0	21,9 ± 1,1
Хвоя	12,0 ± 0,7	10,5 ± 0,3	11,1 ± 0,7	10,4 ± 0,6
МДА, мкмоль/г сырой биомассы				
Корневая система	0,155 ± 0,009	0,151 ± 0,004	0,144 ± 0,004	0,159 ± 0,006
Гипокотиль	0,266 ± 0,028	0,234 ± 0,020	0,212 ± 0,024	0,260 ± 0,034
Семядоли	0,158 ± 0,012	0,152 ± 0,012	0,180 ± 0,001	0,230 ± 0,046
Хвоя	0,111 ± 0,003	0,122 ± 0,004	0,163 ± 0,006	0,135 ± 0,007

Стабильный уровень перекиси водорода и МДА в органах сеянцев (табл. 3) свидетельствует об отсутствии развития окислительного стресса в условиях хронического действия ионов цинка. Отсутствие симптомов окислительного стресса в условиях продолжительного действия повышенных концентраций ионов цинка, очевидно, свидетельствует об эффективном функционировании антиоксидантных систем сеянцев (Иванов, 2012а). В связи с этим нами были исследованы функционирование ферментативной антиоксидантной системы (СОД, каталаза), содержание низкомолекулярных антиоксидантов и пролина (табл. 4-7).

Таблица 4 – Активность СОД в органах сеянцев сосны в условиях хронического действия ионов цинка, усл. ед. активности/мг белка

Наименование органа	ZnSO <sub>4</sub> , мкМ			
	1,26 (контроль)	50	100	150
Корневая система	421,1 ± 81,2	295,6 ± 35,2	224,6 ± 30,5	167,3 ± 23,2
Гипокотиль	488,9 ± 92,7	1487,8 ± 278,6	1246,8 ± 184,9	1643,7 ± 203,5
Семядоли	697,3 ± 99,5	492,1 ± 68,6	1246,5 ± 153,5	1312,3 ± 136,7
Хвоя	109,0 ± 5,1	72,8 ± 3,1	59,2 ± 4,0	66,9 ± 4,4

Анализ полученных данных свидетельствует о дифференциальном характере изменения общей активности СОД в органах сеянцев в условиях повышенных кон-

центраций ионов цинка. Снижение активности СОД в корнях по сравнению с контролем составило 30% ( $t = 1,42$ ;  $p > 0,05$ ) при 50 мкМ, 47% ( $t = 2,26$ ;  $p = 0,05$ ) при 100 мкМ и 60% ( $t = 3,00$ ;  $p = 0,01$ ) при 150 мкМ  $Zn^{2+}$ . В хвое ингибирование активности СОД составило 33% ( $t = 6,09$ ;  $p = 0,001$ ) при 50 мкМ, 46% ( $t = 7,72$ ;  $p = 0,001$ ) при 100 мкМ и 39% ( $t = 6,29$ ;  $p = 0,001$ ) при 150 мкМ  $Zn^{2+}$ . По-видимому, это связано с интенсивностью и продолжительностью воздействия ионов цинка на сеянцы сосны.

Действие повышенных концентраций ионов цинка приводило к увеличению общей активности СОД в гипокотылях и семядолях. При этом в гипокотылях зафиксировано увеличение активности СОД более чем в два раза по отношению к контролю (табл. 4) в ответ на хроническое действие избытка ионов цинка. В семядолях действие 50 мкМ  $ZnSO_4$  снижало активность СОД на 29% ( $t = 1,70$ ;  $p > 0,05$ ), тогда как 100 и 150 мкМ  $Zn^{2+}$  увеличивали активность фермента на 79% ( $t = 3,00$ ;  $p = 0,01$ ) и 88% ( $t = 3,64$ ;  $p = 0,01$ ) соответственно (табл. 4).

Изоферментный анализ показал, что активность СОД в органах сеянцев представлена главным образом Cu/Zn-СОД. Повышенные концентрации ионов цинка в питательном растворе не приводили к изменению изоферментного состава СОД в органах сеянцев сосны, а активности Cu/Zn-изоформ СОД различной клеточной локализации изменялись дифференциально (рис. 5).

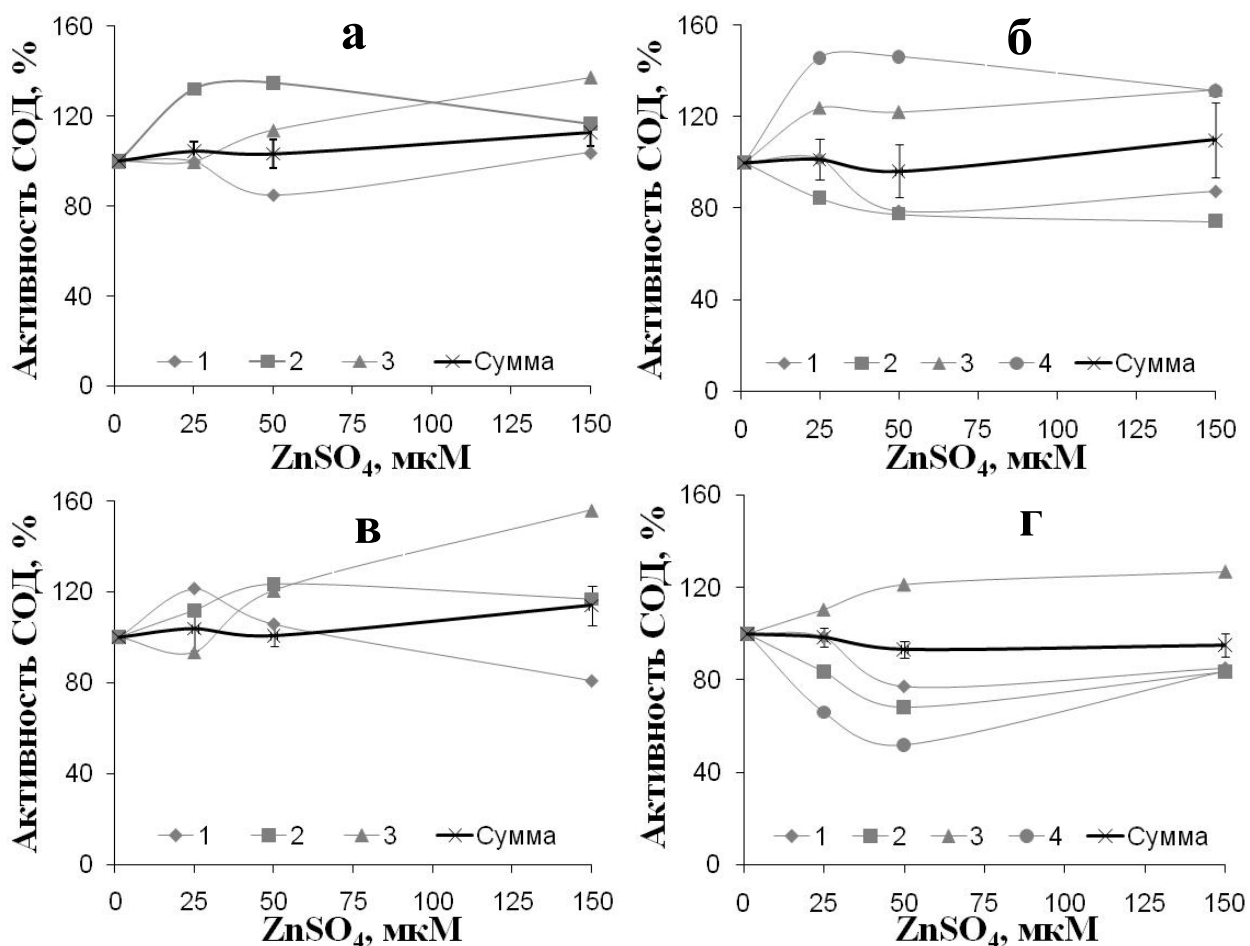


Рисунок 5 – Активность изоформ Cu/Zn-СОД различной клеточной локализации в корневой системе (а), семядолях (б), гипокотылях (в) и хвое (г) сеянцев в условиях хронического действия ионов цинка. За 100% принята активность изоформ Cu/Zn-СОД сеянцев, выращенных в контрольных условиях

Другим ключевым компонентом группы ферментов-антиоксидантов, участвующих в инактивации АФК, является каталаза.

Таблица 5 – Активность каталазы в органах сеянцев сосны в условиях хронического действия ионов цинка, ммоль Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>/мг белка·мин

Наименование органа	ZnSO <sub>4</sub> , мкМ			
	1,26 (контроль)	50	100	150
Корневая система	17,1 ± 1,6	16,2 ± 2,3	11,7 ± 1,1	5,2 ± 0,4
Гипокотиль	24,0 ± 1,1	63,7 ± 4,2	50,7 ± 9,3	42,3 ± 5,8
Семядоли	15,6 ± 1,9	13,4 ± 1,6	31,6 ± 4,7	22,0 ± 3,3
Хвоя	14,8 ± 4,0	5,6 ± 0,4	4,5 ± 0,4	4,2 ± 0,2



Следует отметить, что изменение активности каталазы в органах сеянцев сосны (табл. 5) в условиях повышенных концентраций ионов цинка проходило пропорционально изменению активности СОД (корневая система  $r = 0,88$ ;  $t_r = 2,65$ ; гипокотили  $r = 0,76$ ;  $t_r = 1,64$ ; семядоли  $r = 0,84$ ;  $t_r = 9,04$ ; хвоя  $r = 0,98$ ;  $t_r = 7,27$ ) (табл. 4). В связи с этим можно сделать вывод о том, что активность каталазы в большей степени зависела от содержания  $H_2O_2$ , являющейся продуктом реакции дисмутации.

Снижение активности основных антиоксидантных ферментов в корневой системе и хвое сеянцев в условиях продолжительного действия повышенных концентраций ионов цинка, косвенно характеризует замедление интегральных процессов метаболизма.

Таблица 6 – Содержание низкомолекулярных антиоксидантов в органах сеянцев сосны обыкновенной, мкмоль тролокса/г сырой биомассы

Наименование органа	ZnSO <sub>4</sub> , мкМ			
	1,26 (контроль)	25	50	150
Корневая система	36,7 ± 1,6	37,9 ± 0,8	22,3 ± 1,1	25,2 ± 1,5
Гипокотиль	55,9 ± 2,2	69,4 ± 2,6	60,8 ± 2,4	52,5 ± 1,2
Семядоли	33,6 ± 2,0	38,4 ± 1,1	34,8 ± 1,7	34,5 ± 1,5
Хвоя	28,6 ± 0,8	32,1 ± 0,7	26,6 ± 1,0	29,5 ± 0,7

Токсическое действие повышенных концентраций ионов цинка приводило к увеличению содержания низкомолекулярных антиоксидантов в гипокотилиях (за исключением 150 мкМ  $Zn^{2+}$ ) и семядолях сеянцев (табл. 6). Наиболее выраженное увеличение содержания низкомолекулярных антиоксидантов в гипокотилиях и семядолях отмечено в условиях 25 мкМ  $ZnSO_4$  – 24% ( $t = 3,91$ ;  $p = 0,001$ ) и 14% ( $t = 2,08$ ;  $p = 0,05$ ) соответственно (табл. 6). Отсутствие дозовой зависимости между концентрацией ионов цинка и содержанием низкомолекулярных антиоксидантов отмечено в хвое сеянцев ( $r = -0,03$ ;  $t_r = 0,04$ ) (табл. 6) при колебаниях в пределах 14% по отношению к контролю. В отличие от надземных органов, действие повышенных концентраций ионов цинка (50 и 150 мкМ  $Zn^{2+}$ ) вызывало снижение данного показателя в корнях сеянцев по отношению к контрольным растениям на 39% ( $t = 7,44$ ;  $p = 0,001$ ) и 31% ( $t = 5,25$ ;  $p = 0,001$ ) соответственно (табл. 6).

Среди низкомолекулярных антиоксидантов особое место занимает пролин, антиоксидантные свойства которого связывают со способностью стабилизировать структуры белков и мембран за счёт образования гидрофильных оболочек. Такие образования препятствуют инактивации белков гидроксильными радикалами и синглетным кислородом (Кузнецов, 1999). В условиях хронического действия ионов цинка во всех органах семян происходило увеличение содержания пролина (табл. 7).

Таблица 7 – Содержание свободного пролина в органах семян сосны обыкновенной, мкмоль/г сырой биомассы

Наименование органа	ZnSO <sub>4</sub> , мкМ			
	1,26 (контроль)	50	100	150
Корневая система	0,36 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,47 ± 0,02	0,55 ± 0,02
Гипокотиль	0,87 ± 0,04	0,91 ± 0,06	0,99 ± 0,03	1,17 ± 0,07
Семядоли	0,50 ± 0,04	0,64 ± 0,04	0,69 ± 0,03	0,59 ± 0,03
Хвоя	0,31 ± 0,01	0,28 ± 0,07	0,33 ± 0,01	0,44 ± 0,01

Увеличение содержания пролина в корневой системе и хвое семян (табл. 7) на фоне ингибирования активности СОД (табл. 4) свидетельствует о реципрокном характере взаимодействий между ними в процессе инактивации АФК.

Полученные данные свидетельствуют о существовании различий в органоспецифическом ответе семян сосны на продолжительное действие ионов цинка. Это проявляется в динамике активностей антиоксидантных ферментов и содержания низкомолекулярных антиоксидантов в органах семян сосны.

### **Влияние повышенных концентраций ионов цинка на поглощение и транслокацию элементов минерального питания сеянцами сосны обыкновенной**

При повышенном содержании ионов цинка в среде доступность многих элементов минерального питания существенно изменяется (Brune, 1994; Sagardoy, 2009). В связи этим нами были проанализированы особенности поглощения и транслокации ряда макро- (табл. 8) и микроэлементов (табл. 9).

Таблица 8 – Содержание макроэлементов в органах сеянцев сосны обыкновенной

Наименование органа	ZnSO <sub>4</sub> , мкМ			
	1,26 (контроль)	25	50	150
Содержание калия, мкмоль/г сухой биомассы				
Корневая система	577,3 ± 39,6	584,1 ± 26,6	695,7 ± 106,2	438,8 ± 28,1
Гипокотиль	204,0 ± 8,3	187,3 ± 2,7	142,1 ± 2,5	185,0 ± 22,7
Семядоли	305,7 ± 7,6	262,7 ± 9,3	303,9 ± 4,6	261,7 ± 14,3
Хвоя	494,7 ± 15,1	389,7 ± 19,5	346,2 ± 16,5	372,0 ± 10,2
Содержание кальция, мкмоль/г сухой биомассы				
Корневая система	6,7 ± 0,4	7,6 ± 0,7	7,1 ± 0,7	5,3 ± 0,7
Гипокотиль	15,0 ± 0,7	13,8 ± 0,4	15,0 ± 0,6	14,0 ± 1,2
Семядоли	41,5 ± 2,0	35,7 ± 1,2	35,6 ± 2,5	23,7 ± 1,6
Хвоя	28,5 ± 1,0	27,8 ± 1,1	32,4 ± 0,8	26,0 ± 0,8
Содержание магния, мкмоль/г сухой биомассы				
Корневая система	29,5 ± 2,1	25,7 ± 0,6	24,2 ± 0,6	18,3 ± 0,4
Гипокотиль	46,1 ± 0,5	42,6 ± 2,4	38,4 ± 5,7	36,8 ± 1,6
Семядоли	123,2 ± 7,3	124,9 ± 3,8	96,4 ± 12,3	102,3 ± 5,4
Хвоя	58,9 ± 2,4	47,7 ± 1,8	51,3 ± 3,1	39,6 ± 1,0

Снижение содержания кальция, калия и магния при действии 150 мкМ Zn<sup>2+</sup>

(табл. 8) свидетельствует, по-видимому, о нарушении поглощения данных элементов, связанного с нарушением функционирования плазматических мембран клеток (Baker, 1989). Основной причиной снижения содержания магния в корневой системе сеянцев (табл. 8) является, очевидно, замедление его поглощения, а повышение содержания в семядолях и менее выраженное снижение в хвое связано с перераспределением элемента и его оттоком в фотосинтезирующие органы.

Действие 25 мкМ и 50 мкМ ZnSO<sub>4</sub> не оказывало влияния на поглощение и транспорт ионов кальция (табл. 8). Данный факт обусловлен устойчивостью механизмов поглощения и транспорта ионов кальция и подтверждён результатами полевых экспериментов, свидетельствующих о стабильном содержании кальция в хвое сосны, произрастающих на карбонатных почвах (Ingestad, 1979).

Таблица 9 – Содержание микроэлементов в органах сеянцев сосны обыкновенной

Наименование органа	ZnSO <sub>4</sub> , мкМ			
	1,26 (контроль)	25	50	150
Содержание железа, мкмоль/г сухой биомассы				
Корневая система	16,7 ± 1,3	18,4 ± 1,7	13,9 ± 1,2	10,3 ± 0,4
Гипокотиль	1,4 ± 0,2	1,1 ± 0,1	0,84 ± 0,1	0,9 ± 0,1
Семядоли	2,4 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,4 ± 0,1	1,9 ± 0,1
Хвоя	1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Содержание марганца, мкмоль/г сухой биомассы				
Корневая система	4,5 ± 0,9	1,8 ± 0,2	1,7 ± 0,2	0,8 ± 0,1
Гипокотиль	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,01
Семядоли	7,2 ± 0,3	6,6 ± 0,3	6,7 ± 0,6	5,5 ± 0,1
Хвоя	3,5 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,9 ± 0,2	2,0 ± 0,1

Нарушение поглощения железа и марганца сеянцами сосны в условиях избыточных концентраций ионов цинка (табл. 9) связано с проявлением антагонизма между этими ионами (Титов, 2007; Kabata-Pendias, 2007). Снижение поглощения железа и марганца корневой системой сеянцев (табл. 9) является результатом уменьшения всасывающей поверхности корня, а также подавления Fe-редуктазной активности корней под действием повышенных концентраций ионов цинка (Alcantara, 1994).

Снижение содержания К, Са, Mg, Fe и Mn в корневой системе сеянцев сосны (табл. 8-9), по-видимому, связано с увеличением оттока данных элементов в надземные органы (табл. 8-9). Подтверждением данного предположения может являться изменение осмотического потенциала клеточного сока хвои и корневой системы сеянцев сосны под действием повышенных концентраций ионов цинка (табл. 10).

Таблица 10 – Изменение осмотического потенциала клеточного сока корней и хвои сеянцев сосны обыкновенной в условиях избытка ионов цинка, мОсм/л.

Наименование органа	ZnSO <sub>4</sub> , мкМ			
	1,26 (контроль)	25	50	150
Корневая система	0,222 ± 0,004	0,209 ± 0,002	0,198 ± 0,003	0,195 ± 0,002
Хвоя	0,450 ± 0,004	0,471 ± 0,002	0,489 ± 0,001	0,486 ± 0,004

Анализ полученных данных свидетельствует о выраженной зависимости между концентрацией ионов цинка и осмотическим потенциалом клеточного сока, направ-

ленной в сторону снижения данного параметра в корнях на 6% ( $t = 2,91$ ;  $p = 0,01$ ) при 25 мкМ, 11% ( $t = 4,80$ ;  $p = 0,001$ ) при 50 мкМ и 12% ( $t = 6,04$ ;  $p = 0,001$ ) при 150 мкМ  $Zn^{2+}$  и его увеличения в хвое семянцев на 5% ( $t = 4,70$ ;  $p = 0,001$ ) при 25 мкМ, 9% ( $t = 9,46$ ;  $p = 0,001$ ) при 50 мкМ и 8% ( $t = 6,36$ ;  $p = 0,001$ ) при 150 мкМ  $Zn^{2+}$  (табл. 10).

Таким образом, действие повышенных концентраций ионов цинка приводило к нарушениям поглощения корневой системой элементов минерального питания и их транспорта в надземные органы семянцев сосны обыкновенной.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Характер аккумуляции и транслокации ионов цинка в надземных органах семянцев сосны обыкновенной позволяет отнести её к типичным индикаторам данного металла, содержание которого в органах увеличивается пропорционально росту его концентрации в среде.

Анализ развития семянцев сосны обыкновенной в условиях избытка ионов цинка свидетельствует о выраженной связи с содержанием данного металла в среде. Продолжительное воздействие ионов цинка приводило к снижению темпов накопления биомассы в связи с замедлением процессов метаболизма и нарушением минерального питания.

Корневая система семянцев сосны обыкновенной является наиболее чувствительным органом к воздействию  $Zn^{2+}$ , по-видимому, в связи с подавлением роста клеток делением и растяжением. В связи с сокращением площади поглощающей поверхности корневой системы снижается поступление макро- и микроэлементов и их транспорт в надземные органы.

Несмотря на аккумуляцию ионов цинка в ассимилирующих органах семянцев, существенного проявления токсических эффектов не отмечалось. Действие повышенных концентраций ионов цинка не вызывало развития окислительного стресса, оцениваемого по содержанию малонового диальдегида и перекиси водорода, что свидетельствует об адаптации семянцев к повышенным концентрациям ионов металла. При этом выявлен органоспецифичный характер изменения активности основных компо-

нентов ферментативной антиоксидантной системы и содержания низкомолекулярных антиоксидантов. Снижение активности основных ферментов антиоксидантной системы (СОД, каталаза) и содержания низкомолекулярных антиоксидантов в условиях хронического действия повышенных концентраций ионов цинка косвенно характеризует замедление интегральных процессов метаболизма сеянцев. Выраженное снижение активности антиоксидантных ферментов в органах сеянцев, компенсировалось увеличением содержания пролина, являющимся скавенджером активных форм кислорода.

На ранних этапах онтогенеза наибольший вклад в общую активность СОД в органах сеянцев сосны обыкновенной вносят Cu/Zn изоформы различной клеточной локализации, для которых характерно дифференциальное изменение активности в условиях хронического действия ионов цинка.

## ВЫВОДЫ

1. Несмотря на отсутствие влияния ионов цинка (до 300 мкМ) на посевные качества семян сосны обыкновенной, сеянцы отличаются низкой устойчивостью к продолжительному действию повышенных концентраций ионов цинка (100, 150 мкМ), что проявляется в ингибировании их роста и развития.
2. Особенности накопления и транслокации ионов цинка в надземных органах сеянцев сосны обыкновенной позволяют отнести её к типичным индикаторам данного металла, содержание которого увеличивается пропорционально его концентрации в среде: семядоли ( $r = 0,99$ ;  $t_r = 8,71$ ), хвоя ( $r = 0,99$ ;  $t_r = 9,21$ ).
3. Отсутствие признаков окислительного стресса, оцениваемого по содержанию малонового диальдегида и  $H_2O_2$ , свидетельствует об адаптации сеянцев сосны обыкновенной к повышенным концентрациям ионов цинка (до 150 мкМ).
4. Снижение активности основных компонентов ферментативной антиоксидантной системы (супероксиддисмутаза, каталаза) в условиях хронического действия ионов цинка, косвенно характеризует замедление интегральных процессов метаболизма, приводящее к снижению темпов роста и накопления биомассы сеянцами.

5. Наибольший вклад в общую активность супероксиддисмутазы в органах сеянцев сосны обыкновенной вносят Cu/Zn-изоформы различной клеточной локализации, которые характеризуются дифференциальным изменением активности в условиях повышенных концентраций ионов цинка.

6. В присутствии повышенных концентраций ионов цинка в среде снижается поглощение элементов минерального питания (K, Ca, Mg, Fe, Mn) корневой системой, что приводит к снижению их содержания в надземных органах сеянцев сосны.

### СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Иванов Ю.В., Карташов А.В., Савочкин Ю.В. (2010) Устойчивость всходов *Pinus sylvestris* и *Picea abies* к солевому стрессу. *Вестник Московского государственного университета леса – Лесной вестник*, **3**, 119-122.

2. Савочкин Ю.В., Иванов Ю.В. (2010) Влияние цинка на антиоксидантную защитную систему всходов *Pinus sylvestris* L. *Биология – наука XXI века. Сборник тезисов: 14-я Пущинская международная школа-конференция молодых учёных (Пущино)*, с. 335.

3. Савочкин Ю.В., Иванов Ю.В. (2010) Развитие всходов *Pinus sylvestris* L. в условиях токсического действия цинка. *Биология – наука XXI века. Сборник тезисов: 14-я Пущинская международная школа-конференция молодых учёных (Пущино)*, с. 334-335.

4. Савочкин Ю.В., Иванов Ю.В. (2010) Проявление токсического действия цинка на сеянцах *Pinus sylvestris* L. в условиях различных световых периодов. *Леса Евразии – Подмосковные вечера: Материалы X Международной конференции молодых учёных, посвящённой 90-летию со дня основания Московского государственного университета леса и 170-летию со дня рождения профессора М.К. Турского (Мытищи)*, с. 222-225.

5. Савочкин Ю.В., Иванов Ю.В. (2010) Разработка экспресс методов оценки состояния посадочного материала хвойных пород в неблагоприятных экологических условиях. *Фундаментальная наука для биотехнологии и медицины. Сборник ма-*

териалов: Школа-конференция, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН (Москва), с. 74-76.

6. **Савочкин Ю.В.**, Иванов Ю.В. (2010) Особенности роста и развития семян (*Pinus sylvestris* L.) в условиях хронического действия свинца. *Растение и стресс (Plants under Environmental Stress)*. Тезисы докладов: Всероссийский симпозиум, Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (Москва), с. 306-307.

7. **Савочкин Ю.В.**, Иванов Ю.В. (2010) Особенности развития семян сосны обыкновенной при токсическом действии тяжёлых металлов в условиях водной культуры. *Наука о лесе XXI века: Материалы международной научно-практической конференции, посвящённой 80-летию Института леса НАН Беларуси (Гомель)*, с. 175-178.

8. Иванов Ю.В., **Савочкин Ю.В.**, Кузнецов Вл. В. (2011) Сосна обыкновенная как модельный объект для изучения механизмов адаптации хвойных к действию тяжёлых металлов. 1. Изменение морфометрических и физиологических параметров при развитии семян сосны в условиях хронического действия цинка. *Физиология растений*, **58**, 728-736.

9. Иванов Ю.В., **Савочкин Ю.В.**, Марченко С.И., Иванов В.П. (2011) Анализ ростовых процессов *Pinus sylvestris* L. на ранних стадиях онтогенеза в условиях хронического действия цинка. *Лесной журнал*, **2**, 12-18.

10. **Савочкин Ю.В.**, Иванов Ю.В. (2011) Стратегия адаптации семян *Pinus sylvestris* L. при действии избыточных концентраций цинка. *Биология – наука XXI века. Сборник тезисов: 15-я Пущинская международная школа-конференция молодых учёных (Пущино)*, с. 409.

11. **Савочкин Ю.В.**, Иванов Ю.В. (2011) Сеянцы сосны обыкновенной как индикатор токсического действия цинка. *Биология – наука XXI века. Сборник тезисов: 15-я Пущинская международная школа-конференция молодых учёных (Пущино)*, с. 409-410.

12. Иванов Ю.В., **Савочкин Ю.В.** (2011) Сосна обыкновенная как индикатор повышенного содержания тяжёлых металлов в окружающей среде. *Леса Евразии*



– *Брянский лес*: Материалы XI Международной конференции молодых учёных, посвящённой 80-летию Брянской государственной инженерно-технологической академии и профессору В.П. Тимофееву (Брянск), с. 252-254.

13. **Савочкин Ю.В.**, Иванов Ю.В. (2011) Устойчивость сеянцев сосны обыкновенной к хроническому действию меди. *Леса Евразии – Брянский лес*: Материалы XI Международной конференции молодых учёных, посвящённой 80-летию Брянской государственной инженерно-технологической академии и профессору В.П. Тимофееву (Брянск), с. 267-269.

14. Иванов Ю.В., **Савочкин Ю.В.**, Кузнецов Вл.В. (2012) Сосна обыкновенная как модельный объект для изучения механизмов адаптации хвойных к действию тяжёлых металлов. 2. Функционирование антиоксидантных ферментов в сеянцах сосны в условиях хронического действия цинка. *Физиология растений*, **59**, 1-10.

15. Иванов Ю.В., **Савочкин Ю.В.**, Кузнецов Вл.В. (2012) Хроническое действие высоких концентраций цинка на активность антиоксидантных ферментов в сеянцах сосны обыкновенной. *Вестник Московского государственного университета леса – Лесной вестник*, **84**, 105-108.

16. Иванов Ю.В., **Савочкин Ю.В.** (2012) Влияние длины светового дня на устойчивость сеянцев сосны обыкновенной к токсическому действию цинка. *Вестник Московского государственного университета леса – Лесной вестник*, **84**, 99-104.