

На правах рукописи



**Черемисина Александра Игоревна**

**ФИТОРЕМЕДИАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ  
МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ РОДА *AMARANTHUS* L. К  
ИЗБЫТОЧНОМУ СОДЕРЖАНИЮ НИКЕЛЯ**

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, г. Москва.

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук,  
профессор

**Шевякова Нина Ивановна**

**Официальные оппоненты:**

**Серегин Илья Владимирович**, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, лаборатория физиологии корня, ведущий научный сотрудник

**Пильщикова Наталия Владимировна**, кандидат биологических наук, доцент, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, кафедра физиологии растений, доцент

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский педагогический государственный университет, биолого-химический факультет

Защита состоится «25» декабря 2012 г. в 11:00 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 «23» ноября 2012 года.

Учёный секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Усиление антропогенной деятельности в связи с началом Научно-технической революции в середине XX века менее чем за 100 лет привело к появлению качественно новых видов загрязнителей окружающей среды, среди которых особое место занимают тяжелые металлы, в частности никель.

В связи с загрязнением наземных экосистем тяжелыми металлами значительные территории сельскохозяйственных земель были выведены из оборота, а на части территорий, оставшихся в пользовании, регистрируется снижение продуктивности и ухудшение качества производимой сельскохозяйственной продукции. Это определяет необходимость изучения особенностей воздействия тяжелых металлов, в том числе и никеля, на различные виды сельскохозяйственных растений для оценки их адаптационного потенциала и изучения механизмов устойчивости с целью разработки технологий очистки загрязненных территорий.

Как известно, основными источниками загрязнения почв никелем являются горнодобывающие и металлургические предприятия, транспорт, полигоны промышленных и бытовых отходов. Усиленная добыча никеля и угрожающие масштабы загрязнения им наземных экосистем в последние годы делает его одним из значимых загрязнителей. Это обстоятельство инициировало интерес ученых к исследованию ответа растений на действие токсичных концентраций никеля.

Перспективными для целей фиторемедиации видами растений могут быть представители рода *Amaranthus* L., которые широко используются в озеленении городов и ландшафтном дизайне. Растения этого рода (*A. cruentus*, *A. paniculatus*, *A. caudatus*) имеют широкий ареал произрастания и часто приурочены к сорным местообитаниям. Вместе с тем практически не исследованы механизмы устойчивости растений амаранта к действию высоких концентраций тяжелых металлов и не проведена оценка их фиторемедиационного потенциала. Это делает целесообразным проведение скрининга различных видов амаранта, в том числе и полученных гибридных форм, на устойчивость к ионам никеля.

**Цель и задачи исследования.** Целью работы являлась оценка уровня устойчивости и изучение механизмов адаптации растений различных видов *Amaranthus* L. к токсическому воздействию ионов никеля и поиск физиологических путей повышения их фиторемедиационного потенциала с целью применения в технологии фиторемедиации.

Задачи исследования:

1. Провести скрининг растений рода *Amaranthus* L. на устойчивость к токсическому воздействию ионов никеля для обоснования их применения в технологии фиторемедиации.
2. Исследовать роль никеля в индукции окислительного стресса у растений амаранта и изучить особенности функционирования антиоксидантных ферментов.
3. Исследовать физиологические причины развития у растений амаранта хлороза на фоне действия токсических концентраций никеля.
4. Исследовать возможное участие полиаминов в защитном ответе растений амаранта на действие высоких концентраций никеля, а также их роль в повышении фиторемедиационного потенциала растений.

**Научная новизна.** Выявлены растения гибридной формы *A. paniculatus* f. *cruentus*, обладающие высоким фиторемедиационным потенциалом, что делает их перспективными для очистки загрязненных никелем территорий. Впервые установлено, что на молодых листьях растений *A. paniculatus* f. *cruentus* в ответ на действие высоких концентраций никеля развивается хлороз, в основе которого лежит резкое падение в тканях общего содержания железа ( $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$ ). На фоне действия никеля установлено появление у растений Ni/Fe антагонизма, что явилось следствием ингибирования в условиях окислительного стресса активности  $Fe^{3+}$ -хелатредуктазы и процесса восстановления  $Fe^{3+}$  до  $Fe^{2+}$ . Впервые показано, что путресцин вовлекается в межорганный транспорт никеля, что способствует повышению фиторемедиационного потенциала растений.

**Практическая значимость.** Полученные в диссертационной работе данные об

изменении содержания полиаминов и о причинах развития Ni/Fe антагонизма в условиях действия высоких концентраций никеля имеют большое значение для понимания механизмов адаптации растений к действию тяжелых металлов. Полученные результаты позволяют рекомендовать использование амаранта *A. paniculatus f. cruentus* в целях фиторемедиации для очистки почв городских газонов от загрязнения никелем, а экзогенную обработку путресцином – для повышения фиторемедиационного потенциала растений. Результаты исследований могут быть использованы в практике растениеводства, а сделанные на их основе теоретические обобщения – для разработки курсов лекций для студентов биологических специальностей университетов.

**Апробация работы.** Результаты данной работы были представлены на 7-ой Международной конференции по фитотехнологиям (Парма, Италия, 2010); Всероссийском симпозиуме «Растение и стресс (Plant under Environmental Stress)» (Москва, 2010); семинаре молодых ученых в Институте физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН (Москва, 2011); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2011» (Москва, 2011); Международной конференции «Биология – наука XXI века» (Москва, 2011); 5-ой Европейской конференции по биоремедиации (Ханья, Греция, 2011); VII Съезде Общества физиологов растений России «Физиология растений - фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (Нижний Новгород, 2011); Всероссийском симпозиуме «Экология мегаполисов: фундаментальные основы и инновационные технологии» (Москва, 2011).

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

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследований, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Материалы диссертации изложены на 114 страницах машинописного текста и

содержат 4 таблицы и 34 рисунка. Список цитируемой литературы включает 246 наименований, в т.ч. 216 иностранных.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объекта исследований использовали растения амаранта трех гибридных форм: *Amaranthus paniculatus f. cruentus* («Вишневый джем»), *Amaranthus paniculatus* («Бронзовый век») и *Amaranthus caudatus f. viridis* («Изумруд»). Растения рода *Amaranthus* L. имеют широкий ареал произрастания, что может свидетельствовать об их высоком адаптационном потенциале. Благодаря высокой урожайности (35-60 ц/га зерна и 1000-2000 ц/га биомассы) и интенсивному росту (до 6-7 см в сутки во втором месяце вегетационного периода) растения амаранта являются удобным объектом для изучения физиологических механизмов устойчивости к токсичным концентрациям никеля.

Растения культивировали в камере фитотрона в водной культуре при 12-часовом световом периоде при интенсивности освещения  $150 \pm 30$  мкмоль фотонов/м<sup>2</sup>·с<sup>-1</sup>, температуре воздуха 23 – 25°C днем и 15 – 17°C ночью и относительной влажности воздуха 55 и 70% днем и ночью соответственно.

**Условия проведения опытов.** Растения амаранта в возрасте 6-ти недель подвергали воздействию хлорида никеля (NiCl<sub>2</sub>) в концентрациях: 0 (контроль), 50, 100 и 150 мкМ и выращивали в течение 7 суток в контрольных условиях (содержание Fe<sup>3+</sup>-ЭДТА в питательной среде составляло 2 мкМ) или при добавлении повышенной концентрации Fe<sup>3+</sup>-ЭДТА (100 мкМ), после чего растения фиксировали жидким азотом и хранили при -70°C.

В отдельных опытах для исследования функционирования защитных механизмов, а также для оценки фиторемедиационного потенциала использовали растения амаранта, произраставшие в течение 7 суток в присутствии NiCl<sub>2</sub> (0, 25, 50, 100 и 150 мкМ) в питательной среде.

Для изучения защитного действия полиаминов 6-недельные растения *Amaranthus paniculatus f. cruentus*, произраставшие в присутствии 100 мкМ NiCl<sub>2</sub>,

ежедневно (в течение 5-ти суток) опрыскивали водными растворами путресцина и спермидина в смеси с ингибиторами их катаболизма (аминогуанидин, гуазатин).

**Определение биомассы органов растений.** Оценку темпов накопления биомассы проводили гравиметрическим методом на аналитических весах («Mettler Toledo» AB54-S, Германия) с точностью до 0,1 мг после промывки корневой системы растений дистиллированной водой и подсушивания на фильтровальной бумаге.

**Содержание металлов (Fe, Ni)** в тканях растений определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре Лабист-400 («Лабист», Россия). Навеску воздушно-сухого растительного материала (30-50 мг) минерализовали в растворах концентрированных  $\text{HNO}_3$  и  $\text{HClO}_4$  (2:1) в течение 24 ч при комнатной температуре, а затем инкубировали в термостате TDB-A-400 («BioSan», Латвия) последовательно при 150°C – в течение 1,5 ч и 180°C – в течение 2 ч.

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

**Определение содержания фотосинтетических пигментов** проводили по методу, предложенному Lichtenthaler (Lichtenthaler, 1987).

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

**Активность гваяколовых пероксидаз (ГПО)** определяли спектрофотометрически по скорости окисления гваякола (Шевякова и др., 2002).

**Активность аскорбатпероксидазы (АПО)** определяли спектрофотометрически по скорости разрушения АПО аскорбиновой кислоты, согласно методу Nakano и Asada (1981).

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

**Содержание белка в ферментативных препаратах** определяли спектрофотометрически с использованием красителя Кумасси R-250 (Esen, 1978).

**Определение активности Fe<sup>3+</sup>-хелатредуктазы** проводили по методу (Yi and Guerinot, 1998), основанному на образовании высокоспецифичного комплекса Fe<sup>2+</sup> с хелатором феррозином.

**Определение активности полиаминоксидазы (ПАО)** проводили по Cona et al. (2003). Активность ПАО рассчитывали по количеству образовавшейся перекиси водорода при окислительной деградации спермидина.

**Содержание свободных полиаминов** определяли в виде их дансил-производных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (Goren, 1982; Zacchini et al., 2005).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Сравнительный анализ накопления биомассы и содержания ионов никеля у растений амаранта при действии хлорида никеля**

Основными критериями выбора растений для фиторемедиации являются: накопление биомассы, вынос достаточного количества тяжелых металлов растениями и их способность полностью проходить все стадии онтогенеза. В связи с этим одной из задач настоящего исследования был анализ накопления надземной биомассы и биомассы корней растениями амаранта в присутствии различных концентраций NiCl<sub>2</sub> в питательной среде.

Увеличение концентрации ионов никеля в питательном растворе приводило к снижению прироста надземной биомассы и биомассы корней у всех исследуемых растений амаранта (рис. 1).

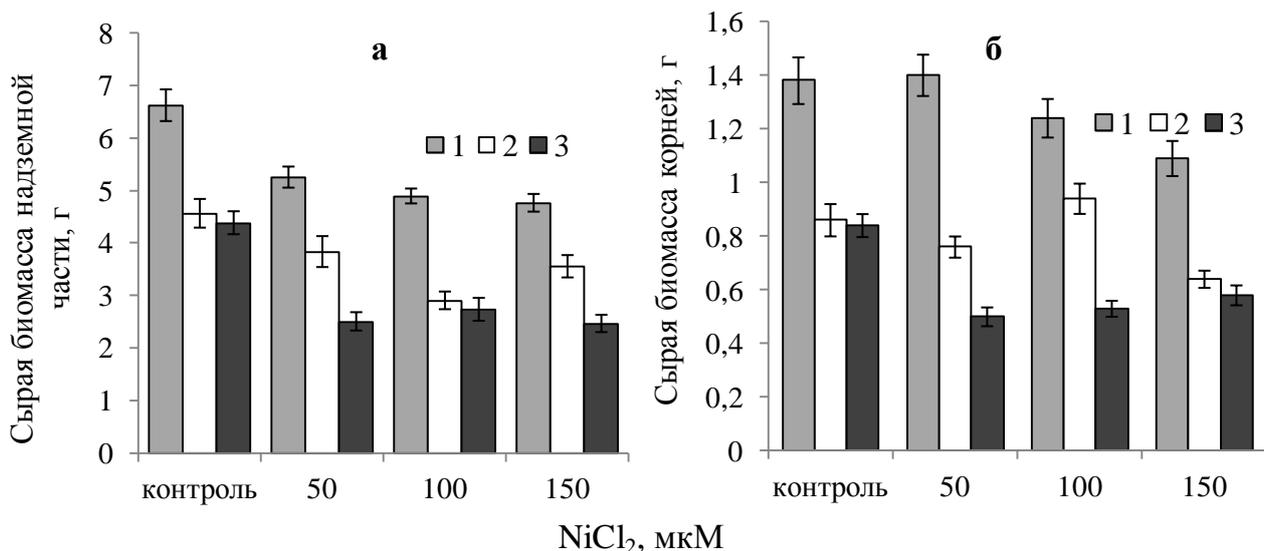


Рисунок 1 – Накопление сырой биомассы надземной части (а) и биомассы корней (б) растениями амаранта: 1 – *A. paniculatus* (Бронзовый век), 2 – *A. caudatus f. viridis* (Изумруд), 3 – *A. paniculatus f. cruentus* (Вишневый джем)

Анализ содержания ионов никеля в растениях показал, что наибольшее накопление никеля наблюдалось у амаранта *A. paniculatus f. cruentus* при всех испытанных концентрациях  $\text{NiCl}_2$  в питательной среде (рис. 2), исключением было содержание ионов никеля в побегах при 100  $\mu\text{M}$   $\text{NiCl}_2$ .

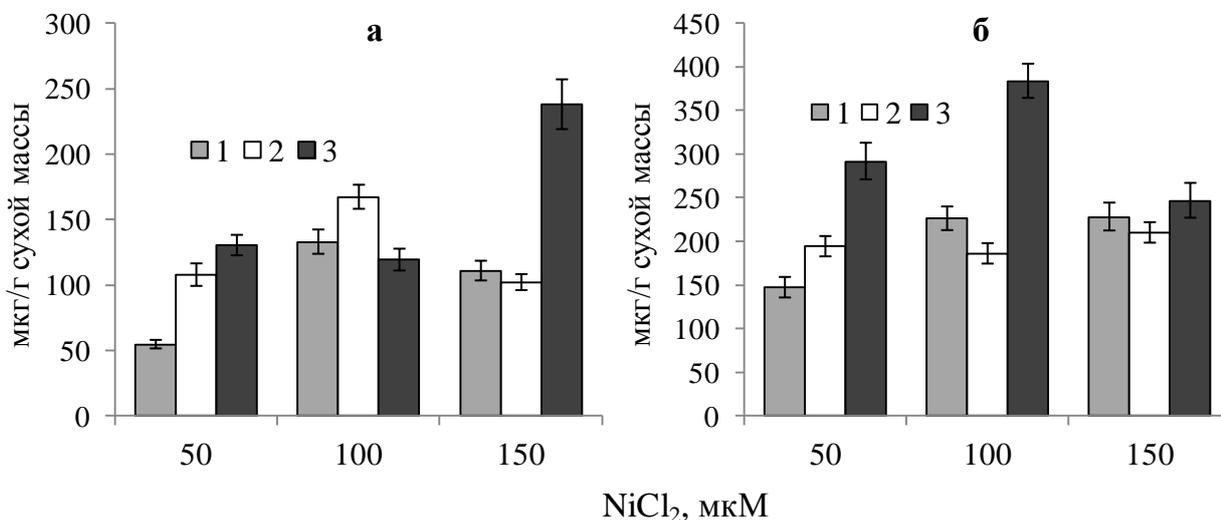


Рисунок 2 – Накопление ионов никеля надземной частью (а) и корнями (б) растений амаранта: 1 – *A. paniculatus*, 2 – *A. caudatus f. viridis*, 3 – *A. paniculatus f. cruentus*

Максимальное содержание ионов никеля в надземной массе амаранта *A. paniculatus f. cruentus* было обнаружено при 150  $\mu\text{M}$   $\text{NiCl}_2$  в питательной среде, что было практически в 2 раза больше содержания ионов этого металла в побегах других исследуемых растений амаранта (*A. paniculatus*, *A. caudatus f. viridis*) и составляло

237,8 мкг/г сухой массы, в корнях – 383,6 мкг/г сухой массы при 100 мкМ NiCl<sub>2</sub> (рис. 2).

Таким образом, несмотря на относительно низкое накопление биомассы по сравнению с другими гибридными формами, *A. paniculatus f. cruentus* обладал наибольшей Ni-аккумулирующей способностью, что делает его более привлекательным для целей фиторемедиации. В связи с полученными результатами все дальнейшие исследования были проведены на гибриде – *A. paniculatus f. cruentus*.

### Исследование антиоксидантного статуса растений *A. paniculatus f. cruentus* при различных концентрациях никеля в среде

Анализ развития окислительного стресса показал, что токсическое действие повышенных концентраций ионов никеля практически не приводило к увеличению содержания МДА в листьях и корнях растений амаранта (рис. 3), что свидетельствовало о незначительном развитии окислительного стресса.

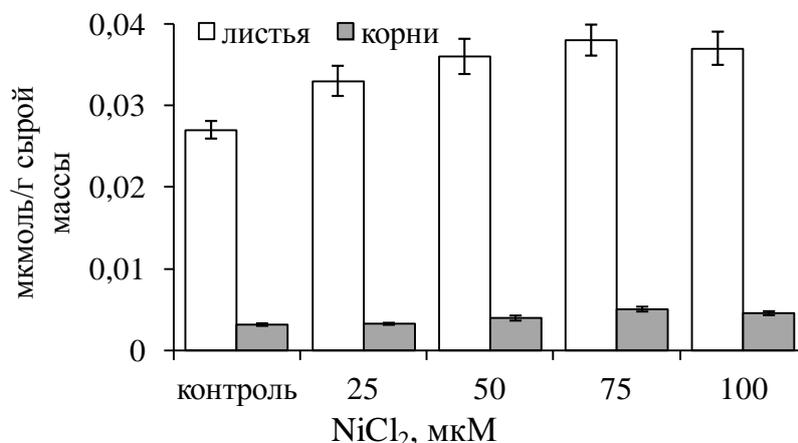


Рисунок 3 – Содержание малонового диальдегида в листьях и корнях растений *A. paniculatus f. cruentus* при различных концентрациях никеля

Для изучения реакции растений *A. paniculatus f. cruentus* на стресс, вызванный никелем, были исследованы активности ключевых ферментов детоксикации активных форм кислорода (супероксиддисмутаза, гваяколовая пероксидаза, аскорбатпероксидаза, каталаза).

Из полученных данных видно (рис. 4), что активность общей СОД в листьях при 50 мкМ NiCl<sub>2</sub> увеличивалась в 2,5 раза по сравнению с контролем (К), при 150 мкМ – в 3 раза. Более существенное повышение активности этого фермента было

найденно в корнях. Так, уже при 50 мкМ NiCl<sub>2</sub> активность СОД возрастала почти в 7 раз, а при 150 мкМ – в 10,5 раз (рис. 4а).

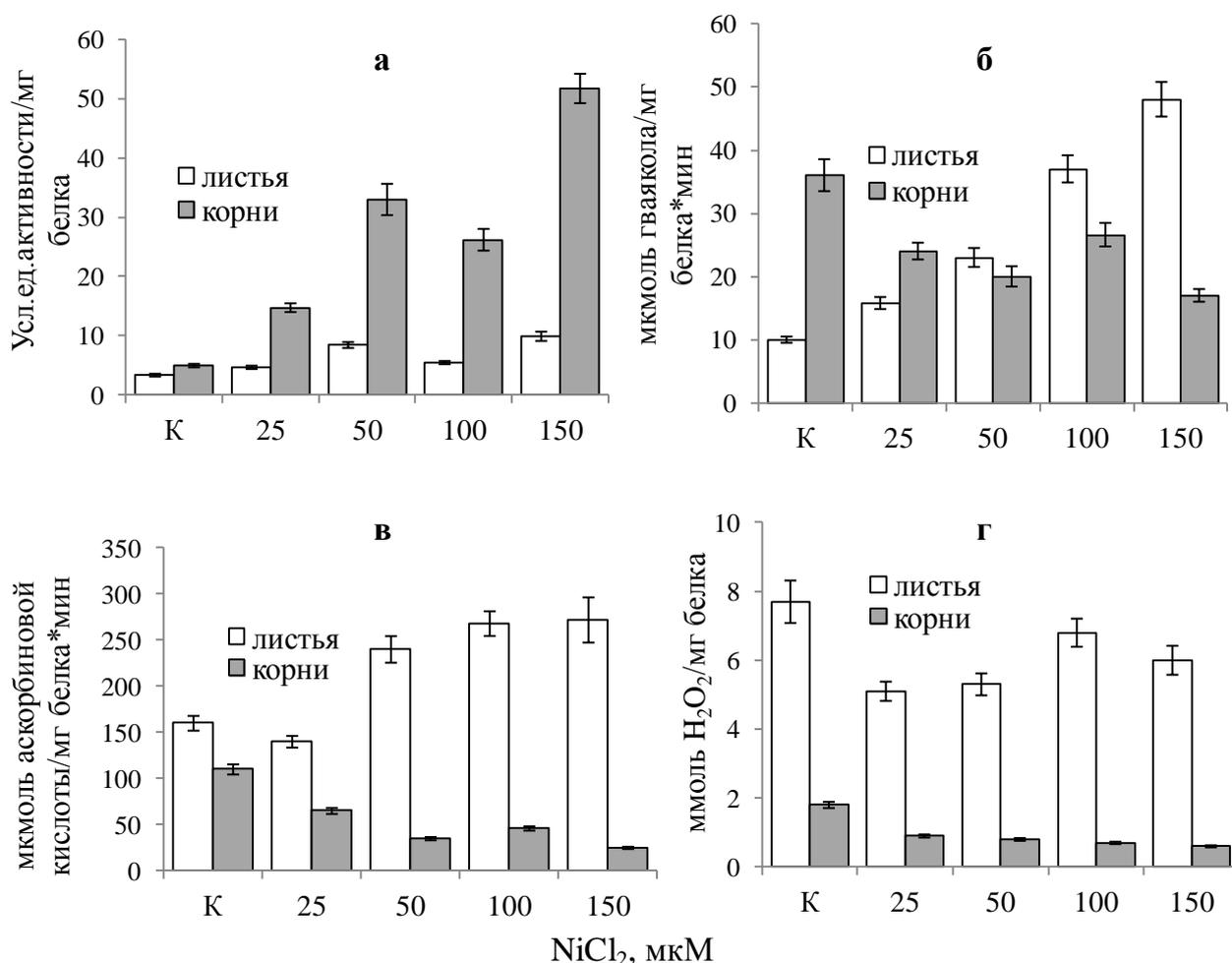


Рисунок 4 – Изменение активности супероксиддисмутазы (а), гваяколовой пероксидазы (б), аскорбатпероксидазы (в) и каталазы (г) в растениях *A. paniculatus f. cruentus*

Активности гваяколовой пероксидазы и аскорбатпероксидазы увеличивались в листьях, тогда как в корнях происходило их ингибирование (рис. 4б,в). Отметим, что повышение активности аскорбатпероксидазы и гваяколовой пероксидазы в листьях положительно коррелировало с увеличением содержания МДА (рис. 3). Воздействие ионов никеля приводило к ингибированию активности каталазы во всех органах растений (рис. 4г).

Таким образом, обнаружено органоспецифическое функционирование антиоксидантных ферментов в растениях *A. paniculatus f. cruentus*, зависящее от концентрации никеля в питательной среде.

## Характеристика фиторемедиационного потенциала растений

### *A. paniculatus f. cruentus*

Под фиторемедиационным потенциалом обычно понимают способность растений выдерживать значительные концентрации тяжелых металлов (ТМ) и накапливать достаточное количество ионов ТМ в надземной массе. В связи с этим был произведен анализ содержания ионов никеля в различных органах растений *A. paniculatus f. cruentus*.

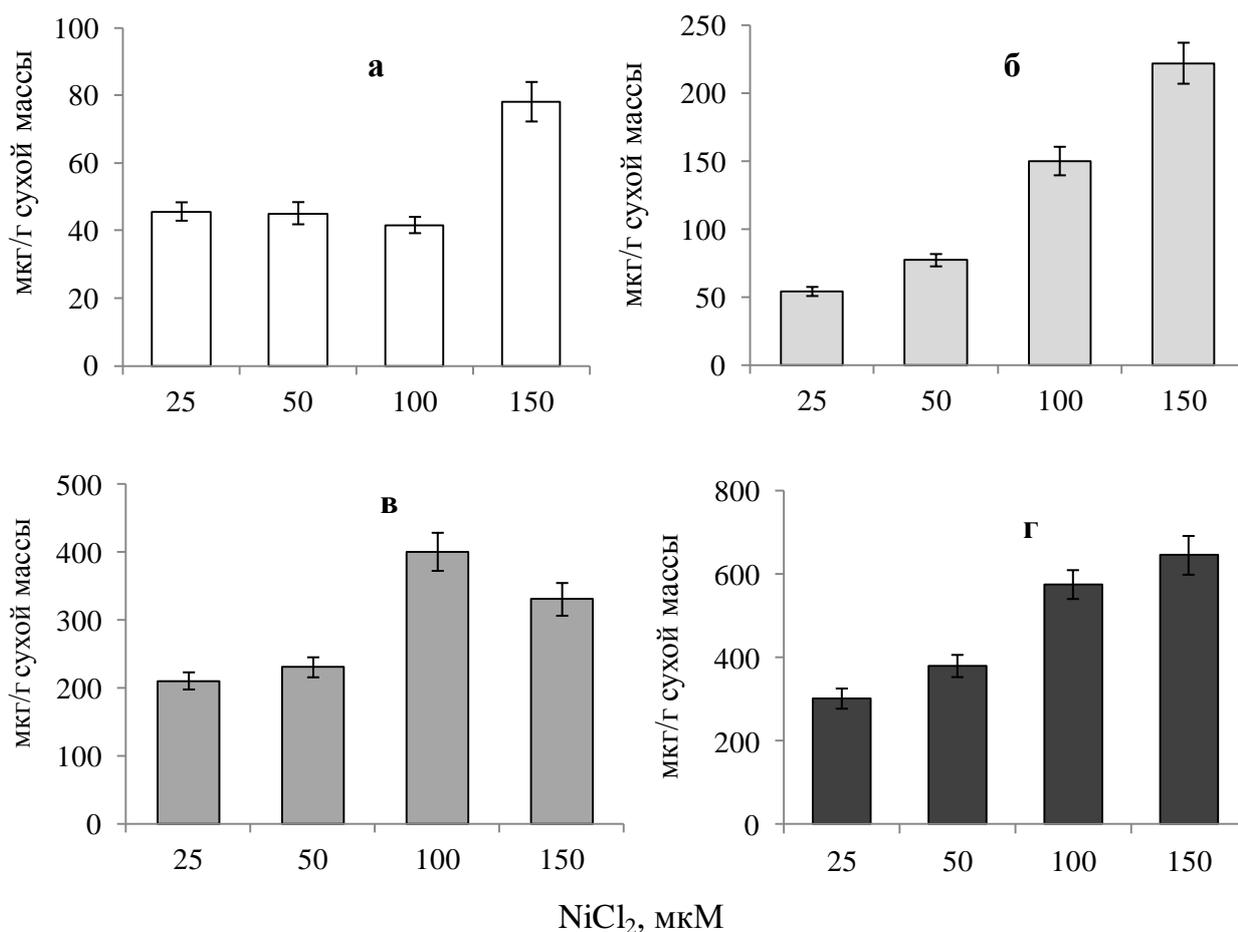


Рисунок 5 – Аккумуляция ионов никеля листьями (а), стеблями (б), корнями (в) и целым растением (г) *A. paniculatus f. cruentus* на 7 сутки воздействия различных концентраций  $\text{NiCl}_2$  в питательной среде

Максимальное содержание ионов никеля было обнаружено в листьях растений, произраставших при 150  $\mu\text{M}$   $\text{NiCl}_2$  в питательной среде, и составляло 78  $\text{mg/kg}$  сухой массы, в стеблях – 150  $\text{mg/kg}$  сухой массы при 100  $\mu\text{M}$   $\text{NiCl}_2$  и 222  $\text{mg/kg}$  сухой массы при 150  $\mu\text{M}$   $\text{NiCl}_2$ . Кроме того, из полученных данных следует, что максимальное количество ионов никеля аккумулировалось в корнях растений *A. paniculatus f.*

*cruentus*, произраставших при 100 мкМ NiCl<sub>2</sub>, и составляло 400 мкг/г сухой массы, в то время как при 150 мкМ NiCl<sub>2</sub> – 330 мкг/г сухой массы.

Для оценки устойчивости растений *A. paniculatus f. cruentus* использовали индекс устойчивости (рис. 6а), рассчитанный по изменению отношения сухой массы растений, произраставших на различных концентрациях хлорида никеля, к сухой массе контрольных растений.

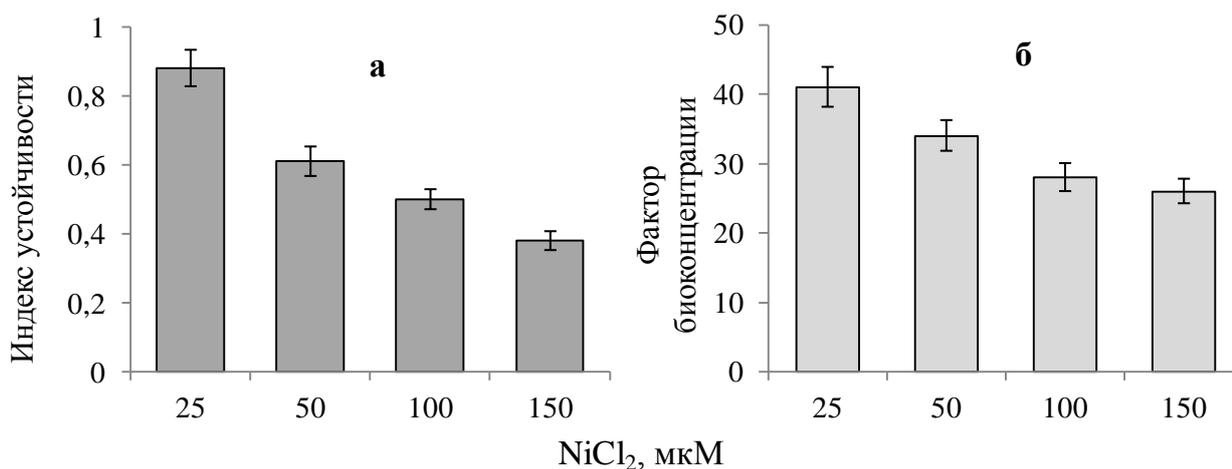


Рисунок 6 – Индекс устойчивости (а) и фактор биоконцентрации никеля растениями *A. paniculatus f. cruentus*

С целью оценки способности растений амаранта аккумулировать Ni в тканях был рассчитан фактор биоконцентрации никеля (рис. 6б), являющийся отношением содержания ионов никеля в тканях растений (мг/кг) к содержанию ионов никеля в питательном растворе (мг/кг).

С увеличением концентрации NiCl<sub>2</sub> в среде индекс устойчивости и фактор биоконцентрации никеля снижались, что отрицательно коррелировало с накоплением никеля в растениях *A. paniculatus f. cruentus* (рис. 5).

### **Влияние ионов никеля на содержание ионов железа в растениях**

#### ***A. paniculatus f. cruentus***

Признаки хлороза верхних листьев исследуемых растений *A. paniculatus f. cruentus* обнаруживались уже при действии 50 мкМ NiCl<sub>2</sub> (рис. 7), что могло свидетельствовать о развивающемся дефиците железа.



2 мкМ Fe<sup>3+</sup>-ЭДТА      100 мкМ Fe<sup>3+</sup>-ЭДТА

Рисунок 7 – Признаки хлороза верхних листьев растений *A. paniculatus f. cruentus*, выращиваемых в течение 7 суток при 50 мкМ NiCl<sub>2</sub> и различных концентрациях железа (2 (контроль) и 100 мкМ)

Нарушение гомеостаза железа при воздействии высоких концентраций ионов никеля является одной из причин подавления роста и развития растений. В связи с этим был произведен расчет относительного коэффициента транслокации никеля и железа, по изменению отношения содержания каждого из исследуемых металлов (Ni, Fe) в надземной массе к его содержанию в корневой системе (рис. 8).

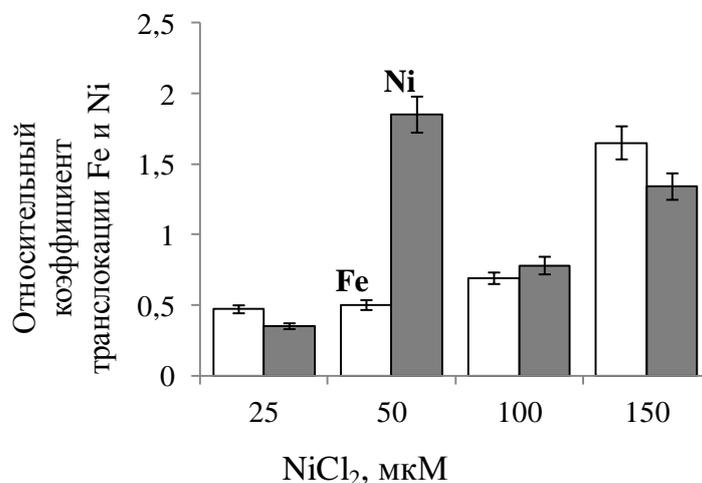


Рисунок 8 – Относительный коэффициент транслокации ионов никеля и железа из корней в надземные органы растений *A. paniculatus f. cruentus*

Полученные результаты свидетельствуют о проявлении явного антагонизма между двумя металлами в области низкой (50 мкМ) концентрации ионов никеля. В то же самое время при действии на растения более высоких концентраций NiCl<sub>2</sub> (100 и 150 мкМ) такого антагонизма между никелем и железом на уровне поступления их в надземную часть растений *A. paniculatus f. cruentus* не наблюдалось. Одной из причин

наблюдаемого Ni/Fe антагонизма в области низких концентраций NiCl<sub>2</sub> может быть способность ионов никеля занимать белки-переносчики железа и, тем самым, препятствовать поступлению Fe<sup>2+</sup> в надземные части растений.

Как известно, железо поступает в надземные части растений в активной форме (Fe<sup>2+</sup>), процесс восстановления которой катализируется Fe<sup>3+</sup>-хелатредуктазой (Шевякова и др., 2010). Для выяснения вопроса о влиянии никеля на восстановление Fe<sup>3+</sup> до Fe<sup>2+</sup> в корнях, и опосредованном воздействии на процесс поступления железа в листья, было исследовано изменение активности фермента Fe<sup>3+</sup>-хелатредуктазы в интактных корнях растений, произраставших в течение 7 суток в присутствии различных концентраций NiCl<sub>2</sub> (рис. 9).

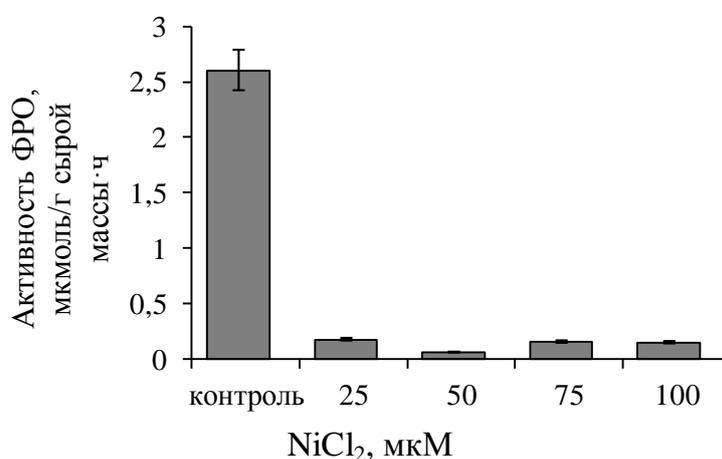


Рисунок 9 – Ингибирование никелем активности Fe<sup>3+</sup>-хелатредуктазы в интактных корнях растений *A. paniculatus f. cruentus*

Показано, что добавление хлорида никеля во всех исследуемых концентрациях (25 – 100 мкМ), резко снижало активность фермента, особенно при 50 мкМ, что могло быть причиной недостатка железа в листьях растений *A. paniculatus f. cruentus*.

### **Совместное влияние ионов никеля и железа в различных концентрациях на содержание фотосинтетических пигментов в листьях растений**

#### ***A. paniculatus f. cruentus***

Известно, что тяжелые металлы, в том числе и никель, ингибируют фотосинтез и нарушают структуру хлоропластов. Индикатором этих процессов может служить содержание фотосинтетических пигментов (хлорофиллов и каротиноидов). В связи с

этим было исследовано совместное действие никеля и железа на содержание фотосинтетических пигментов.

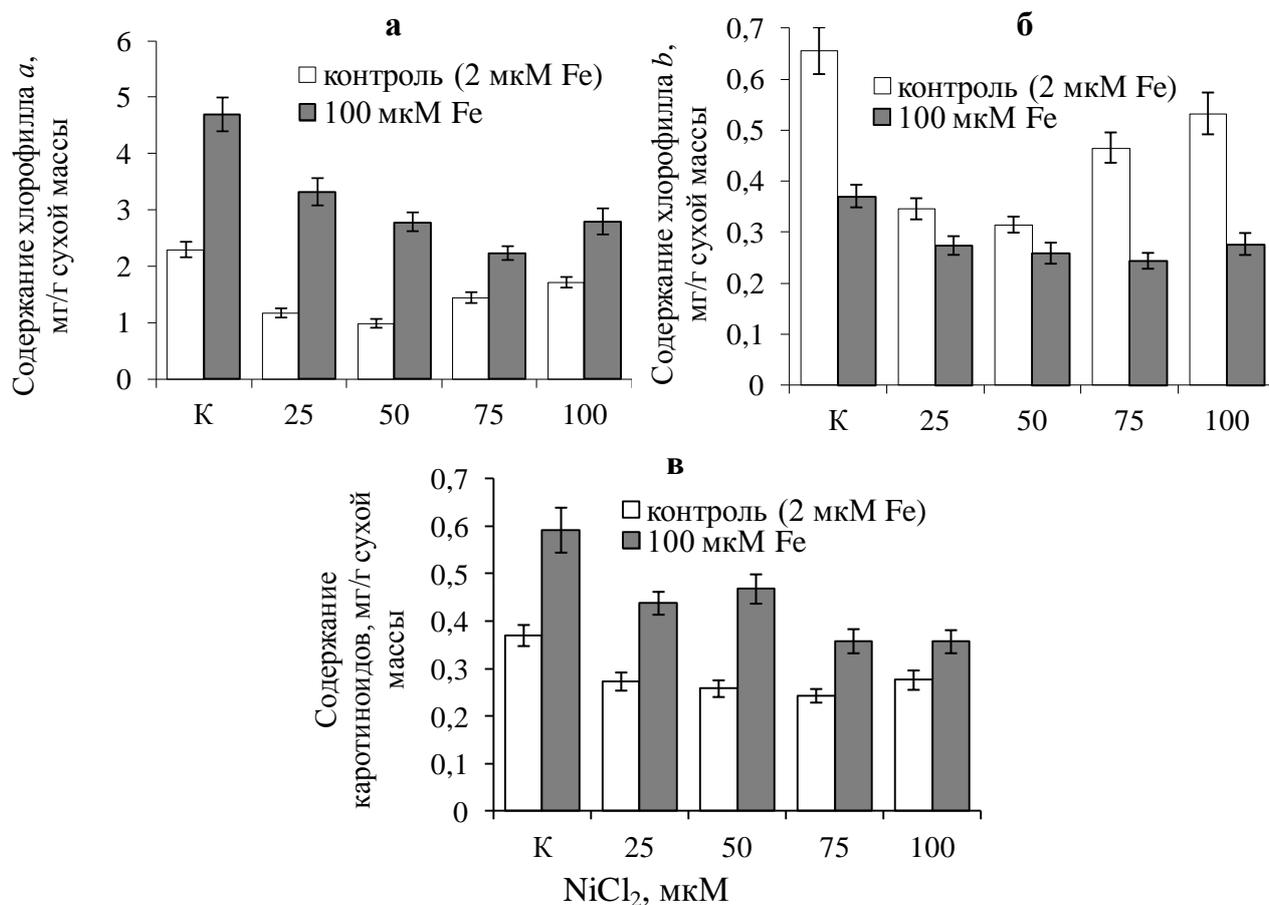


Рисунок 10 – Влияние ионов никеля на содержание хлорофилла *a* (а), хлорофилла *b* (б) и каротиноидов (в) в листьях растений *A. paniculatus f. cruentus*

Из полученных экспериментальных данных (рис. 10) следует, что листья растений *A. paniculatus f. cruentus*, выращенных на питательной среде с различным уровнем железа, резко различались по содержанию фотосинтетических пигментов. Растения амаранта, произраставшие при 100 мкМ Fe<sup>3+</sup>-ЭДТА и в отсутствии NiCl<sub>2</sub> в среде характеризовались большим содержанием хлорофилла *a* (в 2 раза) (рис. 10а) и каротиноидов – в 1,6 раз (рис. 10в), чем контрольные растения (2 мкМ Fe<sup>3+</sup>-ЭДТА). В то же время содержание хлорофилла *b* в этих растениях было ниже (в 1,8 раз), по сравнению с растениями, произраставшими при 2 мкМ железа в питательной среде (рис. 10б). Кроме того, у растений амаранта, выращенных при 50 мкМ NiCl<sub>2</sub> и 100 мкМ Fe<sup>3+</sup>-ЭДТА, содержание хлорофилла *a* было в 3 раза, а каротиноидов – в 1,8 раз больше. Содержание хлорофилла *b* в этих же условиях было в 1,2 раза меньше, чем в растениях амаранта при контрольной дозе железа (2 мкМ). На основании полученных

данных, можно выдвинуть предположение о том, что повышение дозы железа в питательном растворе способствует увеличению содержания хлорофилла *a* и, в меньшей степени, каротиноидов в листьях амаранта, что способствует сохранению зеленой окраски листьев растений *A. paniculatus f. cruentus*.

### **Анализ влияния избытка ионов железа на накопление биомассы и ионов никеля растениями *A. paniculatus f. cruentus***

Полученные нами данные также свидетельствуют о том, что повышение содержания железа в питательной среде способствовало не только увеличению содержания фотосинтетических пигментов (рис. 10), сохранению зеленой окраски (рис. 7), но и накоплению биомассы листьев и корней (рис. 11).

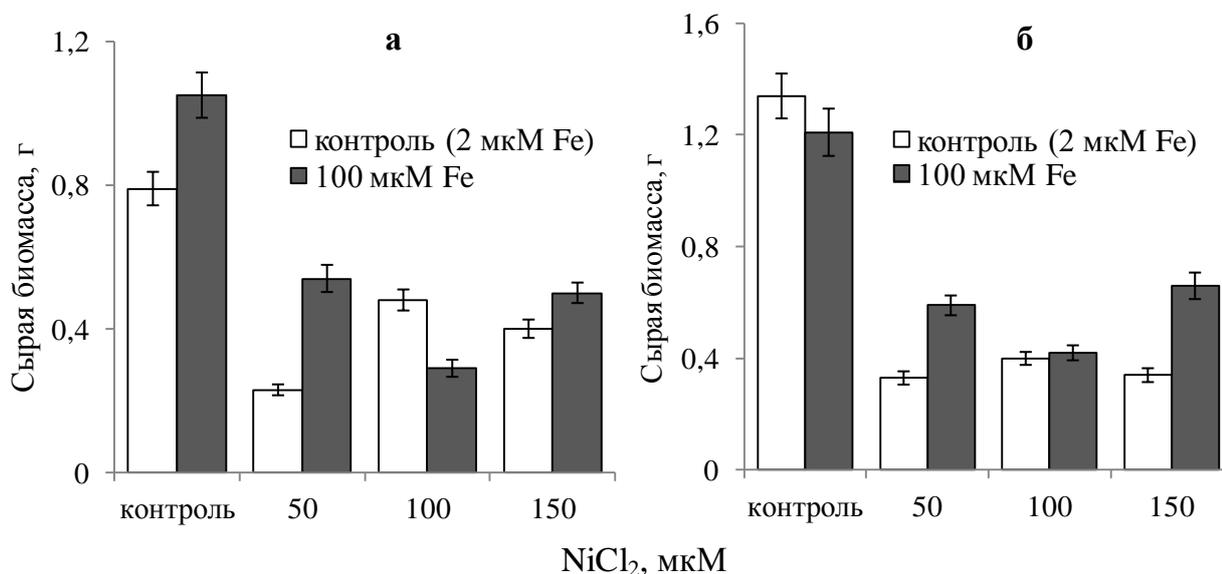


Рисунок 11 – Совместное влияние различных концентраций ионов железа и никеля в питательной среде на биомассу листьев (а) и корней (б) растений *A. paniculatus f. cruentus*

Повышение содержания ионов железа в питательной среде сопровождалось увеличением его содержания в листьях растений *A. paniculatus f. cruentus* (рис. 12а), но практически не влияло на аккумуляцию ионов никеля в них. Более того, при 150 мкМ NiCl<sub>2</sub> в питательной среде у растений амаранта, произраставших при повышенной дозе железа (100 мкМ), содержание ионов никеля в листьях было в 2 раза ниже, чем в листьях контрольных растений (2 мкМ Fe) (рис. 12б).

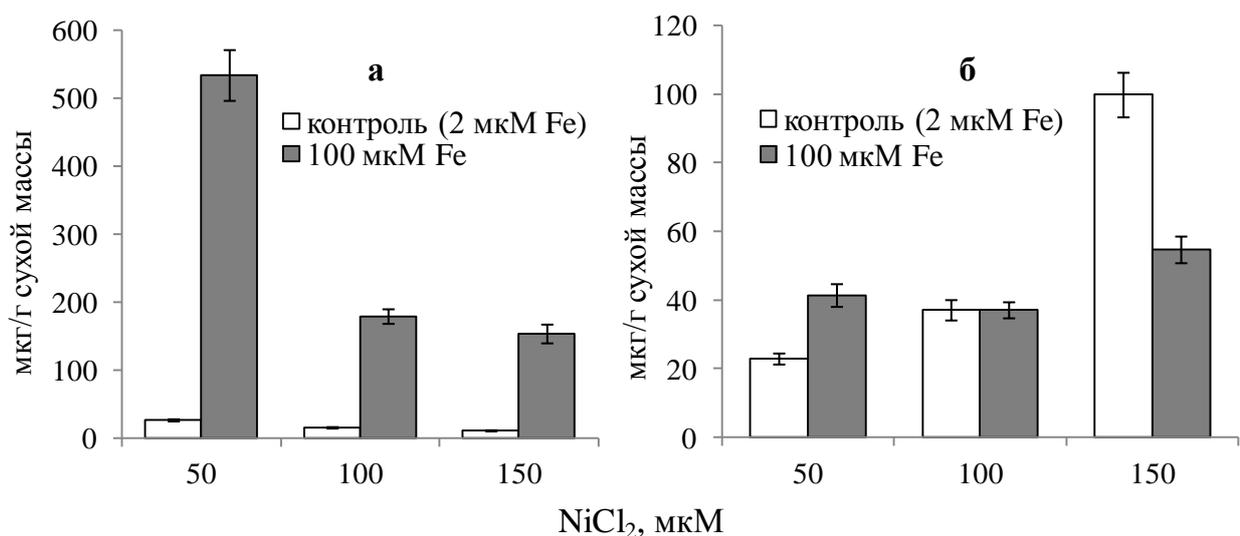


Рисунок 12 – Совместное влияние различных концентраций ионов железа и никеля в питательной среде на содержание ионов общего железа (а) и никеля (б) в листьях растений *A. paniculatus f. cruentus*

### Совместное влияние ионов никеля и железа на уровень окислительного стресса в листьях растений *A. paniculatus f. cruentus*

Поскольку одним из проявлений токсического действия никеля является окислительный стресс, было исследовано совместное действие никеля и железа на развитие этого процесса.

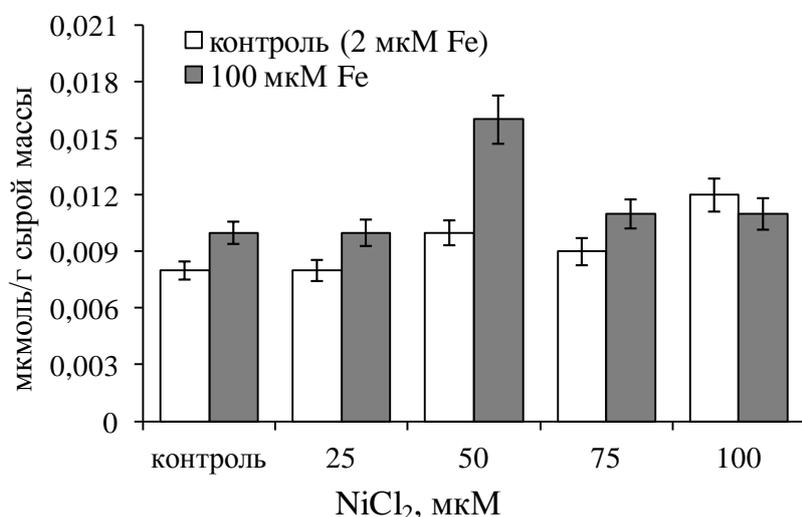


Рисунок 13 – Совместное влияние различных концентраций ионов железа и никеля в питательной среде на содержание малонового диальдегида в листьях растений *A. paniculatus f. cruentus*

Полученные нами данные по содержанию МДА (рис. 13) показали, что присутствие в питательной среде никеля на фоне высокой концентрации железа (100 мкМ) индуцировало развитие окислительного стресса в большей степени, чем у

контрольных растений (2 мкМ) (рис. 13). Предположительно, усиленное поступление в листья каталитически активной формы  $Fe^{2+}$ , могло индуцировать окислительную реакцию Фентона с образованием гидроксил-радикала.

Таким образом, оптимальная концентрация железа, необходимая растениям для нормального роста и развития, находится в весьма узких пределах. По этой причине для повышения фиторемедиационного потенциала растений для никеля и улучшения их жизнеспособности, с одной стороны, требуется поддержание в клетках гомеостаза железа, а с другой – накопление совместимых метаболитов, способных снижать токсичность никеля.

### **Изучение роли полиаминов в адаптации растений *A. paniculatus f. cruentus* к повышенному содержанию ионов никеля**

Одним из компонентов антиоксидантной системы растений являются полиамины (ПА), участие которых в формировании защитного ответа, было показано при различных типах неблагоприятных воздействий (Kuznetsov, Shevyakova, 2007). В последнее время рассматривается вопрос об их вовлеченности в адаптацию растений к воздействию тяжелых металлов. С целью анализа защитной роли полиаминов в условиях стресса, индуцированного ионами никеля, определялось содержание путресцина, спермидина, спермина и продукта их деградации – 1,3-диаминопропана в листьях и корнях опытных растений на 7 сутки эксперимента.

В листьях контрольных растений содержание основных ПА было в 2 раза ниже, чем в листьях растений, подверженных стрессу (рис. 14а), тогда как в корнях, наоборот, оно повышалось в 4 раза (рис. 14б). Подобная закономерность изменения содержания полиаминов в органах растений при стрессорном воздействии (100 мкМ  $NiCl_2$ ) свидетельствует об их транспорте из корневой системы в надземные органы.

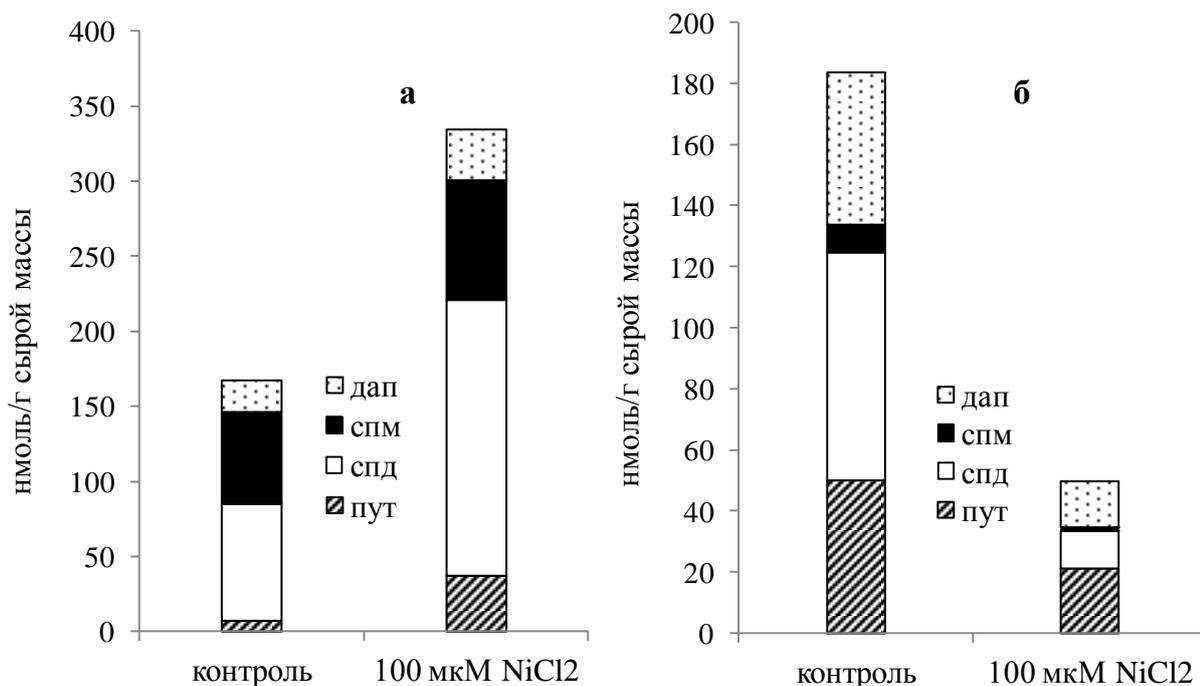


Рисунок 14 – Содержание свободных полиаминов в листьях (а) и корнях (б) растений *A. paniculatus f. cruentus* при действии NiCl<sub>2</sub>

Судя по относительно высокому содержанию в листьях и корнях растений амаранта продукта окислительной деградации ПА – 1,3-диаминопропана, внутриклеточное содержание полиаминов контролировалось их деградацией, катализируемой полиаминоксидазой (ПАО).

В последнее время предполагают, что ПАО играет важную роль в активации ряда защитных реакций в растениях при действии абиотических и биотических стрессоров (Copa et al., 2006). Это связано с образованием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в реакции, катализируемой ПАО. Пероксид водорода является сигнальной молекулой и индуцирует экспрессию многих генов, включенных в адаптационный процесс у растений (Креславский и др., 2012). В связи с вышесказанным нами была определена активность ПАО в листьях и корнях амаранта *A. paniculatus f. cruentus* (рис. 15).

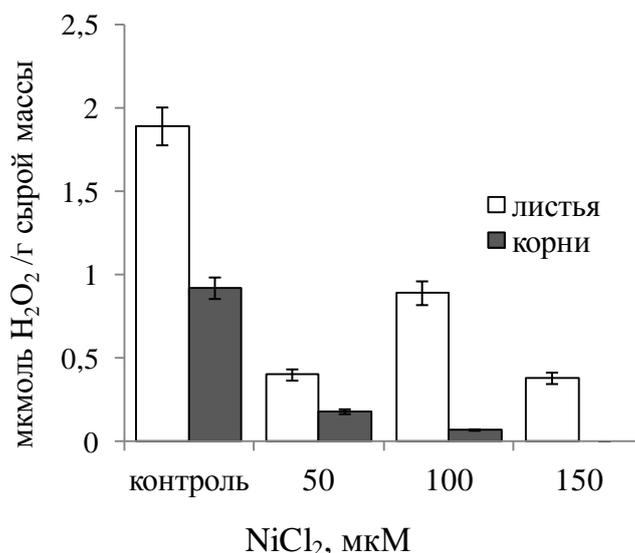


Рисунок 15 – Активность полиаминоксидазы в листьях и корнях растений *A. paniculatus f. cruentus* в присутствии различных концентраций NiCl<sub>2</sub>

Отметим, что в листьях контрольных растений активность ПАО была в 2 раза выше, чем в корнях. Полученные данные по исследованию активности ПАО в листьях и корнях растений в присутствии ионов никеля свидетельствуют об ингибировании данного фермента (рис. 15). Это позволяет предположить, что регуляция внутриклеточного уровня ПА имеет большое значение не только в нормальных условиях, но и в условиях действия повышенных концентраций ионов никеля. На основании этого мы полагаем, что даже низкая активность ПАО при действии никеля на растения, может быть важным компонентом защитной системы растений.

### **Возможная роль полиаминов в улучшении фиторемедиационных свойств растений *A. paniculatus f. cruentus***

Результаты опытов с ПА позволяют высказать предположение о том, что на интенсивное стрессорное воздействие (100 мкМ NiCl<sub>2</sub>), растения отвечают индукцией синтеза низкомолекулярных органических соединений, обладающих хелатирующим или протекторным действием. Одним из вариантов повышения внутриклеточного содержания ПА является обработка растений экзогенными ПА совместно с ингибиторами их катаболизма – полиаминоксидазой и диаминоксидазой.

Таблица 1 – Влияние экзогенных полиаминов на содержание в листьях ионов никеля и железа у растений *A. paniculatus f. cruentus*, произраставших в присутствии 100 мкМ NiCl<sub>2</sub>

Вариант обработки полиаминами	Ni, мкг/г сухой массы	Fe, мкг/г сухой массы
100 мкМ NiCl <sub>2</sub>	191,5±13,4	100,0±6,7
1 мМ путресцин + 1 мМ аминоксантидин	377,0±30,1	63,7±3,8
1 мМ спермидин + 1 мМ гуазатин	217,1±13,7	169,8±12,6

Как следует из данных табл. 1, экзогенная обработка путресцином совместно с аминоксантидином листьев растений *A. paniculatus f. cruentus*, произраставших в течение 5-ти дней в присутствии 100 мкМ NiCl<sub>2</sub>, повышала содержание ионов никеля в листьях и незначительно уменьшала содержание ионов железа. Опрыскивание листьев спермидином совместно с гуазатином практически не влияла на аккумуляцию ионов никеля, но способствовала увеличению содержания ионов железа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных было установлено, что все исследуемые растения рода *Amaranthus* L. характеризовались различной способностью накапливать никель в надземной биомассе. Наибольшей Ni-аккумулирующей способностью характеризовался гибрид *A. paniculatus f. cruentus*, накапливающий до 237,8 мкг Ni/г сухой массы в надземных органах. Столь высокое содержание ионов никеля в надземных органах, а также способность заканчивать онтогенетический цикл в условиях загрязнения среды никелем может служить основанием для отнесения гибрида *A. paniculatus f. cruentus* к видам, перспективным для использования в качестве фиторемедианта на Ni-загрязненных территориях.

Результаты исследований антиоксидантного статуса растений *A. paniculatus f. cruentus* при воздействии различных концентраций ионов никеля выявили органоспецифичный характер функционирования антиоксидантных ферментов,

характеризующийся дозовой зависимостью от  $\text{NiCl}_2$ .

Визуальные признаки хлороза верхних листьев, обнаруживаемые у гибрида *A. paniculatus f. cruentus* даже при действии  $50 \text{ мкМ NiCl}_2$ , были связаны с нарушением поступления в них железа вследствие проявления Ni/Fe антагонизма и ингибирования ионами никеля активности  $\text{Fe}^{3+}$ -хелатредуктазы. Результатом этого являлось снижение содержания фотосинтетических пигментов (хлорофилл *a*, хлорофилл *b*, каротиноиды), а также дифференциальное изменение активностей пероксидазы и каталазы, связанное с развитием дефицита железа.

Повышенная доза железа ( $100 \text{ мкМ}$ ) способствовала увеличению накопления сырой биомассы листьев и корней растений *A. paniculatus f. cruentus*, а также увеличению содержания фотосинтетических пигментов (хлорофилла *a* и каротиноидов) и, как следствие, сохранению зеленой окраски верхних листьев.

Повышение дозы железа в питательной среде в 50 раз по сравнению с контролем ( $2 \text{ мкМ}$ ), приводило к 15-кратному увеличению содержания железа в листьях, но практически не влияло на накопление ионов никеля. Более того, при  $150 \text{ мкМ NiCl}_2$  в питательной среде у растений амаранта, произраставших в присутствии  $100 \text{ мкМ Fe}^{3+}$ -ЭДТА, содержание ионов никеля снижалось вдвое по сравнению с контрольными растениями ( $2 \text{ мкМ Fe}^{3+}$ -ЭДТА).

Действие  $100 \text{ мкМ NiCl}_2$  не вызывало значимых изменений содержания полиаминов в растениях *A. paniculatus f. cruentus*, однако сопровождалось усилением их транспорта из корневой системы в надземные органы.

Проведенные исследования показали, что при изучении фиторемедиационного потенциала растений, аккумулирующих никель в надземных органах, необходимо исследовать их способность сохранять гомеостаз железа и поддерживать функционирование антиоксидантных систем, а также аккумулировать полиамины или иные низкомолекулярные органические соединения, обладающие хелатирующими или стресс-протекторными свойствами.

## ВЫВОДЫ

1. Токсическое действие ионов никеля на растения амаранта вызывало развитие окислительного стресса и сопровождалось дифференциальным изменением активностей антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза, аскорбатпероксидаза, гваяколовые пероксидазы) в подземной и надземной частях растений.

2. Действие никеля на растения амаранта приводило к развитию хлороза вследствие снижения содержания физиологически активного железа ( $\text{Fe}^{2+}$ ) в надземных частях растений из-за ингибирования активности  $\text{Fe}^{3+}$ -хелатредуктазы и нарушения процесса восстановления железа ( $\text{Fe}^{3+}$  до  $\text{Fe}^{2+}$ ).

3. Воздействие 100 мкМ  $\text{NiCl}_2$  на растения амаранта сопровождалось ингибированием активности полиаминоксидазы, более выраженным в корневой системе, и транспортом полиаминов (путресцин, спермидин) в надземные органы, без значимых изменений их содержания в целом по растению.

4. Экзогенная обработка амаранта спермидином совместно с гуазатином способствовала увеличению содержания железа в листьях, в то время как применение путресцина совместно с аминогуанидином приводило к повышению выноса Ni листьями растений, что позволяет рекомендовать применение полиаминов для повышения фиторемедиационного потенциала амаранта.

5. Среди исследованных растений рода *Amaranthus* L. наибольшей Ni-аккумулирующей способностью характеризовался гибрид *A. paniculatus* f. *cruentus* (Вишневый джем), сохранявший жизнеспособность и высокую фиторемедиационную способность на фоне действия 100 мкМ  $\text{NiCl}_2$ , что позволяет рекомендовать его для очистки загрязненных никелем почв.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Cheremisina A., Shevyakova N., Kuznetsov V.** (2010) Investigation of Phytoremediation Potential of Plant Species (*Brassica napus* L. and *Amaranthus cruentus*

- L.) for Ni-contaminated Soils. 7<sup>th</sup> *International Conference on Phytotechnologies* (Parma, Italy), p. 154.
2. Shevyakova N., **Cheremisina A.**, Kuznetsov VI. (2010) Nickel Phytoremediation Potential for *Amaranthus cruentus* L. Plants. Ni/Fe Antagonism and Mechanisms of Ni Detoxication. *Растение и стресс (Plant under Environmental Stress)*. Тезисы докладов: Всероссийский симпозиум, Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (Москва), с. 17-18.
  3. **Черемисина А.И.** (2011) Скрининг растений рода *Amaranthus*: антагонизм никеля и железа и хелатирующая роль полиаминов. «Ломоносов-2011». Тезисы докладов: XVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных (Москва), с. 226.
  4. **Черемисина А.И.** (2011) Фиторемедиационный потенциал гибридов рода *Amaranthus*: антагонизм никеля и железа. «Биология – наука XXI века». Сборник тезисов: 15-я Пущинская международная школа-конференция молодых ученых (Пущино), с. 417.
  5. **Cheremisina A.**, Shevyakova N., Kuznetsov VI. (2011) Plants of Genus *Amaranthus* are Promising Species for Phytoremediation of Ni-contaminated Soils in Russia. «5<sup>th</sup> European Bioremediation Conference» (Chania, Greece), p. 10.
  6. Шевякова Н.И., **Черемисина А.И.**, Кузнецов Вл.В. (2011) Возможные причины возникновения Ni/Fe антагонизма у растений амаранта. VII Съезд Общества физиологов растений России «Физиология растений - фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» и Международная научная школа Инновации в биологии для развития биоиндустрии сельскохозяйственной продукции (Нижний Новгород), с. 754-755.
  7. **Черемисина А.И.**, Шевякова Н.И., Кузнецов Вл.В. (2011) Роль полиаминов и пролина в адаптации растений рода *Amaranthus* к никелю. Сборник тезисов: Всероссийский симпозиум «Экология мегаполисов: фундаментальные основы и инновационные технологии» (Москва), с. 151.

8. Шевякова Н.И., **Черемисина А.И.**, Кузнецов Вл.В. (2011) Фиторемедиационный потенциал гибридов рода *Amaranthus*: антагонизм никеля и железа и хелатирующая роль полиаминов. *Физиология растений*, **58**, 547-557.
9. **Черемисина А.И.**, Шевякова Н.И., Кузнецов Вл.В. (2012) Динамика аккумуляции никеля и возможные причины дефицита железа в листьях гибридной формы амаранта. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агронимия и животноводство*, **3**, 21-30.