

На правах рукописи

Калимова

КАЛИМОВА

Ирина Борисовна

**ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ
И УСТОЙЧИВОСТЬ К НИМ ПРОРОСТКОВ ЗЛАКОВ**

03.00.16 – Экология

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург 2009

Работа выполнена в лаборатории экологии растительных сообществ
Ботанического Института РАН им. В. Л. Комарова

Научный руководитель кандидат биологических наук,
вед. научный сотрудник
Алексеева-Попова Наталия Вадимовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Шамров Иван Иванович

кандидат биологических наук
Казнина Наталья Мстиславовна

Ведущая организация Санкт-Петербургский Государственный
Университет

Защита состоится 23 декабря 2009 г в 14 ч на заседании диссертационного совета
Д 002.211.02 при Ботаническом институте РАН им. В. Л. Комарова по адресу:
197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 2, БИН РАН
тел.: (812) 234 12 37, факс (812) 234 45 12

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН
Автореферат разослан 23 ноября 2009 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Юдина Ольга Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Среди загрязняющих окружающую среду химических веществ тяжелые металлы (ТМ) по опасности действия на живые организмы занимают одно из первых мест, вследствие чего их воздействие на растения стало серьезной экологической проблемой. В связи с этим изучение динамики накопления тяжелых металлов растениями, с каждым годом приобретает все большую актуальность. Роль растений важна не только в геохимическом круговороте элементов, но и в поступлении загрязнителей в пищевые цепи (Papassiori et al, 1999, Sinha, 1999, Ермаков, 2008). Повышение уровня в среде Cu, Mn, Ni, микроэлементов, необходимых для растений представляет значительную опасность. Изучение стрессовых реакций, вызванных действием ТМ, является важным для развития представлений об ответных реакциях растений на воздействие неблагоприятных условий среды. Оно необходимо также для разработки эффективных методов оценки возрастающего промышленного загрязнения окружающей среды. Выявление механизмов устойчивости растений к ТМ на уровне растительной клетки открывает широкие перспективы для развития селекции, биотехнологий и фиторемедиации загрязнённых территорий.

Цель и задачи исследования. Цель работы – изучение структурно-функциональных особенностей проростков злаков в условиях повышенного содержания тяжелых металлов в среде и выявление механизмов их токсического действия на рост и развитие.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Сравнить устойчивость к повышенным концентрациям Mn, Cu и Ni разных сортов *Avena sativa* L. и *Hordeum vulgare* L.
2. Определить специфичность токсического действия ТМ на рост, уровень фотосинтетических пигментов, минеральный состав проростков отличающихся по металлоустойчивости сортов *Avena sativa* и *Hordeum vulgare*.
3. Выявить наиболее чувствительный процесс морфогенеза (рост, пролиферация и дифференциация клеток) разных тканей и зон корня проростков *Triticum aestivum* L. под действием Ni.
4. Выяснить механизм прекращения пролиферации клеток корня под влиянием Ni.

Научная новизна работы состоит в сравнительном изучении и установлении специфичности токсического действия нескольких ТМ (Mn, Cu и Ni) на организменном, тканевом и клеточном уровнях организации. Впервые в модельных опытах на одних и тех объектах получен комплекс данных о действии повышенных концентраций Cu, Ni и Mn на уровень содержания фотосинтетических пигментов, гомеостаз минерального состава, ростовые процессы и структуру клеток меристемы корней проростков злаков. Получены новые сведения о межвидовых и внутривидовых различиях устойчивости к избытку Mn, Cu и Ni в среде, свидетельствующие о высоком адаптационном потенциале высших растений. Впервые, на примере Ni, столь подробно изучена динамика процессов морфогенеза корня при действии ТМ. Установлено, что в корнях *T. aestivum* процесс инициации примордиев боковых корней устойчив к воздействию Ni. Установлены тканеспецифические нарушения структуры ядра в клетках корня. Впервые установлено, что наиболее ранним проявлением токсического действия Ni на клетки корня является ингибирование перехода клеток меристемы к синтезу ДНК, что приводит к постепенному прекращению пролиферации клеток. Выход клеток меристемы из клеточного цикла в G₁-фазе под действием стрессового фактора различной природы является адаптационным механизмом сохранения меристематических клеток способности к возобновлению пролиферации.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные разносторонние сведения о реакции растений на повышенные содержания в среде Cu, Ni, Mn представляют теоретический интерес и вносят вклад в понимание специфичности токсического действия ТМ на растения. Полученные данные по динамике роста, пролиферации, дифференциации клеток корня и инициации примордиев боковых корней под воздействием Ni вносят существенный вклад в более глубокое понимание процессов морфогенеза корня. Обширный материал по устойчивости к приоритетным загрязнителям среды Cu и Ni, полученный на разных видах и

сортах, важен для выбора объектов мониторинга экологического состояния окружающей среды. Практическое применение могут найти фактические данные о различной устойчивости определенных сортов *A. sativa* и *H. vulgare* к Mn, что особенно важно в условиях кислых почв.

Апробация работы. Материалы работы представлены на Международной конференции по анатомии и морфологии растений, С.-Петербург, 1997, VII Молодёжной конференции ботаников, С.-Петербург, 2000, Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений», Минск, 2001, Международной конференции по анатомии и морфологии растений, С.-Петербург, 2002, Международной конференции «Проблемы физиологии растений Севера», Петрозаводск, 2004, IV Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений», Минск, 2005, V Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений», Минск, 2007, XII съезде РБО «Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века», Петрозаводск, 2008, 6-th International Symposium on Ecosystem Behavior Biogeomon, Helsinki, 2009 и на научных семинарах лаборатории экологии растительных сообществ БИН РАН.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 20 работ, из них 3 статьи в рецензируемых журналах.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, 6 глав, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 156 страницах машинописного текста, включая 16 таблиц, 28 рисунков и приложения. Библиография содержит 223 источника, из них 108 на иностранных языках.

Глава 1. Литературный обзор.

В обзоре рассмотрены работы, посвящённые эколого-физиологическим аспектам влияния ТМ на растения и формированию у них механизмов устойчивости на разных уровнях организации.

Глава 2. Объекты и методы исследования

Работу проводили на модельных объектах которыми являлись проростки *Avena sativa* L. (4 сорта), *Hordeum vulgare* L. (4 сорта) и *Triticum aestivum* L. (2 сорта). **Модельные опыты.** 7 суточные проростки растущие на растворе смеси солей 5×10^{-4} М $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ и 1×10^{-3} М КСl служили контрольным вариантом, в опытных вариантах к этой смеси добавляли растворы сернокислых солей ТМ в концентрациях: Mn 2×10^{-3} М и 3×10^{-3} М, Ni 5×10^{-5} М и 1×10^{-4} М, Cu 1×10^{-5} М и 5×10^{-5} М. Прирост корня измеряли ежедневно. **Металлоустойчивость проростков** определяли методом корневого теста, на основании индекса устойчивости (I_t), который определяется как отношение прироста корня и/или побега растения в опытном варианте к приросту на контроле за один и тот же промежуток времени (Wilkins, 1978; Косицин, 1983). На 6 сутки опыта отбирали навески листьев для измерения содержания фотосинтетических пигментов и минерального состава. **Количественное содержание хлорофиллов** (a и b) определяли спектрофотометрически (Шлык, 1968; Маслова и др., 1986), каротиноиды (β -каротин, лютеин и виолоксантин) определяли методом бумажной хроматографии (Пигменты пластид... под ред. Д. И. Сапожникова, 1964). **Содержание минеральных элементов** в листьях определяли в азотнокислой вытяжке атомно-абсорбционным методом на спектрофотометре ААС-ИН. **Влияние ТМ на структуру клеток кончика корня проростков** изучали на «давленных» препаратах. Исследование процессов роста, пролиферации и дифференциации клеток корневой системы проводили на проростках *T. aestivum*. 5 сут проростки переносили на раствор Арнона, в опытных вариантах добавляли растворы сернокислых солей Ni в концентрациях 1×10^{-6} М и 1×10^{-4} М. Измеряли длину центрального корня проростков через 2 сут и перед началом опыта. Для изучения динамики процессов роста, пролиферации и дифференциации клеток корневой системы 3 сут проростки переносили на раствор Арнона, в опытный вариант добавляли раствор сернокислого Ni в концентрации 1×10^{-4} М. Измеряли длину корней перед началом опыта и через каждые 6 ч первых суток опыта и 12 ч вторых, а также через 72 ч у опытных проростков. В одном из повторов опыта в эти сроки корни помещали на 30 мин в раствор метил- ^3H -тимидина в концентрации 80 кБк/мл. Сегменты корней с меристемой в конце каждого опыта фиксировали по Навашину. Готовили постоянные препараты с серией срезов толщиной 7 мкм

для исследования характера роста клеток вдоль продольной оси корня. Определяли расстояние на котором происходит начало дифференциации клеток. Анализировали влияние Ni на деление и синтез ДНК в клетках корня и инициацию ПБК с использованием метода автордиографии (Жинкин, 1959). Опыты проводили в 3-х кратной повторности. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакетов стандартных программ Microsoft Excel 2007 и Statistica 6. В таблицах и на рисунках представлены средние значения и стандартные отклонения. Достоверность различий между парными значениями оценивали по *t* – критерию Стьюдента при $P < 0.05$. Проведен корреляционный анализ взаимосвязи содержания минеральных элементов и фотосинтетических пигментов в листьях проростков.

Глава 3. Токсическое действие марганца, меди и никеля на рост и структуру клеток апикальной зоны корня проростков *Avena sativa* L. и *Hordeum vulgare* L.

3.1. Специфичность действия повышенных концентраций ТМ на пророст корней и листьев проростков. Наиболее ярко проявились межвидовые особенности в устойчивости к воздействию повышенного содержания Mn. Проростки *H. vulgare* оказались более чувствительны к Mn, чем *A. sativa* (Табл. 1). Для всех показателей в таблицах 1 – 4 представлены средние для 4 сортов каждого вида. В то же время реакция отдельных сортов отличалась. Уже на вторые сутки опыта I_t корней резко снижался, особенно у неустойчивого сорта *Неван H. vulgare* (I_t составил 0.26 ± 0.09 и 0.21 ± 0.07 при действии 2×10^{-3} М и 3×10^{-3} М соответственно). В литературе известны данные о существенной внутривидовой вариабельности *H. vulgare* в зависимости от факторов среды (Головки и др., 2004). В то же время в первые трое суток опыта при действии Mn происходило стимулирование роста корней *A. sativa* (у сорта *Чиж* на третьи сутки опыта $I_t = 1.24 \pm 0.11$ и 1.1 ± 0.09). К 6-м суткам опыта значения I_t корней *A. sativa* снижались до 0.17–0.27, а рост корней *H. vulgare* был практически остановлен (Табл. 1). При одинаковом содержании в среде (5×10^{-5} М) Cu оказывала большее ингибирующее действие на рост корней проростков обоих видов по сравнению с Ni. При более длительной экспозиции на растворах Cu и Ni заметнее проявились межвидовые различия в устойчивости к ТМ и специфичность их действия. В целом, I_t корней при действии Cu были ниже в среднем в 1.5 раза, чем при действии Ni (Табл. 1), что еще раз подтверждает большую токсичность Cu по сравнению с Ni. Полученные данные показали, что Mn сильнее ингибировал рост корней проростков *H. vulgare* по сравнению с *A. sativa*, особенно при большей концентрации. Cu и Ni оказывали более токсический эффект на рост корней проростков при существенно более низких концентрациях, чем Mn. Экспериментально установлены различия в устойчивости разных сортов модельных видов злаков к действию повышенных концентраций Mn, Cu, Ni в среде. На примере двух сортов *A. sativa* показана разная устойчивость к Cu и Ni (Рис. 1). Угнетающее действие ТМ на рост надземной части проростков обоих видов к шестым суткам опыта не выявлено.

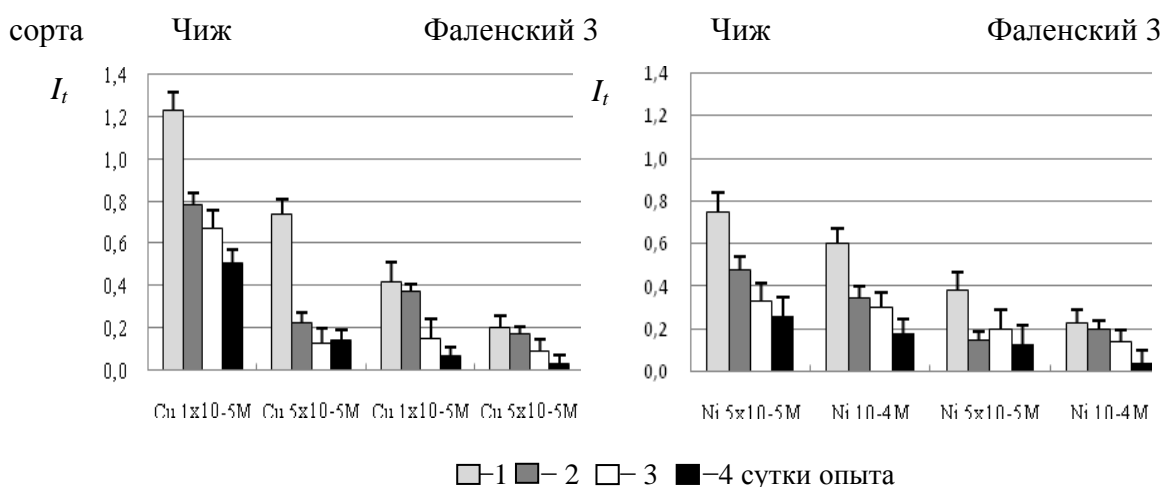


Рис. 1. Внутривидовые различия и специфичность токсического действия Cu и Ni на пророст корней проростков *A. sativa*

Таким образом, на основе метода корневого теста показано, что токсичность ТМ для обоих видов злаков убывает в ряду: Cu>Ni>Mn, причем последний металл оказывает стимулирующее действие на начальных этапах роста корней *A. sativa*. Полученные данные согласуются с результатами, полученными другими авторами (Vassilev et al., 1995; Титов, и др. 1995; Казнина, 2003).

Табл. 1. Средние значения индекса устойчивости (I_t) корней проростков *A. sativa* (1) и *H. vulgare* (2) в опытах с внесением Mn, Ni и Cu в среду

Сутки и опыта	Mn 2×10^{-3} М		Mn 3×10^{-3} М		Ni 5×10^{-5} М		Ni 1×10^{-4} М		Cu 1×10^{-5} М		Cu 5×10^{-5} М	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
2	1.18 ±0.12	0.66 ±0.15	1.17 ±0.18	0.52± 0.14	0.54 ±0.10	0.69 ±0.22	0.41 ±0.11	0.46 ±0.16	0.89 ±0.21	0.81 ±0.06	0.43 ±0.15	0.45 ±0.04
3	1.12 ±0.13	0.39 ±0.08	0.95 ±0.16	0.31 ±0.06	0.35 ±0.07	0.57 ±0.04	0.27 ±0.03	0.31 ±0.05	0.64 ±0.18	0.56 ±0.12	0.22 ±0.05	0.2± 0.07
4	0.80 ±0.13	0.29 ±0.03	0.80 ±0.20	0.15 ±0.04	0.28 ±0.03	0.33 ±0.08	0.22 ±0.03	0.25 ±0.07	0.58 ±0.19	0.61 ±0.21	0.16 ±0.04	0.29 ±0.08
5	0.69 ±0.18	0.18 ±0.03**	0.53 ±0.21	0.11 ±0.03**	0.20 ±0.06	0.16 ±0.06	0.11 ±0.05	0.12 ±0.05	0.60 ±0.24	0.35 ±0.20*	0.12 ±0.07	0.13 ±0.06
6	0.27 ±0.10	0.10 ±0.02	0.17 ±0.02	0.04 ±0.01	0.03 ±0.01	0.12 ±0.06	0.01 ±0.01	0.03 ±0.02	0.14 ±0.07	0.19 ±0.11	0.04 ±0.02	0.02 ±0.02

Примечание: * – значения, достоверно различающиеся между видами при P<0.05,

** – при P<0.001

3.2. Влияние ТМ на структуру клеток апикальной зоны корня проростков *A. sativa* и *H. vulgare*, отличающихся по металлоустойчивости.

Одной из первых реакций клеток корневой меристемы на токсическое действие повышенного содержания ТМ в среде является изменение митотической активности (Breskle, 1991; Серёгин, Иванов, 2001). Установлено, что в клетках корня проростков *H. vulgare* при действии 1×10^{-4} М Ni и 5×10^{-5} М Cu снижение доли делящихся клеток по сравнению с *A. sativa* происходило раньше. С увеличением времени экспозиции на растворах исследуемых металлов в клетках корня появлялись изменения в структуре ядра, которые приводили к ослаблению его окрашивания и диффузной структуре, а позднее наблюдали плазмолиз, которому предшествовала вакуолизация цитоплазмы. В корнях *A. sativa* эти повреждения наступали позже, и проявлялись в меньшей степени. Повреждения ядра при действии Ni было отмечено и в других работах (Liu et al., 2003). Уже на вторые сутки опыта в клетках кончиков корней проростков *H. vulgare* митотический индекс (МИ) достоверно снижался во всех вариантах опыта по сравнению контрольным. Выявлена специфичность действия различных металлов на митотическую активность клеток корня: в вариантах с внесением Cu и Ni МИ продолжал постепенно снижаться, в то время как при 3×10^{-3} М Mn в среде происходило увеличение значения МИ в клетках меристемы корней проростков *H. vulgare*, особенно у устойчивого сорта *Торос* (Рис. 2). Возможно вследствие увеличения времени прохождения фазы митоза (Powell et al., 1986).

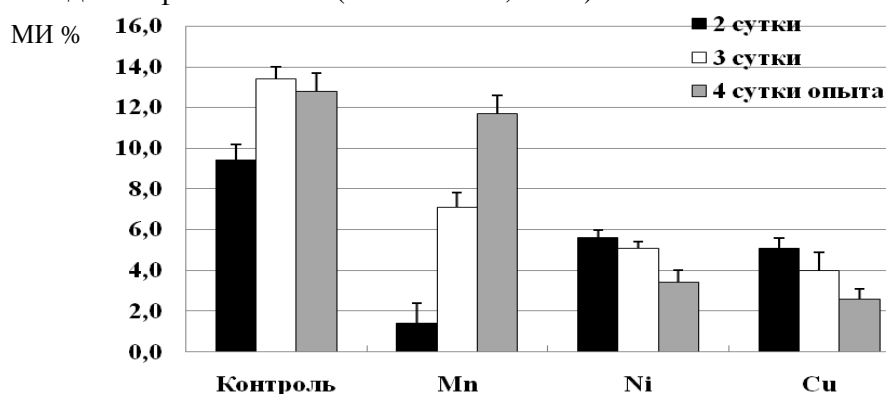


Рис. 2. Динамика МИ в корнях *H. vulgare* при действии ТМ

Глава 4. Влияние марганца, меди и никеля на физиолого-биохимические показатели проростков *A. sativa* и *H. vulgare* отличающихся по металлоустойчивости сортов.

4.1. Влияние повышенных концентраций ТМ на уровень фотосинтетических пигментов в листьях проростков *A. sativa* и *H. vulgare*. Показана разная степень токсического влияния Mn, Cu, и Ni на уровень накопления хлорофилла *a*, хлорофилла *b* и каротиноидов: β -каротина, лютеина и виолксантина в листьях проростков злаков. Наиболее токсическое действие на среднее содержание хлорофилла *a* и хлорофилла *b* в листьях 4 сортов обоих видов злаков оказывал Mn, а уровень содержания каротиноидов в листьях обоих видов наиболее чувствителен к Ni (Табл. 2). В то же время, Ni оказывал наименьшее угнетающее воздействие на содержание хлорофилла *a* и хлорофилла *b* в листьях проростков *A. sativa*. Накопление хлорофилла *a* и хлорофилла *b* в листьях *H. vulgare* и исследуемых каротиноидов в листьях обоих видов злаков было наиболее устойчиво к Cu. Выявлена сходная реакция каротиноидов на токсическое действие ТМ у проростков обоих видов. На основании полученных данных можно сказать, что фотосинтетические пигменты группы каротиноидов в листьях *H. vulgare* и *A. sativa* более устойчивы к токсическому действию Cu, чем Ni и Mn. По степени чувствительности к токсическому действию Cu пигменты можно расположить в следующем порядке: β -каротин > лютеин > виолксантин. Не отмечено значительных различий в степени угнетающего действия Ni и Mn на уровень β -каротина в листьях обоих видов. Но на уровень лютеина и виолксантина Ni оказывал более токсическое действие, чем Mn (Табл. 2). Наряду с отмеченными различиями чувствительности к ТМ фотосинтетических пигментов сравниваемых видов были выявлены также достоверные различия между сортами, отличающимися по металлоустойчивости (Рис. 3). Показана большая вариабельность содержания β -каротина у неустойчивого сорта *Фаленский 3*, особенно при действии Mn и Ni, и специфичность действия разных металлов. Большая устойчивость каротиноидов возможно связана с их защитной ролью (Таланова, 2001).

Табл. 2. Влияние Mn, Ni и Cu на содержание фотосинтетических пигментов в листьях *A. sativa* (1) и *H. vulgare* (2)

Пигменты	Контроль		Mn 2×10^{-3} М		Mn 3×10^{-3} М		Ni 5×10^{-5} М		Ni 1×10^{-4} М		Cu 1×10^{-5} М		Cu 5×10^{-5} М	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Хлорофилл <i>a</i>	1.33±0.05	0.83±0.05	0.99±0.05**	0.51±0.03**	0.92±0.03**	0.40±0.01**	1.15±0.03**	0.63±0.06**	1.07±0.03**	0.57±0.05**	1.08±0.03**	0.81±0.05	0.94±0.04**	0.69±0.05**
Хлорофилл <i>b</i>	0.49±0.02	0.31±0.02	0.39±0.02**	0.19±0.01**	0.38±0.04**	0.15±0.003**	0.44±0.02**	0.23±0.03**	0.40±0.01**	0.20±0.02**	0.41±0.01**	0.27±0.01**	0.36±0.02**	0.26±0.02**
β -каротин	0.17±0.01	0.10±0.01	0.12±0.01**	0.07±0.01**	0.11±0.01**	0.07±0.01**	0.13±0.01**	0.080±0.01**	0.11±0.01**	0.08±0.01**	0.16±0.01	0.09±0.01	0.14±0.01**	0.08±0.01**
Лютеин	0.10±0.01	0.06±0.01	0.07±0.01**	0.04±0.005**	0.05±0.01**	0.03±0.004**	0.05±0.004**	0.03±0.003**	0.03±0.004**	0.03±0.004**	0.11±0.004*	0.07±0.003*	0.10±0.003	0.06±0.002
Виолксантин	0.05±0.003	0.03±0.002	0.03±0.003**	0.02±0.002**	0.02±0.002**	0.01±0.002**	0.02±0.002**	0.02±0.003**	0.01±0.002**	0.01±0.003**	0.07±0.003**	0.04±0.003**	0.06±0.003**	0.04±0.003**

Примечание: значения достоверно отличающиеся от контроля * – при P<0.05, ** – при P<0.001

сорт *Чиж*

сорт *Фаленский*

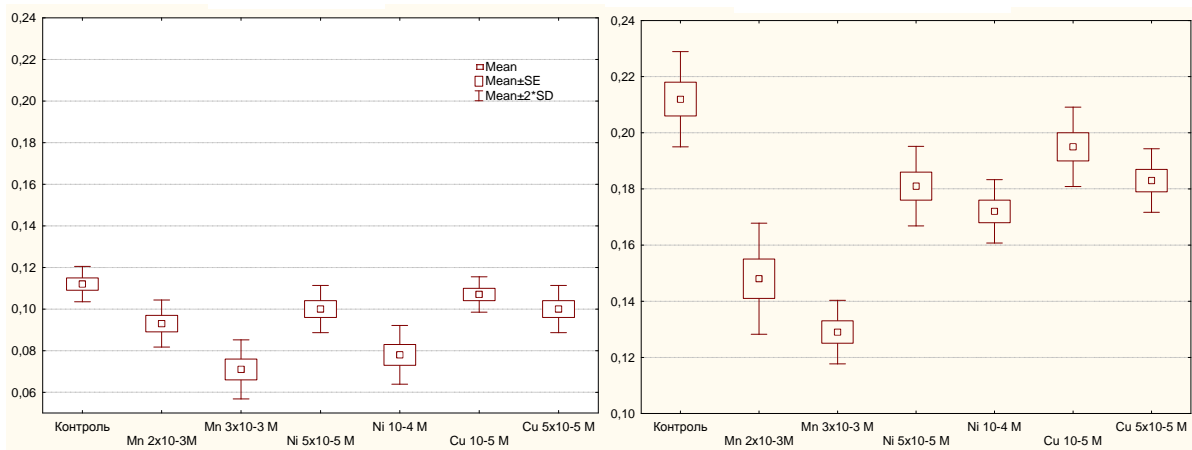


Рис. 3. Влияние ТМ на содержание β -каротина (мг/г сыр. биомассы) в листьях *H. vulgare*

Результаты корреляционного анализа выявили ряд закономерностей взаимосвязи содержания минеральных элементов в листьях и уровня фотосинтетических пигментов в контрольных и опытных вариантах. В ряде случаев найдена тесная взаимосвязь между уровнем отдельных пигментов и уровнем металлов в опытных вариантах: так, у *A. sativa* при внесении 5×10^{-5} M Cu обнаружена положительная корреляция ($r=0.89$, $P<0.001$) между содержанием хлорофилла *a* и уровнем Ni, а у *H. vulgare* положительная корреляция ($r=0.75$, $P<0.001$) с содержанием Zn. В то же время у *A. sativa* установлена отрицательная корреляция ($r= - 0.92$, $P<0.001$) между накоплением Zn и содержанием β -каротина. В вариантах с внесением 1×10^{-4} M Ni у проростков обоих видов не найдена корреляция между содержанием хлорофилла *a* и *b* и изменением минерального состава листьев. Хотя известно, что все элементы минерального питания тесно связаны между собой участием в единых метаболических процессах, роль каждого из них строго специфична.

4.2. Влияние ТМ на минеральный состав листьев проростков *A. sativa* и *H. vulgare*. Анализ минерального состава листьев проростков исследуемых видов показал видоспецифичность действия повышенного содержания Mn, Cu или Ni в среде на их накопление (табл. 3,4). Большой стабильностью отличался макроэлементный состав листьев проростков *H. vulgare* по сравнению с *A. sativa*. В листьях проростков последнего содержание К достоверно снижалось во всех вариантах опыта с внесением ТМ, а у *H. vulgare* – только при повышенном содержании Ni в среде (табл. 3,4). Уровень накопления Са в листьях обоих видов злаков достоверно снижался лишь в вариантах с внесением Mn, что, по-видимому, обусловлено антагонизмом в поглощении указанных металлов. Содержание Mg в листьях обоих видов варьировало незначительно. Характер изменения содержания К и Са при действии ТМ во многом зависит от видовой принадлежности (Титов и др., 2007). Достоверные изменения уровня физиологически необходимых микроэлементов Fe и Zn в листьях проростков обоих видов не отмечены. Усиление поступления Ni в вариантах с внесением Mn также отмечено только у *A. sativa*. При одинаковом содержании (5×10^{-5} M) Ni или Cu в среде концентрация Ni в листьях обоих видов злаков возрастала более чем в 10 раз по отношению к ее контрольному значению, а концентрация Cu – лишь в 2–3 раза. Это свидетельствует о более быстром передвижении Ni в надземную часть проростков по сравнению с Cu (Тэмп, 1991; Лянгузова, 2005). В присутствии повышенных концентраций Mn особенно ярко проявились межвидовые различия в аккумулятивной способности проростков *A. sativa* и *H. vulgare*. В вариантах с внесением $2\text{--}3 \times 10^{-3}$ M Mn его концентрация в листьях *A. sativa* была меньше примерно в 2 раза, чем у *H. vulgare*. В листьях последнего содержание этого элемента возрастало в среднем более чем в 70 раз, в то время как в листьях *A. sativa* в среднем в 10 раз. Возможно это может являться причиной большей устойчивости *A. sativa* к повышенному содержанию Mn в среде, что подтверждают наши данные по ИТ корней. Показано, что изменение минерального состава в присутствии ТМ связано с замедлением роста корней (Godbold, Knetter, 1991). Но надо отметить, что сорта *A. sativa* значительно больше различались по уровню аккумуляции Mn. Стимулировал поступление Mn в листья *H. vulgare* и Ni в низкой концентрации. При внесении в

среду 5×10^{-5} М и 1×10^{-4} М Ni отмечалась обратная закономерность: его содержание в листьях проростков *A. sativa* было примерно в 2 раза больше по сравнению с *H. vulgare*. Выявлена специфичность поглощения Ni – степень накопления этого металла в листья *A. sativa* и *H. vulgare* была одинаковой. Так, при концентрации Ni 5×10^{-5} М содержание листьев увеличивалось в среднем в 12 раз, а при концентрации Ni 1×10^{-4} М – в среднем в 20 раз у проростков обоих видов (табл. 3, 4).

Табл. 3. Содержание минеральных элементов в листьях проростков *H. vulgare* при действии Mn, Ni и Cu

Вариант опыта	% от сухой биомассы			мг/кг сухой биомассы				
	Ca	K	Mg	Fe	Mn	Zn	Ni	Cu
Контроль	0,36±0.06	4.31±0.90	0.21±0.02	92.5±17.3	31.5±2.2	37.2±3.7	6.5±0.1	9.4±2.8
Mn 2×10^{-3} М	0.29±0.07*	3.52±1.06	0.21±0.01	87.9±12.8	2340±152**	38.5±5.4	7.9±0.6**	7.2±2.6
Mn 3×10^{-3} М	0.27±0.06*	3.60±1.04	0.23±0.02	102.2±19.2	2440±173**	42.1±5.9	7.4±0.4**	9.8±3.1
Ni 5×10^{-5} М	0.35±0.08	3.42±0.71*	0.25±0.03*	71.8±9.4*	57.9±7.8**	38.7±4.1	71.2±12.1**	4.5±1.5*
Ni 1×10^{-4} М	0.30±0.06	3.12±0.71*	0.23±0.02	69.3±9.2*	25.6±2.1*	29.9±3.1*	124.9±16.4**	6.5±2.7
Cu 1×10^{-5} М	0.35±0.07	4.45±0.96	0.24±0.02*	77.1±8.9*	31.0±2.6	33.6±3.8	9.5±1.1**	9.1±3.2
Cu 5×10^{-5} М	0.31±0.09	3.48±0.74	0.25±0.03*	64.7±7.7**	29.7±3.5	45.1±3.9*	10.4±1.1**	21.1±3.7*

Примечание: * – значения, достоверно отличающиеся от контроля при $P < 0.05$,
** – при $P < 0.001$

Табл. 4. Содержание минеральных элементов в листьях проростков *A. sativa* при действии Mn, Ni и Cu

Вариант опыта	% от сухой биомассы			мг/кг сухой биомассы				
	Ca	K	Mg	Fe	Mn	Zn	Ni	Cu
Контроль	0.66±0.08	3.80±0.31	0.25±0.02	71.5±16.2	124±31	40.5±6.7	14.1±3.1	6.7±0.4
Mn 2×10^{-3} М	0.40±0.07**	2.61±0.33**	0.25±0.03	65.8±12.3	1190±327**	36.4±6.3	17.2±3.9	8.7±0.5**
Mn 3×10^{-3} М	0.34±0.05**	3.32±0.36*	0.29±0.03*	54.1±9.1*	1385±415**	40.7±6.3	18.8±6.1	9.5±0.5**
Ni 5×10^{-5} М	0.56±0.14	3.15±0.31**	0.24±0.02	59.5±10.4	147±38	29.2±6.1*	172±37**	6.3±0.5
Ni 1×10^{-4} М	0.56±0.14	2.54±0.27**	0.22±0.03*	57.3±12.2	131±34	40.3±6.8	286±48**	5.7±0.68*
Cu 1×10^{-5} М	0.61±0.16	3.71±0.43	0.24±0.02	60.5±11.9	135±37	42.8±7.0	20.1±7.6	10.7±1.0**
Cu 5×10^{-5} М	0.79±0.31	3.20±0.29*	0.25±0.02	63.0±12.4	121±36	43.3±7.4	13.8±2.8	22.4±2.4**

Примечание: * – значения, достоверно отличающиеся от контроля при $P < 0.05$,
** – при $P < 0.001$

Глава 5. Влияние никеля на развитие корневой системы проростков *Triticum aestivum* L.

5.1. Влияние никеля на морфологию и структуру корневой системы. При концентрации 1×10^{-6} М Ni через двое суток опыта не оказывал влияния на развитие корневой системы проростков по сравнению контрольными, в то время как 1×10^{-4} М Ni ингибировал рост материнского и боковых корней. При действии Ni 1×10^{-6} М происходило нарушение связей между группами близкородственных клеток в рядах клеток ризодермы меристемы материнского и боковых корней, что стимулировало деления клеток в экзодерме, которое приводило к формированию дополнительных слоёв клеток этой ткани. (Рис. 6а). Ni в концентрации 1×10^{-4} М не вызывал подобных нарушений, хотя ингибировал прирост материнского корня на 80% (Рис. 4)

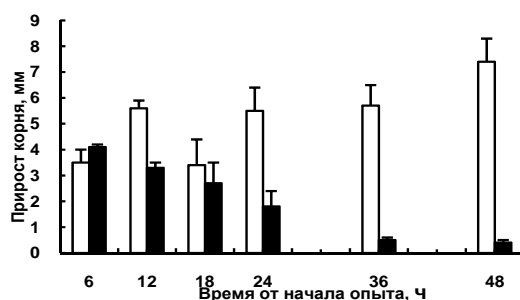


Рис. 4. Прирост корней *T.aestivum* при действии 1×10^{-4} М Ni

5.2. Влияние никеля на деление и характер роста клеток корня. Анализ распределения митозов в тканях корней при действии Ni 1×10^{-4} М показал, что клетки ризодермы, экзодермы и средних слоёв коры, кроме дистальных клеток рядов этих тканей, а также периферические клетки калиптрогена через двое суток опыта прекращали деление. В эндодерме, перицикле, стелярной паренхиме и спутниках протофлоэмы ещё встречались делящиеся клетки. Некоторые клетки покоящегося центра и дистальные клетки рядов тканей центрального цилиндра, и инициальные клетки колумеллы ещё сохраняли способность к делению, но частота встречаемости делящихся клеток снижалась. В центральном ряду метаксилемы (ЦРМ) митозы отсутствовали. После прекращения клеточных делений происходила вакуолизация клеток. Для оценки действие Ni на изменение характера роста измеряли длины клеток в ЦРМ и ризодерме вдоль продольной оси кончика корня. Длина инициальных клеток в корнях контрольных и опытных растений не различались. Из этого следует, что инициальные клетки рядов в корнях опытных растений продолжали пролиферацию. Соотношение длин клеток коры в апикальной половине участка 0-699 корней опытных и контрольных растений было таким же, как и у клеток метаксилемы на участке 0 – 199 мкм, где клетки этой ткани в контрольных корнях делились. Таким образом, относительная скорость роста клеток под влиянием Ni в меристеме не изменялась, но она могла быть существенно ниже, чем в контроле. Присутствие Ni в среде влияло на рост клеток меристемы и в радиальном направлении, что вызывало уменьшению диаметра корня меристемы с 362 ± 5 (в контроле) до 336 ± 6 мкм. В корнях контрольных и опытных растений на расстоянии 700-899 мкм от инициальных клеток начиналось растяжение клеток, из чего следует, что уменьшение длины меристемы не происходило.

5.3. Влияние никеля на дифференциацию клеток и развитие боковых корней. В присутствии 1×10^{-4} М Ni начинало формирования вторичных утолщений клеточных стенок в протоксилеме через двое суток опыта завершалось ближе к кончику корня (1680 ± 50 мкм, при 2680 ± 30 мкм у контрольных) а корневые волоски в апикальном сегменте корня длиной 4 мм отсутствовали (в контрольных корнях – на расстоянии 2750 ± 40 мкм). Дифференциация протофлоэмы завершалась на большем расстоянии от кончика корня (587 ± 11 мкм, при 494 ± 8 мкм в контроле). На расстоянии 2.2-3.8 мм от кончика корня происходил некроз клеток сначала в эндодерме и внутренних слоях коры, а затем и перицикле (Рис. 6б). В корнях проростков при воздействии 1×10^{-4} М Ni примордии боковых корней (ПБК) первого порядка находились ближе к кончику корня. Первые деления клеток в стелярной паренхиме и перицикле, в связи с началом

инициации ПБК встречались уже на расстоянии 2.2-2.3 мм от границы чехлика и тела корня. В ПБК и боковых корнях деление клеток не было ингибировано (Рис. 5а). В боковых корнях первого порядка уже начиналось формирование ПБК второго порядка. В участке корня где находились эти примордии появлялись гипертрофированные корневые волоски и клетки всех тканей имели значительно меньшую длину (Рис. 5б).

Глава 6. Динамика роста, пролиферации и дифференциации клеток корневой системы проростков *T. aestivum* при действии никеля.

6.1. Динамика роста и начала дифференциации клеток корня при действии никеля. Через 24 ч длина клеток в корнях опытных проростков под влиянием 1×10^{-4} М Ni заметно снизилась на протяжении большей части зоны растяжения, что и обусловило уменьшение длины завершивших растяжение клеток (Рис. 8в). Расстояние от кончика корня, на котором происходило начало дифференциации клеток протоксилемы, было меньшим, чем в контрольных корнях. В опытных корнях начало роста корневых волосков появлялись на участке, расположенном выше по корню (на 600 мкм), чем участок, где начиналось формирование вторичных утолщений в клетках протоксилемы (Рис. 8в). Через 36, 48 и 72 ч опыта наблюдалась тенденция к увеличению длины клеток корней опытных растений в апикальной половине зоны деления клеток. Формирование вторичных утолщений в клетках протоксилемы продвигалось к кончику корня, а расстояние от кончика корня до зоны начала роста корневых волосков увеличивалось. К 36 ч формирование вторичных утолщений клеток протоксилемы начиналось на расстоянии 1700 мкм от инициальной клетки центрального ряда метаксилемы, а через 48 ч – 1600 мкм. Первые корневые волоски к 36 ч опыта находились на расстоянии 3500 мкм, а к 48 ч на расстоянии 3600 мкм. Начало дифференциации клеток метаксилемы и метафлэмы, а также инициация примордиев боковых корней приближались к кончику корня (Рис. 8г).

6.2. Динамика синтеза ДНК и деления клеток в разных тканях и участках корня под воздействием никеля. В корнях опытных растений уже к 6 ч от начала воздействия 1×10^{-4} М Ni величина индекса меченых ^3H -тимидином клеток, синтезирующих ДНК, (ИМК) во всех изучаемых тканях корня (ЦРМ, ризодерма, ПЦ, клетки чехлика) заметно снизилась (рис.9). В последующие сроки ИМК резко снижался. Через 48 ч в чехлике и ризодерме встречались лишь единичные меченые клетки, а через 72 ч такие отсутствовали. В метаксилеме, в течение 18–48 ч ИМК изменялся незначительно, но к 72 ч опыта уже встречались единичные меченые клетки (Рис. 9в). Большая часть меченых клеток находилась в базальной половине зоны деления (100–199 мкм). В корнях опытных растений резкое уменьшение ИМК в клетках покоящегося центра происходило через 12 ч от начала опыта, с последующим его постепенным снижением. К 36 ч ИМК составлял $0.7 \pm 0.2\%$ и все синтезирующие ДНК клетки были инициалами рядов различных тканей. Через 48 и 72 ч синтезирующих ДНК клеток в покоящемся центре не обнаружено. Ингибирование синтеза ДНК в клетках корней под влиянием ТМ было отмечено и ранее (Doncheva et al, 2005). Заметное уменьшение величины МИ в тканях корней опытных растений происходило через 12 ч. В последующие сроки МИ постепенно снижался, но менее резко, чем ИМК. Даже через 72 ч в чехлике и ризодерме некоторых корней встречались делящиеся клетки (Рис. 9а, б). В корнях опытных растений величина МИ в ПЦ увеличивалась уже через 6 ч от начала опыта. К 18 ч величина МИ резко уменьшалась. Заметных нарушений структуры ядра клеток ПЦ не наблюдалось (Рис. 7в). К 36 ч и в последующие сроки фиксации корней делящиеся клетки встречались вблизи ПЦ (Рис. 7г).

6.3. Влияние никеля на инициацию и развитие примордиев боковых корней. Через 18 ч первые возобновившие синтез ДНК клетки стелярной паренхимы (Рис. 7а) в корнях опытных растений при действии 1×10^{-4} М Ni наблюдались ближе к кончику корня, чем в контрольных, а доля корней с такими клетками в стелярной паренхиме резко увеличилась. В конце сегмента корня встречались не только синтезирующие ДНК клетки перицикла, но и делящиеся клетки стелярной паренхимы и перицикла, то есть началась инициация примордия бокового корня (ИПБК). Через 24 ч первые возобновившие синтез ДНК клетки появились в эндодерме и коре. К 36 ч опыта во всех исследованных корнях наблюдались ПБК и ИПБК, которая происходила ещё

ближе к кончику корня. Через 48 ч ИПБК продолжалась, клетки перцикла синтезировали ДНК и делились (Рис. 76). Меченые ^3H -тимидином клетки видны не только в ходе ИПБК, но и в близлежащих клетках коры. Позже, в ходе формирования ПБК, меченые клетки в примордии не выявляются, поскольку тимидин не проникает через чехол, образованный из сжатых оболочек клеток коры. Через 72 ч во всех 5 исследованных корнях наблюдались ПБК и делящиеся клетки в меристеме.

6.4. Структурные изменения в клетках под воздействием никеля. Все структурные изменения встречались только в клетках, проходивших растяжение под воздействием никеля, и проявлялись после прекращения их растяжения. В завершивших растяжение клетках ризодермы уже через 24 ч увеличивалась частота встречаемости разветвленных корневых волосков. К 36 ч в некоторых корнях в начале зоны растяжения в клетках ризодермы наблюдался хроматолизис ядра: в этих клетках ядро слабо окрашивалось реактивом Шиффа. Затем хроматолизис распространялся до клеток внутренних слоев коры, а в клетках эндодермы происходил пикноз ядра. В некоторых клетках центрального ряда метаксилемы (ЦРМ) нарушалась структура ядра, появлялись гантелевидные ядра. Через 72 ч в клетках коры, расположенных около растущего примордия, встречались не только нормальные митозы, но и многополюсные. Ингибирование роста корня и нарушение клеток меристемы при действии ТМ отражено и в других работах (Robertson, 1985; Sresty, 1999; Довгалюк, 2001).

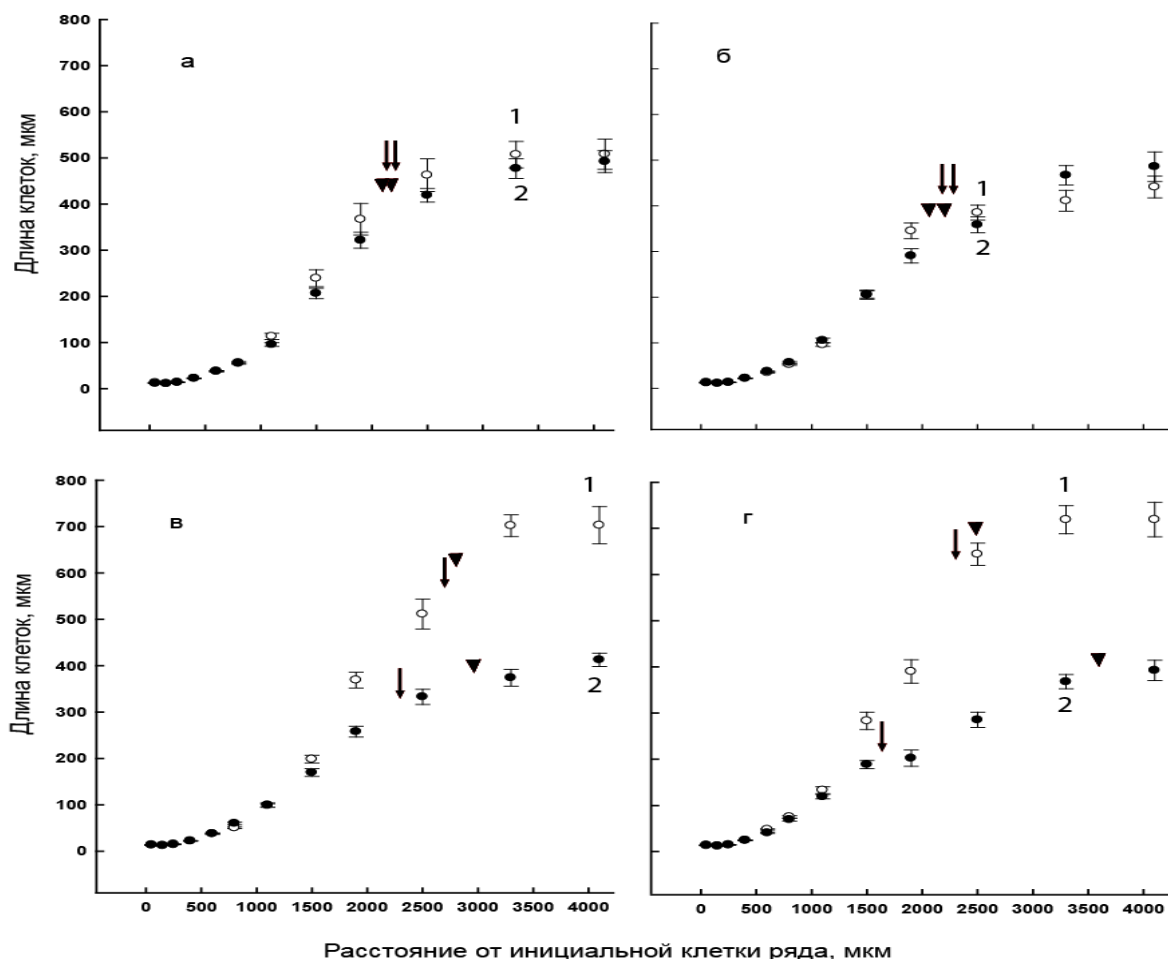


Рис 8. Динамика роста клеток ЦРМ в корнях *T. aestivum* при действии 1×10^{-4} M Ni
а, б, в, г – 12, 18, 24, 48 ч от начала опыта, начало формирования корневых волосков (▼),
начало формирования вторичных утолщений стенок протоксилемы (↓)

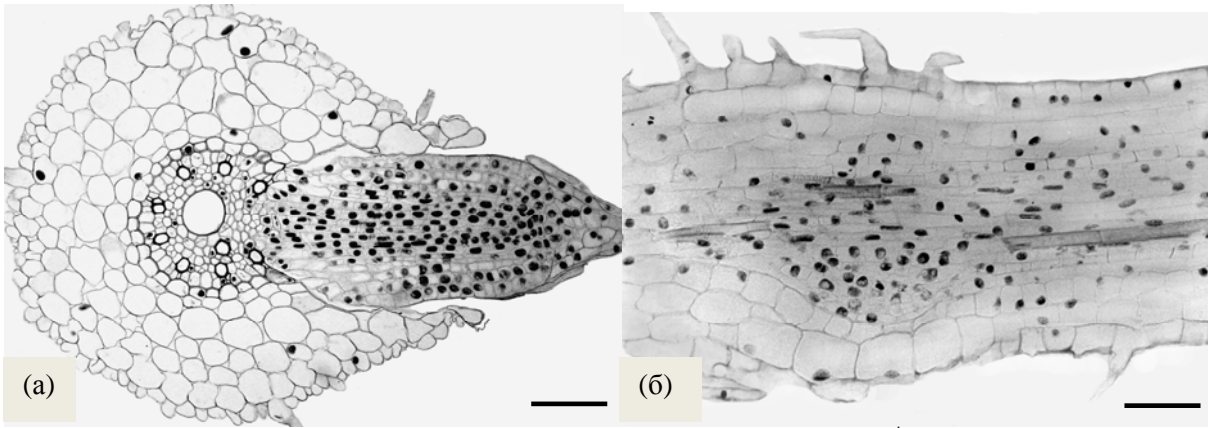


Рис. 5. Развитие боковых корней *T. aestivum* при действии 1×10^{-4} М Ni через 48 ч воздействия (а) – в боковых корнях деление клеток не ингибируется, (б) – в боковых корнях первого порядка уже начинается формирование ЛРП второго порядка. Масштабная линейка – 50 мкм

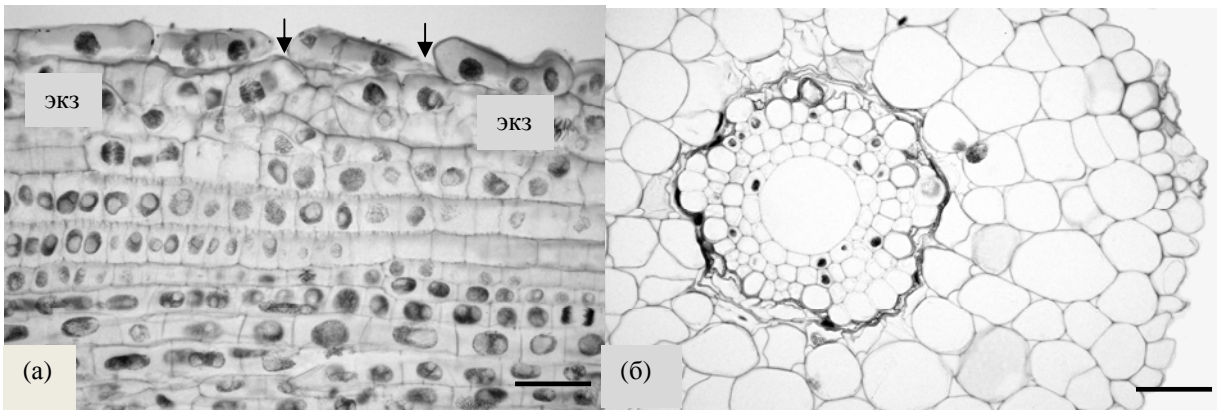


Рис. 6. Нарушения в тканях корня *T. aestivum* через 48 ч от начала опыта (а) – нарушение межклеточных связей (\downarrow) в ризодермы при действии 1×10^{-6} М Ni (ЭКЗ – экзодерма), (б) – некроз клеток эндодермы и перицикла при действии 1×10^{-4} М Ni. Масштабная линейка – 50 мкм

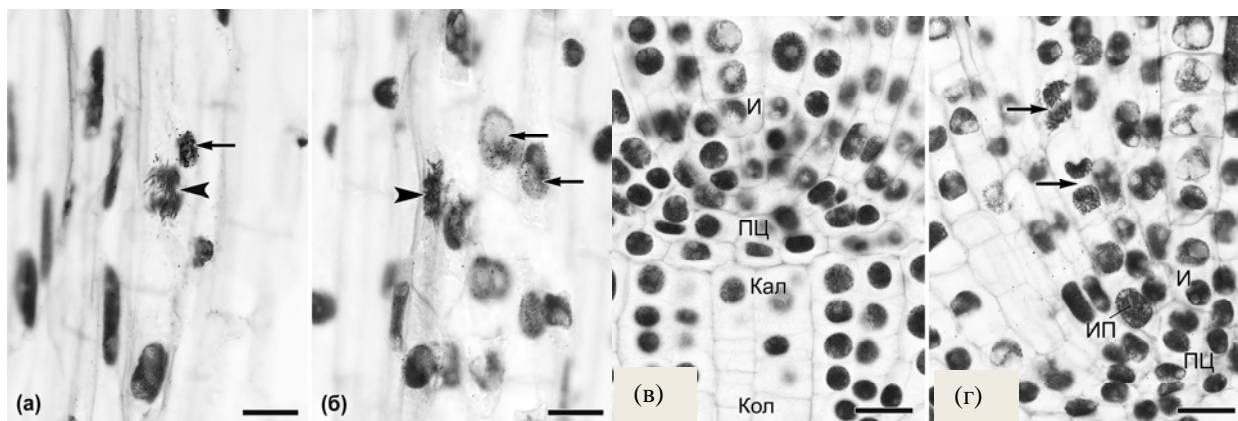


Рис. 7. Автографы срезов корня *T. aestivum* при действии 1×10^{-4} М Ni через 18 (а) и 48 (б) ч от начала опыта (\blacktriangledown) – делящиеся и (\blacktriangledown) – синтезирующие ДНК клетки перицикла структура ядра в клетках ПЦ через 36 ч (в) – структура ядра не нарушена, через 72 ч (г) – делящиеся клетки в инициалах рядов (\blacktriangledown). Масштабная линейка – 20 мкм

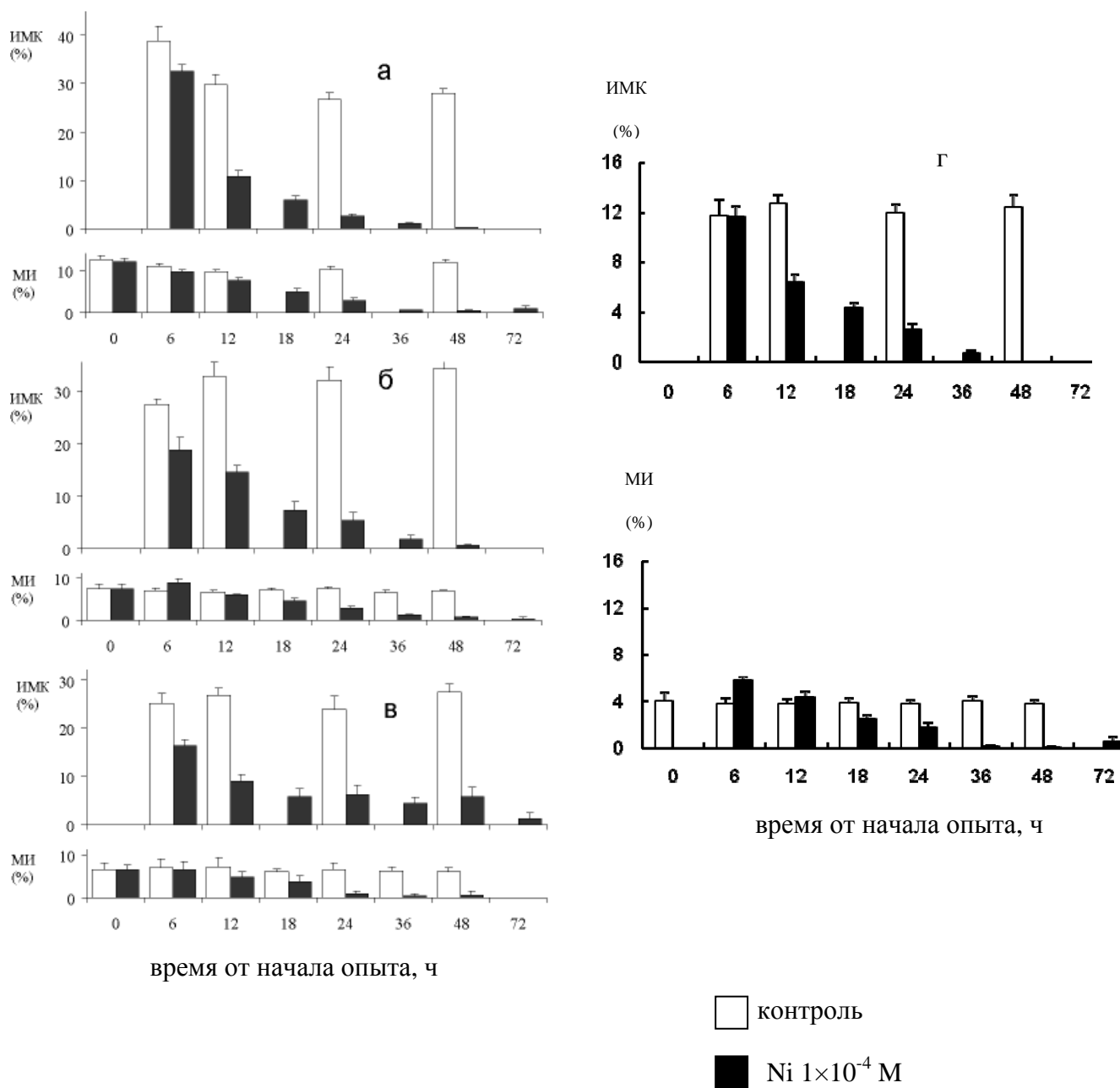


Рис 9. Динамика индексов меченых ³Н-тимидином клеток (ИМК) и митотического индекса (МИ) в разных тканях корня *T. aestivum* при действии 1×10^{-4} М Ni (а – чехлик, б – ризодерма, в – ксилема, г – ПЦ)

Таким образом, проведенные исследования показали специфичность токсического действия повышенных концентраций Cu, Ni и Mn на рост и развитие проростков злаков. В основе этого лежит разная химическая природа ТМ, неодинаковые пороговые концентрации ТМ (Ковальский, 1974; Безель, 2006). Прирост корня проростков оказался наиболее чувствительным показателем, позволившим оценить устойчивость разных видов и выявить внутривидовую изменчивость. Особенности ответной реакции на тяжелые металлы изучены на разных уровнях организации. Впервые установлено, что основным механизмом прекращения пролиферации клеток меристемы в присутствии Ni является ингибирование перехода клеток к синтезу ДНК.

Выводы.

1. Методом корневого теста установлен ряд токсичности исследуемых тяжелых металлов для двух видов злаков *Hordeum vulgare* и *Avena sativa*: Cu>Ni>Mn. Разные сорта каждого из исследуемых видов различаются по структурно-функциональным показателям роста и развития, фотосинтетического аппарата и минерального состава проростков.
2. Выявлена видоспецифичность накопления металлов в надземной части проростков двух исследуемых видов. Наибольшее содержание Mn по сравнению с другими металлами накапливается в надземных частях проростков обоих видов, особенно у *H. vulgare*: в среднем в 70 раз выше, чем в контроле. У *A. sativa* в отличие от *H. vulgare* концентрация Cu в надземных частях проростков достоверно увеличивается при обеих дозах Cu в среде. Показана относительная стабильность уровня макроэлементов у *H. vulgare*.
3. Установлен ряд токсичности ТМ для хлорофилла *a* и хлорофилла *b* в листьях проростков *H. vulgare*: Mn > Ni > Cu; в листьях проростков *A. sativa*: Mn > Cu > Ni. Ряд токсичности для каротиноидов в листьях проростков обоих видов: Ni > Mn > Cu. По степени токсического действия Cu каротиноиды располагаются в следующем порядке: β-каротин > лютеин > виолоксантин.
4. У сортов, отличающихся по устойчивости к токсическому действию ТМ, время возникновения и степень проявления нарушений структуры клеток корня значительно различались. Установлено повышение МИ в корнях *H. vulgare* в присутствии повышенных доз Mn в среде.
5. При воздействии Ni в корнях наиболее чувствительным процессом морфогенеза по сравнению с ростом и дифференциацией оказывается пролиферация клеток в меристеме *T. aestivum*.
6. Основным механизмом прекращения пролиферации клеток меристемы в присутствии Ni является ингибирование перехода клеток к синтезу ДНК. Выход клеток в G₁-фазе клеточного цикла является механизмом сохранения способности меристематических клеток к возобновлению пролиферации. В тканях, участвующих в инициации примордиев боковых корней, переход клеток к синтезу ДНК не подавляется.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В РЕЦЕНЗИРУЕМЫХ ЖУРНАЛАХ

1. Демченко НП, **Калимова И.Б.**, Демченко КН. Влияние никеля на рост, пролиферацию и дифференциацию клеток корневой системы проростков *Triticum aestivum* L. // Физиология Растений. 2005, Т.52, № 2, С. 250-258.
2. Демченко Н.П., **Калимова И.Б.** Динамика роста и деления клеток и структурные изменения в корнях пшеницы под воздействием высокой концентрации никеля // Физиология Растений, 2008, Т. 55, № 6, С.874-885.
3. Беляева А.И., **Калимова И.Б.** Металлоустойчивость двух видов рода *Lupinus (Fabaceae)* // Растительные ресурсы, 2008, вып. 4, С. 56-65.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

4. **Калимова И.Б.**, Алексеева-Попова Н.В. Влияние избытка никеля, меди, марганца на корневые меристемы *Hordeum vulgare* и *Avena sativa* // Труды международной конференции по анатомии и морфологии растений. С-Петербург, 1997, С. 261-262.
5. Alexeeva-Popova N.V, Beljaeva A.I., Drozdova I.V., Igoshina T.I., **Kalimova I.B.**, Cataeva M.N. Species of serpentine flora of Polar Ural – natural bioaccumulators of heavy metals. 6th Russian Setak symposium on risk assesment for environmental contamination. St. Petersburg, 1998, pp 44-45.
6. Алексеева-Попова Н.В., Беляева А.И., Виролайнен А.В., Дроздова И.В., Игошина Т.И., **Калимова И.Б.** Сравнительная оценка токсичности никеля, меди и марганца для растений по физиологическим, цитологическим и оптическим характеристикам // Труды III Международной конференции по устойчивому развитию «Проблемы промышленных регионов: менеджмент и экология». Запорожье, 1998, С. 78-81.
7. Беляева А.И., Игошина Т.И., **Калимова И.Б.** Некоторые физиологические характеристики проростков злаков при действии тяжёлых металлов // Труды II Съезда Русского Ботанического Общества «Проблемы ботаники на рубеже XX – XXI веков». С.-Петербург. 1998, Т. 1, С.149-150.
8. **Калимова И.Б.**, Беляева А.И. Изменчивость химического состава растений в связи с устойчивостью к тяжёлым металлов // Материалы III Российской биогеохимической школы «Геохимическая экология и биогеохимическое изучение таксонов биосферы». Горноалтайск, 2000, С. 263-364.
9. Алексеева-Попова Н.В., **Калимова И.Б.**, Беляева А.И. Межвидовые различия устойчивости растений к стрессовым минерального питания // Материалы Всероссийской научной конференции, посвящённой 100-летию со дня рождения А.Д. Фурсаева. Саратов, 2000, С. 199.
10. **Калимова И.Б.** Сравнительные физиологические характеристики растений, отличающиеся по устойчивости к тяжёлым металлам // Материалы VII Молодёжной конференции ботаников. С.-Петербург, 2000, С. 199.
11. Алексеева-Попова Н.В., Беляева А.И., **Калимова И.Б.** Влияние тяжёлых металлов на ионный гомеостаз растений // Флористические и экологические исследования растительности природных зон. Саратов, 2000, С. 85-88.
12. Демченко НП, **Калимова И.Б.**, Демченко КН, Влияние никеля на развитие корневой системы проростков пшеницы // Тезисы 2-ой Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений». Минск, 2001, С. 59-60.
13. **Калимова И.Б.**, Демченко НП, Демченко КН,. Тканевая реакция корней проростков *Triticum aestivum* на действие избытка никеля в среде // Труды II Международной конференции по анатомии и морфологии растений. С.-Петербург, 2002, pp 283.
14. Demchenko N.P, **Kalimova I.B.**, Demchenko K.N.. Nickel effects on root system development of *Triticum aestivum* L. seedlings: growth, cell proliferation, and differentiation, 6th International Symposium on Structure and Function of Roots - Plant Root Development and Adaptation to Stresses. Stara Lesna, Slovakia, 2003, pp 68.

15. Демченко Н.П., **Калимова И.Б.**, Демченко К.Н. Влияние никеля на рост, пролиферацию и дифференциацию клеток корневой системы проростков *Triticum aestivum* L. // Тезисы докладов Международной конференции «Проблемы физиологии растений Севера». Петрозаводск, 2004, С. 58.
16. Демченко Н.П., **Калимова И.Б.**, Демченко К.Н.. Динамика прекращения роста и деления клеток и структурные изменения в корнях пшеницы под воздействием высокой концентрации никеля // IV Международная научная конференция «Регуляция роста, развития и продуктивности растений». Минск, 2005, С. 70
17. **Калимова И.Б.** Физиологическое действие возрастающих концентраций марганца на проростки некоторых видов и сортов бобовых и злаков. // V Международная научная конференция «Регуляция роста, развития и продуктивности растений». Минск, 2007, С. 87.
18. Демченко Н.П., **Калимова И.Б.** Рост, пролиферация и тканеспецифические изменения структуры ядра в растягивающихся клетках корней пшеницы при воздействии на них высокой концентрации никеля // V Международная научная конференция «Регуляция роста, развития и продуктивности растений». Минск, 2007, С. 47.
19. Демченко Н.П., **Калимова И.Б.**, Влияние никеля на процессы морфогенеза корневой системы // Русское Ботаническое общество XII съезд Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века. Петрозаводск, 2008, С. 179-181.
20. **Irina B. Kalimova**, Natalia V. Alexeeva-Popova Specific features of toxic effect of heavy metals excess in nutrient medium on cereal seedlings // YI International Symposium on ecological behavior. Programme and abstracts. 2009. Helsinki, P.358.