

На правах рукописи



**КАЗНИНА
Наталья Мстиславовна**

**ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ
И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ
УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА *ROACEAE*
К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ**

03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Санкт-Петербург – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии Карельского научного центра Российской академии наук

Научный консультант доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН
ТИТОВ Александр Федорович

Официальные оппоненты: ЖИРОВ Владимир Константинович,
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН
ФГБУН Полярно-альпийский ботанический
сад-институт им. Н.А. Аврорина
Кольского научного центра РАН, директор

ГОЛОВКО Тамара Константиновна,
доктор биологических наук, профессор,
ФГБУН Институт биологии Коми научного центра
РАН, зав. лабораторией

РОЗЕНЦВЕТ Ольга Анатольевна
доктор биологических наук, ФГБУН
Институт экологии Волжского бассейна РАН,
главный научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук

Защита состоится 15 июня 2016 г. в 14.00 на заседании диссертационного совета Д002.211.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Ботаническом институте им. В.Л. Комарова Российской академии наук по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2.

Тел. (812)372-54-42, факс (812)372-54-43, dissovet.d00221102@binran.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук.

Автореферат разослан « » марта 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Лянгузова Ирина Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Проблема устойчивости растительных организмов к неблагоприятным факторам внешней среды многие годы занимает одно из центральных мест в физиологии растений. Благодаря большому количеству исследований на сегодняшний день убедительно доказано, что устойчивость растений к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам обеспечивается функционированием большого числа разнообразных механизмов, действующих на разных уровнях организации.

В последние десятилетия внимание ученых многих стран сосредоточено на изучении механизмов устойчивости растений к тяжелым металлам, что вызвано значительным усилением загрязнения окружающей среды этими химическими элементами вследствие быстрого развития промышленности, резкого увеличения числа автотранспортных средств, возрастания количества вносимых в почву минеральных удобрений и т.д. (Sharma, Agrawal, 2005; Verbruggen et al., 2009; Sarwar et al., 2010; Nazar et al., 2012). Результатам изучения разнообразных механизмов металлоустойчивости растений посвящены многочисленные экспериментальные работы, целый ряд обзорных статей (Алексеева-Попова, 1991; Prasad, 1995; Rauser, 1999; Cobbett, 2000; Clemens, 2001; Серегин, Иванов, 2001; Hall, 2002; Hall, Williams, 2003; Hussain et al., 2004; Clemens, 2006; Krämer et al., 2007; Серегин, Кожевникова, 2007; Morel et al., 2009; Lee et al., 2010; Mendoza-Cózatl et al., 2010; Ueno et al., 2010; Lux et al., 2011; Репкина и др., 2012; Uraguchi, Fujiwara, 2012) и монографий (Physiology and Biochemistry ..., 2002; Титов и др., 2007, 2014; Башмаков, Лукаткин, 2009; Гришко, Сыщиков, 2012; Heavy metal ..., 2013 и др.). Их анализ показывает, что важная роль в адаптации растений к высоким концентрациям тяжелых металлов в окружающей среде принадлежит физиолого-биохимическим механизмам, поскольку способность растений поддерживать интенсивность фотосинтеза и дыхания на необходимом уровне, а также сохранение оптимального водного режима и минерального питания обеспечивают их рост и развитие даже в неблагоприятных внешних условиях.

Однако в последнее десятилетие особое внимание исследователей уделяется молекулярно-генетическим механизмам металлоустойчивости растений (Blindauer, Schmid, 2010; Mendoza-Cózatl et al., 2011; Hossian et al., 2012 и др.), благодаря чему в этой области достигнут значительный прогресс. Тем не менее, многие вопросы все еще довольно слабо изучены. Например, спорным остается участие в механизмах металлоустойчивости целого ряда генов транспортных белков, осуществляющих перенос ионов металлов и их комплексов через клеточные мембраны. Нет окончательного ответа в отношении существования зависимости между устойчивостью растений к тяжелым металлам и количеством хелаторов в клетках, а также уровнем экспрессии генов, кодирующих ферменты, участвующие в синтезе этих соединений.

Необходимо также отметить, что с точки зрения механизмов металлоустойчивости наиболее изученными среди высших растений являются представители семейств *Brassicaceae* и *Fabaceae*. Семейство *Poaceae*, особенно дикорастущие виды, изучено в гораздо меньшей степени. Вместе с тем оно является одним из наиболее крупных семейств покрытосеменных растений, произрастающих почти во всех природно-климатических зонах. К этому семейству принадлежат основные зерновые культуры, составляющие значительную часть рациона питания человека. Дикорастущие злаки играют важную ценотическую роль во многих растительных сообществах. При этом обнаружено, что некоторые виды дикорастущих злаков способны произрастать на почвах с высоким уровнем загрязнения тяжелыми металлами, что может представлять интерес для технологии фиторемедиации. Таким образом, изучение механизмов устойчивости к тяжелым металлам культурных и дикорастущих видов растений семейства *Poaceae* является не только актуальным в теоретическом плане, но и имеет большое практическое значение.

Цель и задачи исследования. Цель работы состояла в изучении физиолого-биохимических и молекулярно-генетических механизмов устойчивости культурных и ди-

корастущих злаков к повышенным концентрациям тяжелых металлов в корнеобитаемой среде.

Для достижения намеченной цели были поставлены следующие задачи:

1) изучить влияние кадмия, свинца и цинка, как наиболее распространенных загрязнителей окружающей среды из группы тяжелых металлов, на основные физиологические процессы у культурных и дикорастущих злаков и выявить физиолого-биохимические механизмы их металлоустойчивости, действующие на разных уровнях организации;

2) исследовать влияние возрастных различий на устойчивость культурных злаков к кадмию, как наиболее токсичному тяжелому металлу, и выявить некоторые молекулярно-генетические механизмы металлоустойчивости, функционирующие у растений разного возраста:

а) определить уровень транскриптов генов (*HvGS*, *HvPCS*, *HvMT1* и *HvMT2*) белков, участвующих в синтезе хелаторов тяжелых металлов, а также содержание восстановленного глутатиона и фитохелатинов в корнях и листьях растений в присутствии кадмия;

б) выявить возможное участие генов (на уровне матриц) (*HvHMA3*, *HvCAH2*, *HvVHA-c* и *HvVHA-E*), продукты которых обеспечивают транспорт тяжелых металлов в вакуоль, в механизмах устойчивости растений к кадмию;

в) определить уровень перекисного окисления липидов и активность ряда антиоксидантных ферментов в корнях и листьях растений в присутствии кадмия.

3) исследовать некоторые внутриклеточные механизмы устойчивости дикорастущих злаков к тяжелым металлам:

а) определить содержание восстановленного глутатиона и фитохелатинов в корнях и листьях растений в присутствии тяжелых металлов;

б) исследовать интенсивность перекисного окисления липидов и активность ряда антиоксидантных ферментов в корнях и листьях растений при действии тяжелых металлов.

4) изучить роль и состояние злаков в травянистых сообществах, сформированных на техногенно загрязненных тяжелыми металлами территориях; оценить перспективы использования наиболее устойчивых видов злаков в фиторемедиации загрязненных тяжелыми металлами почв в условиях таежной зоны.

Научная новизна. Впервые на растениях культурных (*Avena sativa* и *Hordeum vulgare*) и дикорастущих (*Agrostis gigantea*, *Dactylis glomerata*, *Elytrigia repens*, *Phleum pratense* и *Setaria viridis*) злаков выявлены общие и специфические физиолого-биохимические механизмы, обеспечивающие их устойчивость к повышенному содержанию кадмия, свинца и цинка в корнеобитаемой среде.

Впервые показано негативное влияние тяжелых металлов на рост и дифференциацию стеблевых апикальных меристем у культурных злаков, а также на темпы их органогенеза.

На основании изучения физиологических процессов впервые доказано существование отчетливо выраженных возрастных различий в устойчивости проростков ячменя к кадмию и обнаружено, что они во многом связаны с количественными и качественными различиями в активности ряда клеточных механизмов металлоустойчивости растений.

Впервые проведено изучение воздействия повышенных концентраций кадмия и цинка на физиологические процессы у дикорастущего однолетнего злака *Setaria viridis*, характеризующегося C₄- типом фотосинтеза. Обнаружена высокая устойчивость растений данного вида к тяжелым металлам, которая обеспечивается его анатомо-физиологическими особенностями как C₄-вида, а также комплексом адаптационных механизмов, действующих на разных уровнях организации, среди которых важную роль играет связывание ионов металлов хелаторами (глутатионом и фитохелатинами) в клетках корня и листа. Впервые установлена способность растений этого вида к накоплению в значительных количествах кадмия и цинка как в подземных, так и в надземных органах.

Впервые на территории южной и северной Карелии выявлены виды злаков – *Dactylis glomerata* и *Phleum pratense* – являющихся доминантами в травянистых сообществах, сформированных на загрязненных тяжелыми металлами территориях вблизи крупных

промышленных предприятий, и установлены некоторые физиолого-биохимические механизмы, позволяющие этим видам успешно произрастать в подобных условиях.

Практическая значимость работы. Выявленные у культурных и дикорастущих злаков физиолого-биохимические и молекулярно-генетические механизмы устойчивости к тяжелым металлам имеют важное значение для более полного понимания общих механизмов адаптации растений к этим химическим элементам и могут служить основой при определении стратегии селекционно-генетических работ, направленных на поиск генотипов и выведение сортов, обладающих, с одной стороны, высокой металлоустойчивостью, а с другой – способных задерживать значительную часть поступивших ионов металлов в корнях. Данные о возрастных различиях в устойчивости злаков к тяжелым металлам углубляют знания об адаптационных возможностях растений на разных этапах их онтогенеза. Результаты изучения молекулярно-генетических механизмов металлоустойчивости растений позволяют уточнить роль ряда генов, ответственных за синтез белков, осуществляющих транспорт катионов металлов (*HMA3*, *CAH2*) в вакуоль, а также генов субъединиц вакуолярной H^+ -АТФазы в повышении устойчивости растений к кадмию, тем самым расширяя существующие представления о механизмах транспорта тяжелых металлов в растительной клетке. На основании результатов исследований устойчивости к тяжелым металлам дикорастущих злаков доказана возможность использования *Setaria viridis* для фитоэкстракции, а *Dactylis glomerata* и *Phleum pratense* – для фитостабилизации почв с повышенным уровнем тяжелых металлов в условиях таежной зоны.

Основные научные результаты и выводы диссертационной работы могут быть использованы при чтении курсов лекций по физиологии растений, экологии, а также отдельных спецкурсов. Полученные в работе данные отражены в учебных пособиях «Физиологические основы устойчивости растений к тяжелым металлам» и «Устойчивость растений к кадмию», а также практикуме по курсу «Физиологические основы устойчивости растений к тяжелым металлам».

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Культурные и дикорастущие виды семейства *Poaceae* способны в течение продолжительного времени произрастать в присутствии повышенных концентраций кадмия, свинца и цинка в корнеобитаемой среде и формировать семена. Их высокая устойчивость к тяжелым металлам обеспечивается наличием целого ряда физиолого-биохимических и молекулярно-генетических механизмов, среди которых есть как общие для всех изученных видов, так и специфические, характерные для отдельных видов.

2. На ранних этапах онтогенеза у растений культурных злаков существуют отчетливо выраженные возрастные различия в их устойчивости к кадмию – наиболее токсичному среди тяжелых металлов, – которые обусловлены их физиолого-биохимическими особенностями, характерными для определенной фазы развития, а также количественными и/или качественными различиями в активности действующих у них механизмов металлоустойчивости растений. В частности, более высокая устойчивость 7-дневных проростков ячменя к кадмию связана с активацией экспрессии генов, продукты которых участвуют в синтезе хелаторов тяжелых металлов, а также транспорте их ионов в вакуоль.

3. Важным фактором повышения устойчивости культурных и дикорастущих злаков к тяжелым металлам является увеличение содержания глутатиона и фитохелатинов в клетках корня и листа, а также усиление активности ферментов антиоксидантной защиты.

4. Высокая устойчивость дикорастущих злаков к тяжелым металлам обеспечивает их важную экологическую роль в сообществах, сформировавшихся на техногенно загрязненных территориях вблизи крупных промышленных предприятий. Способность доминирующих на таких территориях злаков (*Dactylis glomerata* и *Phleum pratense*) не только расти и развиваться, но и занимать ведущие позиции на участках, расположенных в непосредственной близости от источника загрязнения, обусловлена наличием эффективно работающих адаптационных механизмов.

5. Высокая металлоустойчивость дикорастущих многолетних злаков и их способность накапливать тяжелые металлы в относительно больших количествах в подземных органах, а у *Setaria viridis* и в надземных органах, указывает на возможность использования этих видов в фиторемедиации загрязненных тяжелыми металлами почв в условиях таежной зоны.

Личный вклад автора. Автором определены цели и задачи исследования, выбраны объекты и методы, получены основополагающие результаты. Сбор экспериментальных данных осуществлялся при непосредственном участии автора. Анализ полученных результатов и их последующая интерпретация выполнены автором лично. Автору принадлежит замысел и окончательный текст диссертации. В диссертации использованы работы, опубликованные в соавторстве.

Апробация работы. Основные результаты работы доложены на международных и российских симпозиумах и конференциях: «Биологические основы изучения, освоения и охраны животного и растительного мира, почвенного покрова Восточной Фенноскандии» (Петрозаводск, 1999 г.), «Растение и почва» (Санкт-Петербург, 1999), «Актуальные вопросы экологической физиологии растений в XXI веке» (Сыктывкар, 2001), «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, Беларусь, 2001), «Карелия и РФФИ» (Петрозаводск, 2002), «Наземные и водные экосистемы северной Европы: управление и охрана» (Петрозаводск, 2003), V съезд ОФР и конференция «Физиология растений – основа фитобиотехнологии» (Пенза, 2003), «Проблемы физиологии растений Севера». (Петрозаводск, 2004), «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия» (Вологда, 2005 г.), «Северная Европа в XXI веке: природа, культура, экономика» (Петрозаводск, 2006), VI Съезд ОФР и конференция «Современная физиология растений: от молекул до экосистем» (Сыктывкар, 2007), XII Съезд РБО и конференция «Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века» (Петрозаводск, 2008), XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (Tampere, Finland, 2008), «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях крайнего Севера» (Апатиты, 2009). «Биологическое разнообразие северных экосистем в условиях изменяющегося климата» (Апатиты, 2009), «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, Беларусь, 2009), «Экологическое равновесие и устойчивое развитие территорий» (Санкт-Петербург, Пушкин, 2010 г.), Symposium Finish-Russian Nature reserve Friendship «From wild forest reindeer to biodiversity studies and environmental education» (Kuhmo, Finland, 2010), «Растение и стресс» (Москва, 2010), «Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействием факторов среды» (Петрозаводск, 2011), VII Съезд ОФР и конференция «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (Нижний Новгород, 2011), «Отечественная геоботаника: основные вехи и перспективы» (Санкт-Петербург, 2011), «Адаптационные стратегии живых систем» (Крым, Украина, 2012), «Инновационные направления современной физиологии растений» (Москва, 2013), XIII съезд РБО и конференция «Научные основы охраны и рационального использования растительного покрова Волжского бассейна» (Тольятти, 2013), «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Калининград, 2014), VIII Съезд ОФР и конференция «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015).

Связь работы с плановыми исследованиями и научными программами. Исследования проводились в рамках планов НИР лаборатории экологической физиологии растений ИБ КарНЦ РАН: «Исследование реакции растений на различные виды стрессов» (1996–1999 гг.), (2000–2004 гг.), «Физиологические реакции растений в условиях климатического и техногенного стресса» (2005–2007 гг.), «Структурно-функциональные аспекты устойчивости и адаптации растений к действию неблагоприятных факторов внешней среды» (2008–2010 гг.), «Физиолого-биохимические и молекулярно-генетические меха-

низмы реакции растений на действие неблагоприятных температур и тяжелых металлов» (2011–2012 гг.).

Диссертационная работа была выполнена также при поддержке INTAS-проекта «Selection of plant genotypes from Kazakhstan flora contributing to alleviation of heavy metal hazard to human and animal health» (2002-2005 гг.); гранта РФФИ «Эколого-физиологические пути адаптации культурных растений в условиях таежной зоны Северо-Запада России» (2002-2004 гг.), Программ фундаментальных исследований Президиума РАН «Биологическое разнообразие» «Эколого-физиологические механизмы устойчивости луговой растительности к тяжелым металлам» (2004-2008 гг.) и «Эколого-физиологическая оценка состояния травянистой растительности в условиях техногенного загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами» (2009-2011 гг.), а также «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» по теме «Физиолого-биохимические механизмы устойчивости дикорастущих злаков к повышенным концентрациям тяжелых металлов в почве» (2012-2014 гг.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 90 работ, в том числе 2 монографии, 3 учебных пособия и 20 статей в рецензируемых журналах, входящих в перечень изданий, рекомендуемых ВАК, одна база данных.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 358 страницах, содержит 43 рисунка и 55 таблиц. Работа состоит из введения, обзора литературы, четырех глав экспериментальной части, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 934 источника, в том числе 661 иностранных.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность своему учителю, научному консультанту чл.-корр. РАН, д.б.н., проф. А.Ф. Титову за неоценимую помощь и поддержку на всех этапах работы. Искренне признательна всем сотрудникам лаборатории экологической физиологии растений и особенно д.б.н. В.В. Талановой за всестороннюю помощь, консультации и рекомендации, сделанные в процессе выполнения диссертации, к.б.н. Г.Ф. Лайдинен и к.б.н. Ю.В. Батовой за продуктивное сотрудничество и постоянную поддержку на протяжении многих лет. Благодарю к.б.н. Л.В. Топчиеву и к.б.н. Ю.В. Венжик за помощь в проведении экспериментов. Особая благодарность к.б.н. О.Н. Лебедевой за консультации и ценные советы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

Показаны основные источники поступления тяжелых металлов в окружающую среду. Обсуждены вопросы поступления и транспорта тяжелых металлов в растениях, их накопления и распределения по органам, тканям и клеткам. Описано влияние тяжелых металлов на основные физиологические процессы у растений. Рассмотрены современные представления о клеточных механизмах устойчивости растений к тяжелым металлам. Обсуждены вопросы, касающиеся устойчивости растений семейства *Poaceae* к тяжелым металлам.

Глава 2. Объекты и методы исследований

Объекты исследований

Объектами исследований явились виды растений семейства *Poaceae*. Культурные злаки: овес посевной (*Avena sativa* L.) сорта Фаленский, ячмень обыкновенный (*Hordeum vulgare* L.) сортов Дина и Зазерский 85. Дикорастущие злаки: *Dactylis glomerata* L. (ежа сборная), *Bromopsis inermis* Leyss (кострец безостый), *Agrostis gigantea* Roth. (полевица гиганская), *Elytrigia repens* (L.) Nevski (пырей ползучий), *Phleum pratense* L. (тимофеевка луговая) и *Setaria viridis* (L.) Beauv. (щетинник зеленый).

Условия проведения исследований

Физиолого-биохимические механизмы устойчивости культурных злаков (овса с. Фаленский и ячменя с. Дина) к тяжелым металлам изучали в вегетационном опыте, исполь-

зую песчаную культуру. Кадмий в концентрациях 40, 80 и 160 мг/кг субстрата, цинк в концентрациях 40, 80, 160 и 320 мг/кг субстрата в виде серноокислых солей и свинец в концентрациях 80, 160 и 320 мг/кг субстрата в виде уксуснокислой соли вносили перед посевом семян. Полив осуществляли модифицированным питательным раствором (рН 6.2–6.4). Оценку устойчивости злаков осуществляли по изменению (по отношению к контролю) линейных размеров корня и побега, подземной и надземной биомассы при достижении растениями фазы проростков или 3-х листьев. Развитие растений оценивали по срокам наступления фенофаз и этапам органогенеза. При изучении влияния тяжелых металлов на фотосинтетический аппарат (ФСА) растений были исследованы такие параметры, как содержание фотосинтетических пигментов, показатели мезоструктуры листа, активности фотосистемы II (ФС II), а также интенсивность фотосинтеза. Влияние тяжелых металлов на водный обмен растений оценивали по изменению (по отношению к контролю) интенсивности транспирации, устьичной проводимости, оводненности тканей корня и листа. Продуктивность злаков оценивали в фазу молочной спелости по накоплению надземной биомассы, числу генеративных побегов, длине и биомассе соцветия главного побега, количеству зерен и биомассе зерновки.

Для исследования возрастных различий металлоустойчивости растений и изучения молекулярно-генетических механизмов устойчивости злаков к тяжелым металлам растения ячменя сорта Зазерский 85 выращивали в рулонах фильтровальной бумаги на модифицированном питательном растворе (рН 6.2–6.4) в течение 3-х и 7-и сут в камерах искусственного климата при температуре воздуха 20–22 °С, освещенности 10 клк, фотопериоде 14 ч. Затем в опытных вариантах к питательному раствору добавляли 100 мкМ кадмия в форме сульфата. Спустя 4 сут экспозиции у растений контрольного и опытного вариантов определяли уровень транскриптов генов (*HvGS*, *HvPCS*, *HvMT1* и *HvMT2*), продукты которых участвуют в синтезе хелаторов металлов в клетке, а также содержание восстановленного глутатиона (GSH) и общее содержание фитохелатинов (ФХ); количество матриц генов (*HvHMA3*, *HvCAH2*) белков, участвующих в транспорте ионов металлов через тонопласт, и генов субъединиц вакуолярной Н⁺-АТФазы (*HvVHA-E* и *HvVHA-c*); исследовали интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) по содержанию малонового диальдегида (МДА) и активность антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), пероксидазы (ПО).

Изучение влияния тяжелых металлов на проращивание семян дикорастущих злаков проводили в лабораторных условиях в чашках Петри при температуре 22 °С. В контрольных вариантах использовали дистиллированную воду, в опытных вариантах – растворы солей кадмия, свинца и цинка в концентрациях 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³ и 10⁻² М. Всхожесть семян определяли: у *Agrostis gigantea* – на 14-е сут, у *Bromopsis inermis* – на 10-е сут, у *Elytrigia repens* – на 14 сут, у *Phleum pratense* – на 8-е сут, согласно ГОСТу № 12038-84.

Устойчивость дикорастущего однолетнего вида (*Setaria viridis*) к тяжелым металлам изучали в вегетационном опыте, используя песчаную культуру. Кадмий в концентрациях 10, 20, 40 и 80 мг/кг субстрата и цинк в концентрациях 40, 80, 160 и 320 мг/кг субстрата в виде их серноокислых солей вносили в субстрат перед посевом семян. Полив осуществляли модифицированным питательным раствором. Оценку устойчивости растений осуществляли при достижении растениями фазы 3-х листьев по изменению (по отношению к контролю) линейных размеров корня, побега и листовой пластинки. Анализ ряда параметров активности ФСА и водного обмена проводили с использованием кадмия в концентрации 40 мг/кг субстрата. Продуктивность растений оценивали в фазу цветения по накоплению надземной биомассы, числу генеративных побегов, длине и биомассе соцветия главного побега. В корнях и побегах определяли содержание тяжелых металлов, а также концентрацию GSH и ФХ.

Физиолого-биохимические и молекулярные механизмы устойчивости дикорастущих многолетних злаков к тяжелым металлам исследовали в вегетационном опыте, используя песчаную культуру. Тяжелые металлы вносили в субстрат перед посевом семян в концен-

трациях (кадмий – 40 мг/кг субстрата; свинец – 400 мг/кг субстрата и цинк – 160 мг/кг субстрата), при которых на 20-е сут после посева (согласно предварительным опытам) уменьшение высоты побега у всех видов злаков составило 40% от контроля. Полив осуществляли модифицированным питательным раствором. Оценка устойчивости злаков к тяжелым металлам осуществляли при достижении растениями фазы кущения (на 60-е сут после посева) по накоплению подземной и надземной биомассы, числу боковых побегов, изменению (по отношению к контролю) размеров листовой пластинки 5-го листа (самого молодого из полностью сформированных), ряда параметров фотосинтетической активности и водного обмена. В корнях и листьях растений определяли содержание тяжелых металлов, а также интенсивность ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов: СОД, КАТ и ПО. Для изучения внутриклеточных механизмов детоксикации кадмия у дикорастущих злаков определяли содержание GSH и ФХ в корне и листе.

Устойчивость многолетних дикорастущих злаков к техногенному загрязнению почвы тяжелыми металлами изучали в полевых условиях. Исследования проводили на участках, расположенных в непосредственной близости (0.5 км), а также на расстоянии 4 и 8 км от двух наиболее крупных промышленных предприятий Республики Карелия: Кондопожского целлюлозно-бумажного комбината ОАО «Кондопога» (Кондопожский ЦБК), который специализируется на производстве газетной бумаги, и Костомукшского горно-обогатительного комбината ОАО «Карельский окатыш» (Костомукшский ГОК) – производителя железорудного сырья. Участки выбирали по направлению господствующих на этих территориях ветров (в северо-западном направлении в районе г. Кондопоги и в северо-восточном направлении в районе г. Костомукша) (Атлас ...1989). Об устойчивости злаков судили на основании оценки их ценотической роли в сообществах (по проективному покрытию видов растений), а также по состоянию доминирующих на изученных участках видов злаков (*Dactylis glomerata* и *Phleum pratense*), которое оценивали по ряду физиолого-биохимических показателей (высота побега, размеры листовой пластинки подфлагового листа и длина соцветия, содержание основных форм фотосинтетических пигментов).

Методы исследований

Размер апикальной меристемы стебля и количество заложившихся элементов соцветия, а также темпы органогенеза определяли морфофизиологическим методом с помощью бинокулярной лупы МБС-10 (Куперман, 1968).

Площадь листовой пластинки злаков рассчитывали по формуле $S=2/3 \cdot l \cdot d$, где l – длина листа, d – ширина листа (Аникиев, Кутузов, 1961).

Содержание хлорофиллов (a и b) и каротиноидов в листьях растений определяли спектрофотометрически с использованием спектрофотометра СФ-2000 (Спектр, Россия), экстрагируя 80%-ным ацетоном (Шлык, 1971). Долю хлорофиллов в светособирающих комплексах (ССК) от их общей суммы рассчитывали с учетом того, что весь хлорофилл b находится в светособирающем комплексе, а отношение хлорофиллов a/b в ССК равно 1.2 (Lichtenthaler, 1987).

Анализ мезоструктуры листа проводили в соответствии с методикой (Мокронос, Борзенкова, 1978).

Измерение параметров флуоресценции хлорофилла проводили с использованием флуориметра MINI-PAM (Walz, Германия).

Интенсивность фотосинтеза, транспирации и устьичную проводимость оценивали с помощью установки для исследования CO_2 -газообмена и водяных паров НСМ-1000 (Walz, Германия).

Оводненность тканей анализировали весовым методом, высушивая растительные образцы в термостате до постоянного веса при температуре 105°С (Аринушкина, 1970).

Подсчет числа устьиц, измерение размеров замыкающих клеток и устьичной щели осуществляли методом отпечатков с использованием светового микроскопа Микмед 2

(ЛОМО, Россия) и окуляр-микрометра (Жолкевич, Пильщикова, 1989). Площадь устьичной щели рассчитывали по формуле

$S = \pi \cdot (L/2 \cdot d/2)$, где S – площадь, L – длина и d – ширина устьичной щели (Борзенкова, Храмцова, 2006).

Количество GSH и ФХ определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием жидкостного хроматографа Стайер (Аквилон, Россия). Определение содержания непротеиновых тиолов проводили методом предколочной дериватизации с монобромбиманом согласно методике Снеллер с соавт. (Sneller et al., 2001). Количество GSH и ФХ определяли по стандарту GSH (“Sigma”). Расчет площадей пиков осуществляли с помощью компьютерной программы МультиХром (Версия 1,5X).

Уровень транскриптов генов определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени после выделения из растительных образцов тотальной РНК с помощью набора Yellow Solve (“Clonogene”). Определение качества и количества выделенной РНК проводили с помощью капиллярного электрофореза на микрочипах (Experion, “Био-Рад”). Количество и качество кДНК проверяли спектрофотометрически (SmartSpecPlus, «Био-Рад»). Амплификацию проводили в приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 (“Био-Рад”), используя наборы для амплификации с интеркалирующим красителем SYBR Green («Синтол»). Для ПЦР использовали прямой и обратный праймеры (табл. 1). Протокол ПЦР: 5 мин при 95°C, далее 45 циклов 15 с при 95°C, 50 с при 60°C. Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР фрагментов: 1 мин при 95°C, 1 мин при 60°C, 10 с при 60°C (80 циклов, повышая в каждом цикле температуру на 0.5°C). Относительный уровень транскриптов генов растений, подвергнутых воздействию кадмия, вычисляли по формуле: $\text{Относительный уровень} = 2^{\text{Ст(контрольный)} - \text{Ст(тестовый образец)}}$, где Ст – значения пороговых циклов. Для ПЦР в режиме реального времени использовали прямые и обратные праймеры («Синтол»).

Таблица 1

Праймеры для проведения ПЦР в режиме реального времени

Ген	Нуклеотидная последовательность	
	прямого праймера	обратного праймера
<i>САХ2</i>	GGATTTCCAAAGGTGGCATT	CCTAAAGGTTTCCACCTAA
<i>GS</i>	CAAGAACCATCGGAGATCAG	CCTCTTTCTTGTTTCAGTTCC
<i>HMA3</i>	GCAGTGCCTAGCATCCTA- TAATCC	CTGTTGGCTGA- GATTTGTTTGGTC
<i>MT1</i>	CTGACTTGGAGGAGAA- GAGCG	GACCTCCTCGAACCGCACCTT
<i>MT2</i>	GCACCACCGCCACCTCCTCCC	GGTTGCAGGTGCAGTTGGGGC
<i>PCS</i>	AATCTACGGCCTCATCATCG	CACGGGATGAGAGGATGATG
<i>VHA-E</i>	CGCCGACGCCAAGAT- GAACGACA	AGCACTTTGATACGGGAAG- CATT
<i>VHA-c</i>	AAATCTACGGCCTCATCATCG	CACGGGATGAGAGGATGATG
<i>Actin</i>	GGGACCTCACGGATAATC- TAATG	AACCTCCACTGA- GAACAACATTAC

Определение содержания МДА и активность антиоксидантных ферментов проводили спектрофотометрически с использованием спектрофотометра СФ-2000 (Спектр, Россия). Для выяснения содержания МДА использовали реакционную среду, содержащую 0.25% раствор тиобарбитуровой кислоты в 10% трихлоруксусной кислоте (Heat, Packer, 1968). Активность антиоксидантных ферментов определяли спектрофотометрически. Общую активность СОД оценивали по способности фермента ингибировать фотохимическое восстановление тетразолия нитросинего согласно методике (Beauchamp, Fridovich, 1971),

активность ПО определяли, используя в качестве субстрата гваякол по методике (Maehly, Chance, 1954), активность КАТ – по методике (Аebi, 1984).

Анализ флоры проводили по М.Л. Раменской (Раменская, 1983). Латинские названия растений даны в соответствии со сводкой С. К. Черепанова (Черепанов, 1995). Проективное покрытие видов растений оценивали по шкале Браун-Бланке.

Содержание тяжелых металлов в почвенных и растительных образцах определяли атомно-абсорбционным методом на спектрофотометре АА-6800 (Shimadzu, Япония) или методом инверсионной вольтамперометрии на полярографе АВС-1.1 (Вольта, Россия).

Повторности и статистическая обработка данных. Изучение влияния тяжелых металлов на прорастание семян проводили в 4-кратной повторности по 25 семян в каждой. В вегетационных экспериментах биологическая повторность в пределах одного варианта опыта для разных измерений составляла от 5 до 20 растений. Аналитическая повторность при проведении химических анализов была 3-5-кратной. Каждый опыт повторяли не менее 3 раз. Для проведения полевых исследований на участках, расположенных на разном расстоянии от источника загрязнения, были выделены пробные площади 10 x 10 м. На каждой пробной площади закладывали по 10 учетных площадок размером 1 x 1 м. Объем выборки растений доминирующих видов злаков составлял не менее 20 растений в пределах одной пробной площади (Методические указания ..., 1979).

Обработку экспериментальных данных проводили с помощью методов вариационной статистики, используя программу MS Excel. Достоверность различий оценивали на основании *t*-критерия Стьюдента. В таблицах и на рисунках представлены средние значения и их стандартные ошибки. В работе обсуждаются величины, достоверные при $P \leq 0.05$.

Глава 3. Физиолого-биохимические механизмы устойчивости культурных злаков к тяжелым металлам

Среди многочисленных механизмов, способствующих адаптации растений к повышению содержания тяжелых металлов в окружающей среде, важная роль принадлежит механизмам, действующим на уровне отдельных физиологических процессов, поскольку именно они в первую очередь обеспечивают поддержание жизнедеятельности растительных организмов в неблагоприятных условиях. При этом некоторые физиологические показатели являются надежными критериями оценки устойчивости к тяжелым металлам отдельных видов (сортов, генотипов).

3.1. Влияние тяжелых металлов на рост, развитие и продуктивность растений

Известно, что прорастание семян и начальный рост проростков во многом определяют дальнейшее развитие растений и, в конечном счете, их продуктивность (Гумилевская и др., 1995; Обручева, Антипова, 1997 и др.). Поэтому хорошая всхожесть семян в неблагоприятных условиях среды может являться одним из показателей устойчивости растений. В результате проведенных нами исследований было установлено, что семена ячменя и овса способны успешно прорасти в присутствии кадмия, свинца и цинка в изученных концентрациях. При этом всхожесть семян злаков составляла 100% или приближалась к этому значению.

Далее в автореферате представлены данные, касающиеся влияния тяжелых металлов на растения ячменя, учитывая, что качественных различий в ответной реакции изученных видов злаков на действие тяжелых металлов не обнаружено и количественные различия были невелики.

На ранних фазах развития растений нами было выявлено негативное воздействие кадмия, свинца и цинка на рост растений, которое усиливалось с увеличением их концентрации в субстрате. При этом в большей степени ингибировался рост корня (рис. 1), что, очевидно, связано с более высокой концентрацией в нем металлов. В наименьшей степени уменьшалась площадь листовой пластинки. Причем, как показали наши наблюдения, это касается не только 1-го листа, но и 2-го, и 3-го. Отмеченный эффект, по-видимому, можно

рассматривать как адаптационный, способствующий сохранению активности ФСА растений в неблагоприятных условиях среды.

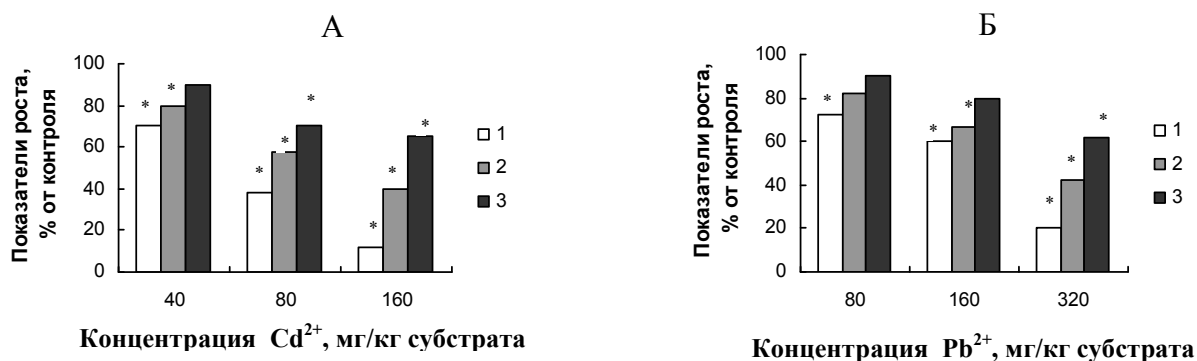


Рис. 1. Влияние кадмия (А) и свинца (Б) на некоторые показатели роста у растений ячменя с. Дина в фазу проростков. 1 – длина корня, 2 – высота побега, 3 – площадь 1-го листа. * - различия с контролем достоверны при $P \leq 0.05$.

Поскольку все структурные элементы растения формируются апикальными меристемами, и именно от их функционирования в значительной степени зависит его габитус, а в дальнейшем и продуктивность, особое внимание в нашей работе было уделено изучению влияния тяжелых металлов на апикальную меристему стебля (конус нарастания) злаков. Нами обнаружено негативное воздействие кадмия и свинца на рост и дифференциацию конуса нарастания у растений ячменя и овса. Так, в фазе проростков в присутствии всех изученных концентраций металлов у злаков уменьшалась (по сравнению с контролем) длина конуса нарастания, что свидетельствует, на наш взгляд, о замедлении клеточного деления (рис. 2). При этом замедлялись и темпы органогенеза. Однако уже через 7 сут (в фазу 3-х листьев) ингибирующее действие тяжелых металлов на размеры апикальной меристемы стебля ослабевало, что, вероятно, было связано с восстановлением клеточного деления вследствие действия механизмов их детоксикации. Об этом свидетельствует и уменьшение различий в темпах органогенеза между растениями контрольных и опытных вариантов. В результате даже в присутствии наиболее высоких концентраций металлов злаки смогли перейти к III этапу органогенеза, который характеризуется сегментацией конуса нарастания и формированием будущих элементов соцветия. Цинк в изученных концентрациях оказывал менее выраженное действие на апикальную меристему стебля злаков по сравнению с кадмием и свинцом.

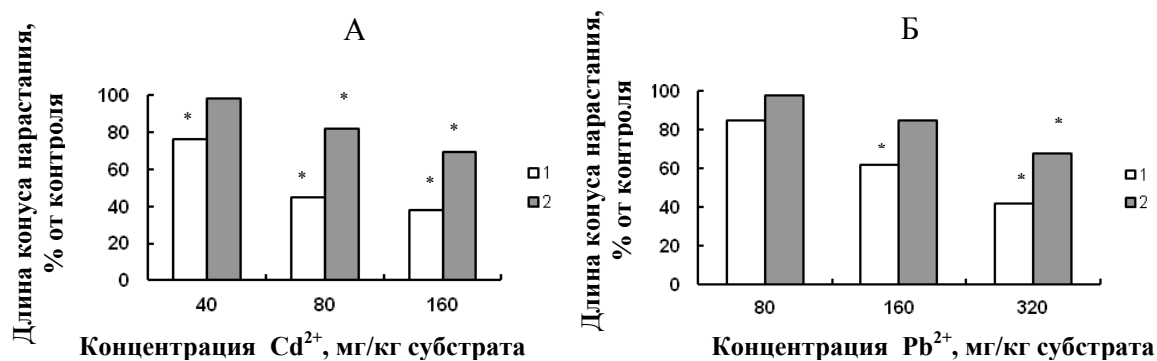


Рис. 2. Влияние кадмия (А) и свинца (Б) на длину конуса нарастания у растений ячменя с. Дина. 1 – фаза проростков; 2 – фаза 3-х листьев. * – различия с контролем достоверны при $P \leq 0.05$.

Относительно быстрое восстановление размеров апикальной меристемы стебля на ранних фазах развития позволило растениям на поздних фазах даже в присутствии наиболее высоких концентраций тяжелых металлов перейти к генеративному развитию и сформировать семена. Тем не менее, у опытных растений показатели семенной продуктивности (длина и биомасса соцветия, количество зерен в колосе (метелке), а при действии кадмия – еще и масса зерновки) оказались меньше, чем у растений контрольного варианта (табл. 2).

Таблица 2

Влияние тяжелых металлов (ТМ) на семенную продуктивность растений ячменя с. Дина

Конц-ия ТМ, мг/кг субстрата	Кол-во боковых побегов, шт.	Длина соцветия, см	Биомасса соцветия, г	Число зерен, шт.	Масса зерновки, мг
Кадмий					
0	4.0 ± 0.2	3.2 ± 0.8	0.72 ± 0.06	8.6 ± 0.2	84.21 ± 2.61
40	3.5 ± 0.2	3.1 ± 0.1	0.72 ± 0.05	8.1 ± 0.4	89.01 ± 1.32
80	2.7 ± 0.1*	2.8 ± 0.1	0.53 ± 0.10*	6.9 ± 0.4*	56.26 ± 2.56*
160	2.5 ± 0.2*	2.1 ± 0.2*	0.29 ± 0.04*	5.8 ± 0.3*	49.83 ± 1.38*
Свинец					
0	3.3 ± 0.2	4.8 ± 0.1	1.24 ± 0.12	13.0 ± 0.6	95.38 ± 2.50
80	3.4 ± 0.4	3.8 ± 0.2	1.25 ± 0.10	10.2 ± 0.6*	93.14 ± 2.23
160	3.6 ± 0.4	3.9 ± 0.1*	1.37 ± 0.21	10.4 ± 0.5*	92.73 ± 1.89
320	2.1 ± 0.5*	3.7 ± 0.3*	0.90 ± 0.08*	9.4 ± 0.7*	95.74 ± 1.75
Цинк					
0	3.5 ± 0.2	3.9 ± 0.2	0.68 ± 0.01	8.7 ± 0.7	78.16 ± 1.45
40	2.7 ± 0.2*	3.9 ± 0.1	0.58 ± 0.06*	8.4 ± 0.6	69.05 ± 1.65
80	1.9 ± 0.4*	4.4 ± 0.1	0.53 ± 0.06*	7.1 ± 0.9*	74.65 ± 1.65
160	1.6 ± 0.2*	3.2 ± 0.1*	0.52 ± 0.04*	6.8 ± 0.6*	76.42 ± 1.52

* – различия с контролем достоверны при $P \leq 0.05$.

Уменьшалось также количество боковых побегов, что, однако, можно расценивать как своего рода компенсаторную реакцию, направленную на сохранение высокой семенной продуктивности главного побега (Удовенко, Гончарова, 1982).

В целом, исследования показали, что степень негативного воздействия тяжелых металлов на показатели роста и развития изученных видов злаков зависит в большей степени от токсичности металла и его концентрации, а также от фазы развития растений, тогда как межвидовые различия были выражены в гораздо меньшей степени. В этой связи дальнейшие эксперименты были проведены только на ячмене. Учитывая также, что свинец вследствие малой подвижности практически не поступает в надземные органы растений, в опытах использовали только кадмий и цинк.

3.2. Влияние тяжелых металлов на фотосинтез растений

Известно, что ФСА отличается очень высокой чувствительностью к воздействию тяжелых металлов, поэтому устойчивость растений к этому виду стрессового воздействия может быть напрямую связана именно с устойчивостью их ФСА. При этом некоторые показатели активности ФСА широко используются в качестве критериев оценки устойчивости растений к тяжелым металлам.

Результаты наших исследований показали, что в присутствии довольно высоких концентраций тяжелых металлов интенсивность фотосинтеза у злаков сохраняется на уровне контрольного варианта и только наибольшие из изученных нами концентраций вызывают замедление скорости этого процесса (рис. 3).

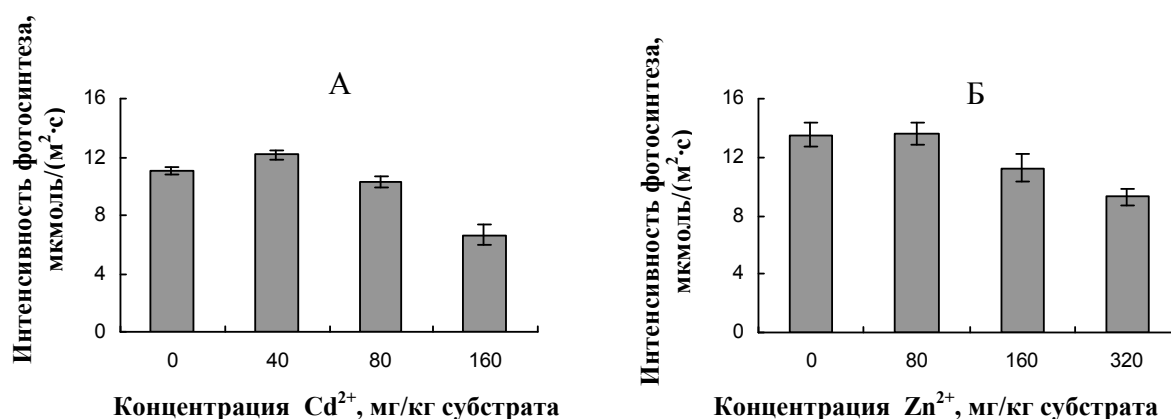


Рис. 3. Влияние кадмия (А) и цинка (Б) на интенсивность фотосинтеза растений ячменя с. Дина.

Поддержание у опытных растений высокого уровня ассимиляции углерода было связано с возрастанием числа хлоропластов на единицу площади клетки (в опытах с кадмием) (табл. 3) или с увеличением размеров клеток мезофилла и самих хлоропластов (в опытах с цинком); с сохранением активности ФС II, о чем свидетельствует отсутствие значимых изменений таких показателей флуоресценции хлорофилла, как максимальный и реальный квантовый выход фотохимической активности ФС II (F_v/F_m и $Yield$); а также с поддержанием концентрации каротиноидов на уровне контрольных растений.

Таблица 3
Влияние кадмия на фотосинтетический аппарат растений ячменя с. Дина

Показатели	Концентрация кадмия, мг/кг субстрата			
	0	40	80	160
Число хлоропластов на единицу площади клетки, шт.	24±0.9	29±0.78*	28±1.2*	23±0.6
Содержание хлорофиллов (a+b), мг/г сырой массы	1.56±0.002	1.29±0.003*	1.11±0.002*	0.91±0.003*
Содержание хлорофиллов в ССК, мг/г сырой массы	0.84±0.05	0.72±0.06	0.59±0.03*	0.42±0.04*
Содержание каротиноидов, мг/г сырой массы	0.42±0.003	0.39±0.004	0.40±0.002	0.38±0.003
F_v/F_m	0.754±0.009	0.766±0.008	0.746±0.013	0.757±0.010
$Yield$	0.589±0.009	0.591±0.008	0.584±0.020	0.582±0.021

* – различия с контролем достоверны при $P \leq 0.05$.

Наиболее высокие из изученных концентраций тяжелых металлов замедляли скорость фотосинтеза, что, судя по нашим данным, в значительной степени связано с уменьшением количества зеленых пигментов, в том числе в ССК. Нельзя исключить и опосредованного влияния тяжелых металлов на интенсивность фотосинтеза, связанного с их воздействием на другие физиологические процессы, среди которых важное место занимает водный обмен.

3.3. Влияние тяжелых металлов на водный обмен растений

Негативное влияние тяжелых металлов на водный режим растений хорошо известно (Barceló, Poschenrieder, 1990; Brune et al., 1994; Veselov et al., 2003; Uraguchi et al., 2009; Ci et al., 2010 и др.). При этом доказано, что изменение (по отношению к контролю) некоторых параметров водного обмена в их присутствии позволяет судить об устойчивости растений к данному виду стрессового воздействия.

В проведенных нами исследованиях кадмий и цинк в высоких концентрациях приводили к замедлению интенсивности транспирации и снижению устьичной проводимости у растений ячменя, что могло быть связано с уменьшением размеров корневой системы, а также с их ингибирующим действием на размеры устьичной щели (табл. 4). Вместе с тем замедление скорости транспирации в присутствии тяжелых металлов можно рассматривать и с точки зрения адаптационных механизмов, дающих возможность растениям поддерживать в этих условиях высокий уровень оводненности тканей корня и побега (Salt et al., 1995), что было обнаружено и в наших опытах.

Таблица 4

Влияние тяжелых металлов на показатели водного обмена растений ячменя с. Дина

Концентрация ТМ, мг/кг субстрата	Интенсивность транспирации, ммоль/(м ² ·с)	Устьичная проводимость, ммоль/(м ² ·с)	Оводненность тканей корня, %	Оводненность тканей побега, %
Кадмий				
0	4.1±0.1	164.7±6.7	87.7±0.9	86.3±1.2
40	4.7±0.1	177.6±6.6	90.9±1.2	89.3±0.8
80	2.9±0.2*	114.6±7.38*	87.6±1.4	90.0±1.0
160	1.9±0.3*	94.0±8.9*	89.2±0.8	89.2±0.7
Цинк				
0	4.4±0.1	131.8±5.2	90.3±0.5	85.4±0.5
40	4.5±0.1	140.7±8.2	91.6±0.5	85.9±0.7
80	3.5±0.3*	116.9±6.3*	88.4±1.2	86.5±1.2
160	2.5±0.2*	106.2±4.1*	81.4±1.2	85.9±1.0

* – различия с контролем достоверны при P≤0.05.

Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что культурные злаки обладают высокой устойчивостью к тяжелым металлам. Хорошая всхожесть их семян, способность на ранних этапах развития восстанавливать деление клеток апикальной меристемы стебля и сохранять активный рост побега при замедлении роста корня, а также поддерживать высокий уровень активности ФСА и оводненности тканей позволяют растениям не только произрастать длительное время в условиях повышенных концентраций кадмия, свинца и цинка в корнеобитаемой среде, но и переходить к генеративному развитию и формировать семена.

3.4. Влияние возрастных различий на устойчивость культурных злаков к кадмию

Известно, что характер адаптивных реакций растений во многом зависит от их возраста (Жученко, 1988). В частности, возрастные различия в устойчивости растений обнаружены по отношению к таким стрессорам, как низкие температуры (Батыгин, 1986), дефицит воды (Шматько, Григорюк, 1992), повышенная радиация (Fellenberg, 1982). Что касается влияния возрастных различий на устойчивость растений к тяжелым металлам, то об этом известно крайне мало, и природа этих различий по сути дела не обсуждается. Учитывая это, нами была поставлена задача: сравнить устойчивость растений разного возраста (ограничиваясь ранними этапами развития) к кадмию, как наиболее токсичному металлу. Для ее решения мы использовали 3-х и 7-и дневные проростки ячменя, которые, несмотря

на близость календарного возраста, находились в существенно разном возрастном состоянии.

Проведенные исследования выявили отчетливо выраженные различия в ответной реакции растений разного возраста на воздействие кадмия, при этом 7-дневные проростки оказались гораздо более устойчивыми к металлу, чем 3-дневные. В частности, у 3-дневных проростков спустя 4 сут. экспозиции на растворе с кадмием все изученные нами физиолого-биохимические показатели заметно уменьшались, тогда как у 7-дневных проростков негативного действия металла на большинство изученных показателей не наблюдалось, лишь несколько снижалось содержание хлорофиллов, что, однако, не отразилось на интенсивности фотосинтеза (табл. 5).

Таблица 5

Влияние кадмия на некоторые физиологические показатели у растений ячменя с. Зазерский 85 разного возраста после 4-суточной экспозиции на растворе с металлом (100 мкМ)

Показатель	Возраст растений до обработки Cd ²⁺			
	3-дневные растения		7-дневные растения	
	контроль	опыт	контроль	опыт
Длина корня, см	9.3±0.6	6.5±0.3*	11.4±1.1	11.2±0.9
Высота побега, см	12.1±0.2	10.5±0.2*	21.3±0.4	20.7±0.1
Содержание хлорофиллов (a + b), мг/г сырой массы	0.87±0.01	0.73±0.01*	1.19±0.01	1.05±0.01*
Интенсивность фотосинтеза, мкмоль/(м ² ·с)	5.9±0.2	4.6±0.2*	10.2±0.4	10.0±0.4
Интенсивность транспирации, ммоль/(м ² ·с)	1.4±0.1	1.1±0.1*	1.7±0.2	1.6±0.1
Устьичная проводимость, ммоль/(м ² ·с)	98.3±7.6	72.0±1.6*	120.9±9.0	117.9±3.5

* – различия с контролем достоверны при P≤0.05.

На основании полученных результатов и анализа данных литературы нами было высказано предположение о том, что различия в устойчивости растений разного возраста к тяжелым металлам, в частности, к кадмию, связаны не только с их физиолого-биохимическими особенностями, характерными для определенной фазы развития, но и с количественными и/или качественными различиями в активности действующих на этих этапах механизмов металлоустойчивости. Для его проверки в дальнейшем были проведены лабораторные исследования по изучению молекулярно-генетических механизмов устойчивости растений ячменя к кадмию с учетом их возраста.

Глава 4. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости культурных злаков к кадмию

Несмотря на функционирование целого ряда механизмов, препятствующих поступлению тяжелых металлов в растения, при высоких их концентрациях в окружающей среде определенное количество ионов проникает в клетку, где в этом случае начинают действовать внутриклеточные механизмы их детоксикации, включающие связывание ионов тяжелых металлов в цитоплазме различными хелаторами и транспорт таких комплексов, а также свободных ионов в вакуоль.

4.1. Уровень транскриптов генов белков, участвующих в синтезе хелаторов тяжелых металлов, и содержание восстановленного глутатиона и фитохелатинов в корнях и листьях растений ячменя при действии кадмия

Одним из наиболее важных механизмов устойчивости растений к кадмию является связывание его ионов непротеиновыми тиолами (GSH и ФХ), а также низкомолекулярными белками – металлотионеинами (МТ) (Wagner, 1993; Prasad, 1995; Rauser, 1999; Clemens et al., 2002; Haydon, Cobbett, 2007). Синтез этих молекул в клетках растений при действии тяжелых металлов является показателем их металлоустойчивости. В этой связи нами изучено влияние кадмия на уровень транскриптов генов, продукты которых участвуют в синтезе указанных хелаторов, а также определено содержание GSH и ФХ в корнях и листьях растений ячменя разного возраста.

Исследования показали, что при действии кадмия уровень транскриптов гена *HvGS* (глутатионсинтетазы – фермента, участвующего в синтезе глутатиона) увеличивается только у 7-дневных (более устойчивых к металлу) проростков (рис. 4).

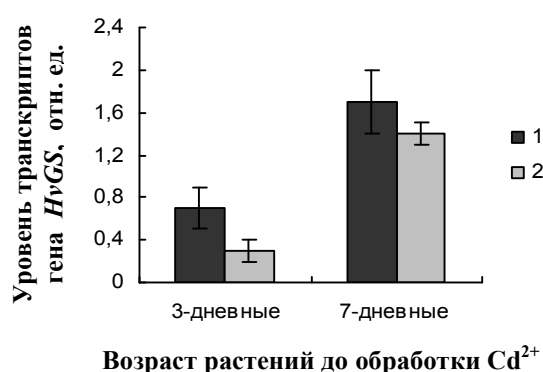


Рис. 4. Уровень транскриптов гена *HvGS* в корнях (1) и листьях (2) растений ячменя с. Зазерский 85 разного возраста после 4-суточной экспозиции на растворе с Cd^{2+} (100 мкМ). Уровень транскриптов гена у растений контрольного варианта принят за единицу.

При этом и содержание GSH у них повышалось в корнях почти в 2 раза (рис. 5), в листьях – в 1.5 раза, свидетельствуя о запуске его синтеза. В отличие от этого у 3-дневных проростков увеличения количества матриц гена *HvGS* не наблюдалось, а концентрация GSH уменьшалась, что, очевидно, в значительной степени связано с расходом его молекул на синтез ФХ.

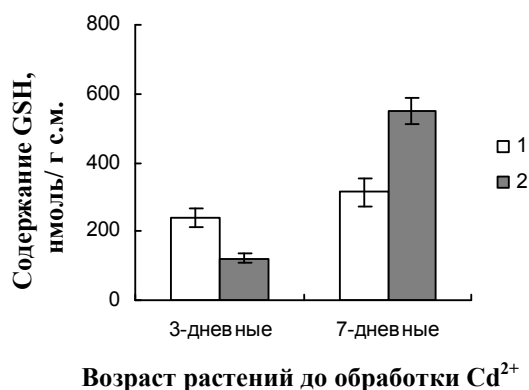


Рис. 5. Содержание GSH в корнях растений ячменя (с. Зазерский 85) разного возраста после 4-суточной экспозиции на растворе с Cd^{2+} (100 мкМ). 1 – контроль, 2 – опыт.

На сегодняшний день доказано, что при поступлении тяжелых металлов в клетки у растений активируется синтез ФХ из GSH, который регулируется на уровне экспрессии гена фермента фитохелатинсинтазы (PCS), а также генов, кодирующих ферменты синтеза глутатиона (Clemens et al., 1999; Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999). В наших опытах в присутствии кадмия у растений ячменя уровень транскриптов гена *HvPCS* увеличивался как у более устойчивых к металлу 7-дневных проростков, так и у менее устойчивых – 3-дневных. Более того, в корнях 3-дневных проростков он оказался почти в 2 раза выше, чем

у 7-дневных (рис. 6 А). При этом содержание ФХ, наоборот, оказалось в 1.5 раза выше в корне более устойчивых растений (рис. 6 Б).

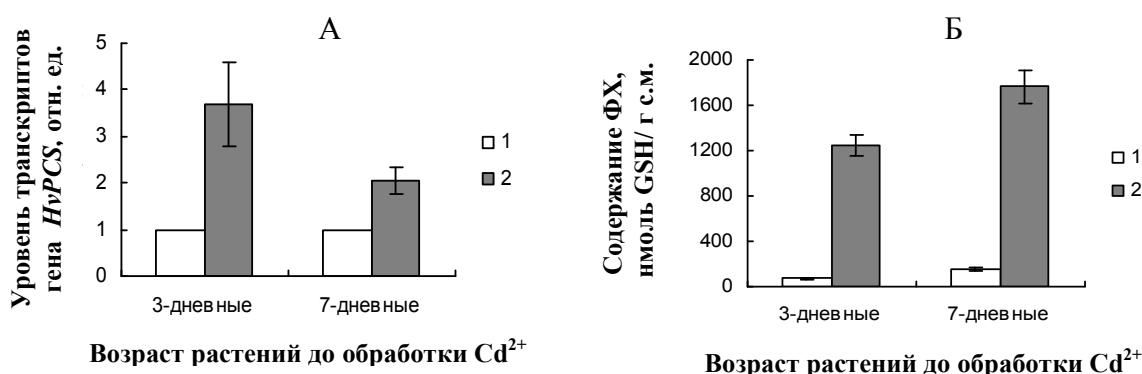


Рис. 6. Уровень транскриптов гена *HvPCS* (А) и содержание ФХ (Б) в корнях растений ячменя (с. Зазерский 85) разного возраста после 4-суточной экспозиции на растворе с Cd^{2+} (100 мкМ). 1 – контроль; 2 – опыт.

Полученный результат, очевидно, можно объяснить тем, что синтез фермента PCS ингибируется высокими концентрациями ФХ в клетке (Loeffler et al., 1989), поэтому более низкий уровень экспрессии гена в корне 7-дневных проростков мог быть связан с большим количеством ФХ в их клетках. В листьях содержание ФХ также возрастало, однако их количество оказалось почти в 2 раза ниже, чем в корнях.

Помимо GSH и ФХ в связывании кадмия в цитоплазме клеток определенную роль играют МТ (Zenk, 1996). Роль этих белков в растительных клетках еще довольно слабо изучена. Тем не менее, обнаружено, что увеличение экспрессии генов МТ и количества этих белков в клетках может способствовать повышению устойчивости растений к тяжелым металлам. В наших исследованиях количество матриц генов, ответственных за синтез МТ 1-го и 2-го типов, увеличивалось только у 7-дневных проростков ячменя.

Необходимо отметить, что до сих пор спорным остается вопрос о существовании прямой зависимости между количеством хелаторов в клетке и металлоустойчивостью растений. Полученные нами данные доказывают справедливость утверждения (Cobbett, 2000; Clemens, 2006; Wawrzyński et al., 2006 и др.), согласно которому более устойчивые к кадмию растения имеют более высокое содержание хелаторов (в частности, GSH, ФХ и МТ) в клетках по сравнению с менее устойчивыми.

4.2. Участие генов, контролирующих синтез трансмембранных белков, и генов субъединиц вакуолярной H^+ -АТФазы в механизмах устойчивости растений ячменя к кадмию

Еще одним важным механизмом, способствующим повышению устойчивости растений к кадмию, является изоляция ионов металла и его комплексов в вакуолях клеток. Как показано в ряде исследований, ионы тяжелых металлов могут транспортироваться в вакуоль через вакуолярную мембрану как в свободном виде, так и в связанном с GSH или ФХ с участием целого ряда белков-переносчиков. Однако вопрос относительно возможного участия некоторых из известных на сегодняшний день транспортных белков и соответствующих им генов в механизмах устойчивости растений к тяжелым металлам до сих пор остается открытым.

Нами изучено влияние кадмия на уровень транскриптов генов белка НМА3 (*heavy metal ATase 3*), относящегося к P_{1B} -типу АТФаз, и белка САХ2 (*cation/proton exchanger 2*), функционирующего как антипортер, у растений ячменя разного возраста. Проведенные нами исследования показали, что у 3-дневных проростков количество матриц гена *HvHMA3* заметно увеличивалось в корне, тогда как у 7-дневных проростков – в листе (рис. 7 А). В отличие от этого, уровень транскриптов гена *HvCAH2* возрастал независимо от

возраста растений, однако в бóльшей степени – в корнях 3-дневных и в листьях 7-дневных проростков (рис. 7 Б).

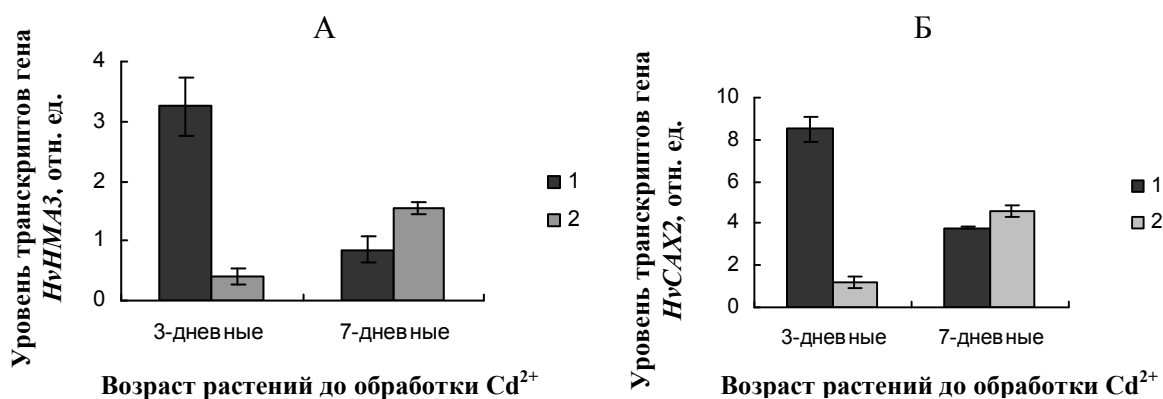


Рис. 7. Уровень транскриптов генов *HvHMA3* (А) и *HvSAX2* (Б) в корнях (1) и листьях (2) растений ячменя (с. Зазерский 85) разного возраста после 4-суточной экспозиции на растворе с Cd^{2+} (100мкМ). Уровень транскриптов гена у растений контрольного варианта принят за единицу.

Известно, что работу антипортеров, в том числе САХ-белков, обеспечивают водородные помпы тонопласта: вакуолярная H^+ -АТФаза и пирофосфатаза (Maeshima, 2001). При этом выявлено, что повышение экспрессии генов даже нескольких субъединиц вакуолярной H^+ -АТФазы сопровождается увеличением активности фермента (Golldack, Dietz, 2001), что, в свою очередь, способствует усилению транспорта ионов и нейтральных молекул в вакуоль (Kluge et al., 2003). На основании этого было высказано предположение о возможном участии вакуолярной H^+ -АТФазы в металлоустойчивости растений, связанной с более активной изоляцией токсичных ионов в вакуоли (Dietz et al., 2001). Однако экспериментальных данных, подтверждающих это, крайне мало.

Нами было изучено влияние кадмия на экспрессию генов двух субъединиц вакуолярной H^+ -АТФазы (Е и с), различающихся по местоположению и функциям. Исследования показали, что после 4-суточной экспозиции на растворе с кадмием количество транскриптов гена *HvVHA-E* в корнях растений ячменя возрастало (рис. 8 А). Однако если у 7-дневных проростков оно превышало контроль в 5.5 раз, то у 3-дневных – лишь в 2.5 раза. В листьях количество матриц этого гена увеличивалось только у более устойчивых к металлу растений. Уровень транскриптов гена *HvVHA-c* также возрастал только у 7-дневных проростков (рис. 8 Б).

Таким образом, проведенные исследования показали, что между растениями разного возраста существуют заметные различия (как количественного, так и качественного характера) в активности некоторых действующих в клетках механизмов детоксикации кадмия. При этом более высокая устойчивость к металлу 7-дневных проростков связана с активацией экспрессии генов белков, участвующих в синтезе хелаторов металла, и с синтезом их молекул, что способствует связыванию ионов тяжелых металлов в цитоплазме, а также с увеличением уровня транскриптов генов транспортных белков, в том числе антипортера САХ2 и субъединиц вакуолярной H^+ -АТФазы, обеспечивающих лучший транспорт ионов кадмия и, возможно, его комплексов в вакуоль, причем как в корнях, так и в листьях растений.

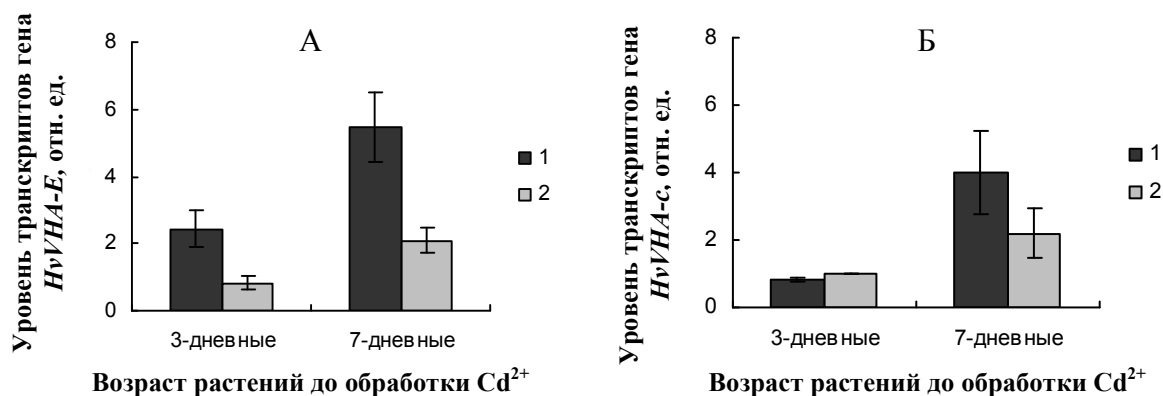


Рис. 8. Уровень транскриптов генов *HvVHA-E* (А) и *HvVHA-c* (Б) в корнях (1) и листьях (2) растений ячменя (с. Зазерский 85) разного возраста после 4-суточной экспозиции на растворе с Cd^{2+} (100мкМ). Уровень транскриптов гена у растений контрольного варианта принят за единицу.

Полученные результаты позволяют с большой долей уверенности говорить об участии генов транспортных белков НМА3 и САХ2, а также генов субъединиц вакуолярной H^+ -АТФазы (Е и с) в механизмах устойчивости растений ячменя к кадмию.

4.3. Интенсивность перекисного окисления липидов и активность антиоксидантных ферментов у растений ячменя при действии кадмия

Как показывают многочисленные исследования, тяжелые металлы в большинстве случаев вызывают в клетках растений окислительный стресс, который является причиной изменения интенсивности ПОЛ (Dixit et al., 2001; Guo et al., 2004; Nouairi et al., 2009; Amirjani, 2012 и др.). При этом интенсивность ПОЛ может служить надежным маркером для определения устойчивости растений к тяжелым металлам. В этой связи нами проведено изучение влияния кадмия на интенсивность ПОЛ в клетках корня и листа растений ячменя разного возраста. В результате исследований нами не было обнаружено ингибирующего действия металла на интенсивность ПОЛ у растений ячменя ни в одном из вариантов опыта, что свидетельствует об отсутствии нарушений клеточных мембран в этих условиях. При этом как у 3-х, так и у 7-дневных проростков увеличивалась активность изученных нами антиоксидантных ферментов, причем практически в равной степени у проростков разного возраста (табл. 6).

Таблица 6

Влияние кадмия на активность антиоксидантных ферментов у проростков ячменя с. Зазерский 85 разного возраста после 4-суточной экспозиции на растворе с металлом (100 мкМ)

Фермент	Возраст растений до обработки Cd^{2+}			
	3-дневные растения		7-дневные растения	
	контроль	Cd^{2+}	контроль	Cd^{2+}
Корень				
СОД	7.70 ± 0.41	10.20 ± 0.73*	5.33 ± 0.39	8.85 ± 0.51*
КАТ	4.40 ± 0.51	8.70 ± 0.70*	5.90 ± 0.80	17.61 ± 2.30*
ПО	20.91 ± 1.30	27.52 ± 2.21*	16.31 ± 2.29	29.10 ± 1.81*
Лист				
СОД	1.59 ± 0.16	4.33 ± 0.18*	1.50 ± 0.09	3.68 ± 0.22*
КАТ	18.20 ± 1.10	17.30 ± 1.20	20.70 ± 3.20	26.30 ± 2.60
ПО	0.46 ± 0.03	5.27 ± 0.62*	0.35 ± 0.03	3.23 ± 0.12*

Активность ферментов: СОД – в у.е. активности/мг белка, КАТ и ПО – в мкмоль/мг белка · мин.

* – различия с контролем достоверны при $P \leq 0.05$.

В целом результаты исследования показали, что эффективная работа компонентов антиоксидантной системы, в частности, увеличение активности антиоксидантных ферментов, а у 7-дневных проростков еще и повышение уровня GSH, позволяет растениям ячменя избежать окислительного стресса, вызванного действием кадмия.

Глава 5. Физиолого-биохимические и молекулярные механизмы устойчивости дикорастущих злаков к тяжелым металлам

Отрицательное влияние тяжелых металлов на рост и развитие растений отражается на продуктивности не только отдельных видов, но и целых фитоценозов, что, в конечном счете, может привести к деградации растительных сообществ (Добровольский, 1992; Жиров и др., 2007; Алексеев, 2008). В этой связи в настоящее время возрастает актуальность изучения устойчивых к тяжелым металлам видов дикорастущей флоры. Такого рода исследования представляют как большой научный интерес с точки зрения лучшего понимания механизмов металлоустойчивости растений, так и определенную практическую значимость в связи с возможным использованием дикорастущих видов в рекультивации загрязненных тяжелыми металлами земель. Ранее было обнаружено, что некоторые дикорастущие злаки способны расти и развиваться на территориях с довольно высоким уровнем загрязнения этими элементами (Atabaeva, Sarsenbayev, 2004; Безель, Жуйкова, 2007; Прасад, 2009). Однако механизмы их устойчивости к тяжелым металлам практически не изучены. В этой связи нами была поставлена задача: выявить некоторые физиолого-биохимические и молекулярные механизмы металлоустойчивости, функционирующие у ряда дикорастущих злаков, произрастающих на территории РК.

5.1. Прорастание семян дикорастущих злаков в присутствии тяжелых металлов

Хорошая всхожесть семян дикорастущих видов растений при высоких концентрациях тяжелых металлов в почве не только рассматривается как один из важных показателей их металлоустойчивости, но и является необходимым условием возможного использования вида в фиторемедиации загрязненных этими химическими элементами территорий. Нами изучено влияние кадмия, свинца и цинка на всхожесть семян пяти видов дикорастущих злаков *Agrostis gigantea*, *Bromopsis inermis*, *Dactylis glomerata*, *Elytrigia repens*, *Phleum pratense* и *Setaria viridis*.

Результаты исследования показали, что семена указанных видов прорастают в широком (10^{-5} – 10^{-3} М) диапазоне концентраций тяжелых металлов. Более того, в относительно низких концентрациях (10^{-5} М) металлы даже стимулируют процесс прорастания у некоторых из них.

*5.2. Влияние тяжелых металлов на основные физиологические процессы у дикорастущих однолетних злаков (на примере *Setaria viridis*)*

К настоящему времени сведений об устойчивости к тяжелым металлам дикорастущих однолетних злаков крайне мало, хотя они представляют определенный практический интерес, связанный с возможным использованием этих видов в фиторемедиации (а именно, в фитоэкстракции) загрязненных тяжелыми металлами почв, поскольку они имеют довольно быстрые темпы роста и относительно большую биомассу. Выбор в качестве объекта наших исследований *Setaria viridis* обусловлен тем, что этот вид, относящийся к C₄-растениям, устойчив к различного рода стрессовым воздействиям, в том числе к высокому уровню загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами (Атабаева, 2007; Shu et al., 2005; Zhaj, Duo, 2015). Помимо этого, по последним литературным данным, *Setaria viridis* является перспективным модельным объектом для изучения молекулярно-генетических механизмов устойчивости C₄-растений к абиотическим стрессорам, что связано с малым размером его генома (Brutnell et al., 2010; Li, Brutnell, 2011).

В результате исследований обнаружено, что устойчивость *Setaria viridis* к кадмию и цинку, в целом, обеспечивается сходными с культурными видами злаков механизмами адаптации. Среди них: поддержание активного роста побега при значительном замедлении роста корня, сохранение размеров листовой пластинки на уровне контроля даже при использовании довольно высоких концентраций металлов. Помимо этого нами выявлено, что в присутствии кадмия, как наиболее токсичного металла, у *Setaria viridis* уменьшались размеры устьичной щели, снижалась устьичная проводимость и замедлялась интенсивность транспирации (табл. 7). Однако уровень оводненности тканей оставался высоким, что позволяет рассматривать выявленные изменения водного режима растений как адаптивные.

Таблица 7

Влияние кадмия (40 мг/кг субстрата) на показатели водного обмена растений *Setaria viridis*

Показатель	Контроль	Cd ²⁺
Площадь устьичной щели, мкм ²	248.5 ± 4.4	185.8 ± 7.4*
Интенсивность транспирации, ммоль/(м ² ·с)	0.64 ± 0.04	0.48 ± 0.04*
Устьичная проводимость, ммоль/(м ² ·с)	30.2 ± 1.59	18.7 ± 1.26*
Оводненность тканей корня, %	92.9 ± 0.8	93.0 ± 0.4
Оводненность тканей побега, %	95.3 ± 0.1	95.5 ± 0.3

* – различия с контролем достоверны при P ≤ 0.05.

Обычно уменьшение размеров устьиц и устьичной щели в неблагоприятных условиях среды негативно отражается на фотосинтезе. Однако в наших опытах у растений *Setaria viridis* изменений интенсивности этого процесса в присутствии кадмия не наблюдалось (табл. 8). Обнаруженный эффект, очевидно, связан, в определенной степени, с особой крапчатой структурой листа, характерной для C₄-растений, которая позволяет сохранять высокую скорость фотосинтеза даже при закрытых устьицах, а также, судя по нашим данным, с возрастанием числа хлоропластов на единицу площади клетки, с сохранением концентрации каротиноидов и активности ФС II на уровне контрольных растений.

Таблица 8

Влияние кадмия (40 мг/кг субстрата) на ФСА растений *Setaria viridis*

Показатель	Контроль	Cd ²⁺
Число хлоропластов на единицу площади клетки, шт.	20.0 ± 0.5	25.0 ± 0.7*
Содержание хлорофиллов (a+b), мг/г сырой массы	1.099 ± 0.083	0.908 ± 0.038*
Содержание каротиноидов, мг/г сырой массы	0.407 ± 0.031	0.392 ± 0.009
F _v /F _m	0.712 ± 0.005	0.728 ± 0.003
Yield	0.207 ± 0.009	0.220 ± 0.019
Интенсивность фотосинтеза, мкмоль/(м ² ·с)	33.70 ± 0.62	32.69 ± 0.93

* – различия с контролем достоверны при P ≤ 0.05.

Эффективное функционирование у *Setaria viridis* целого ряда механизмов металлоустойчивости на более ранних фазах развития растений позволило им в дальнейшем перейти к генеративному развитию и сформировать соцветие. При этом некоторое обнаруженное в присутствии кадмия и цинка уменьшение размеров и биомассы соцветия главного побега

компенсировалось, в отличие от культурных видов злаков, увеличением количества боковых побегов, что, очевидно, направлено на сохранение общей семенной продуктивности растений в неблагоприятных условиях, а также способствует увеличению их надземной биомассы (табл. 9).

Таблица 9

Влияние тяжелых металлов на элементы семенной продуктивности у растений *Setaria viridis*

Концентрация ТМ, мг/кг субстрата	Элементы семенной продуктивности		
	длина соцветия главного побега, см	биомасса соцветия главного побега, г	число генеративных побегов, шт./растение
	Кадмий		
0	8.76 ± 0.21	0.94 ± 0.03	1.25 ± 0.16
10	8.93 ± 0.25	0.94 ± 0.05	1.35 ± 0.13
20	8.47 ± 0.26	0.68 ± 0.04*	1.55 ± 0.13
40	8.31 ± 0.17	0.53 ± 0.02*	1.82 ± 0.24*
80	6.53 ± 0.38*	0.35 ± 0.04*	2.60 ± 0.27*
	Цинк		
0	8.74 ± 0.40	1.08 ± 0.03	1.75 ± 0.18
40	8.58 ± 0.22	1.02 ± 0.02	2.25 ± 0.25
80	7.68 ± 0.18	0.95 ± 0.04*	2.30 ± 0.25*
160	7.58 ± 0.22	0.80 ± 0.03*	2.85 ± 0.35*
320	4.10 ± 0.25*	0.78 ± 0.04*	2.72 ± 0.40*

* – различия с контролем достоверны при $P \leq 0.05$.

Известно, что для успешного использования того или иного вида растений в фиторемедиации загрязненных тяжелыми металлами почв необходимо также учитывать их способность к накоплению ионов металлов в органах. Анализ содержания кадмия и цинка в корнях и побегах *Setaria viridis* выявил, что растения накапливают довольно большие их количества не только в корнях, но и в побегах. В частности, в присутствии наиболее высоких концентраций тяжелых металлов в корнеобитаемой среде содержание кадмия в корне достигало 448 ± 53 мг/кг сухого веса, в побеге – 69 ± 26 мг/кг сухого веса, содержание цинка – 1270 ± 203 и 473 ± 76 мг/кг сухого веса, соответственно.

5.3. Содержание восстановленного глутатиона и фитохелатинов в корнях и листьях растений *Setaria viridis* в присутствии кадмия

Как уже указывалось, среди внутриклеточных механизмов детоксикации тяжелых металлов наиболее важным является связывание токсичных ионов в цитоплазме клетки непротеиновыми тиолами. Однако данных о действии этого механизма у дикорастущих злаков в известной нам литературе нет.

В этой связи нами был проведен анализ содержания GSH и ФХ в корнях и листьях *Setaria viridis* при действии кадмия, который выявил значительное (почти в 40 раз по сравнению с контролем) увеличение уровня ФХ в клетках растений, при этом изменений в содержании GSH не наблюдалось. Поскольку ФХ синтезируются из GSH, предполагается, что отсутствие изменений его содержания в условиях повышенных концентраций тяжелых металлов может свидетельствовать о «запуске» синтеза GSH и считаться показателем металлоустойчивости растений.

В целом, проведенные исследования показали, что растения *Setaria viridis* способны произрастать на субстратах с высоким уровнем загрязнения кадмием и цинком, образуя

относительно большую биомассу и накапливая при этом довольно высокие концентрации тяжелых металлов не только в корнях, но и в побегах. Высокой металлоустойчивости растений этого вида способствует целый ряд адаптационных физиолого-биохимических механизмов, а также анатомо-физиологические особенности, связанные с его принадлежностью к группе C₄-растений.

5.4. Влияние тяжелых металлов на основные физиологические процессы у дикорастущих многолетних злаков

Исследование влияния тяжелых металлов на рост и развитие дикорастущих многолетних злаков выявило, что кадмий, свинец и цинк в изученных концентрациях, в основном, оказывают негативное воздействие на накопление биомассы растениями, которая является интегральным показателем, отражающим функционирование всех физиологических процессов. При этом были выявлены некоторые видовые различия. Например, в присутствии кадмия и цинка заметно снижались подземная и надземная биомасса у изученных видов злаков, за исключением *Elytrigia repens*. В присутствии свинца у *Agrostis gigantea* и *Elytrigia repens* в большей степени уменьшалась биомасса корня, у *Bromopsis inermis* – биомасса побега, тогда как у *Phleum pratense* изменений (по сравнению с контролем) изученных показателей не было обнаружено. В отличие от биомассы, ингибирование тяжелыми металлами площади листовой пластинки оказалось практически одинаковым у разных видов злаков и гораздо менее выраженным, чем биомасса корня и побега. Изменений в развитии растений отмечено не было.

На основании проведенных исследований нами были составлены ряды изученных дикорастущих многолетних злаков по их устойчивости к тяжелым металлам (табл. 10), которые показывают, что наиболее устойчивым к кадмию и цинку является *Elytrigia repens*, а к свинцу – *Phleum pratense*. В этой связи дальнейшие исследования по изучению влияния тяжелых металлов на ФСА и водный режим растений проведено с использованием этих двух видов.

Таблица 10

Сравнительная устойчивость дикорастущих многолетних злаков к тяжелым металлам

ТМ	Виды злаков
Cd ²⁺	<i>Elytrigia repens</i> > <i>Agrostis gigantea</i> > <i>Bromopsis inermis</i> > <i>Phleum pratense</i>
Pb ²⁺	<i>Phleum pratense</i> > <i>Bromopsis inermis</i> > <i>Elytrigia repens</i> > <i>Agrostis gigantea</i>
Zn ²⁺	<i>Elytrigia repens</i> > <i>Bromopsis inermis</i> > <i>Phleum pratense</i> > <i>Agrostis gigantea</i>

При изучении влияния тяжелых металлов на фотосинтез дикорастущих злаков были обнаружены сходные с однолетними видами ответные реакции растений. Так, в присутствии кадмия, свинца и цинка в листьях уменьшалось общее содержание хлорофиллов, а также их количество в ССК (табл. 11). Вместе с тем содержание каротиноидов, а также параметры, характеризующие активность ФС II (*Fv/Fm* и *Yield*), не изменялись, что, отчасти, способствовало поддержанию скорости фотосинтеза злаков на уровне контрольных растений.

Таблица 11

Влияние тяжелых металлов на ФСА дикорастущих многолетних злаков

Вариант	Содержание хл-ов ($a+b$), мг/Г с.м.	Кол-во хл-ов в ССК, мг/Г с.м.	Содержание каротиноидов, мг/Г с.м.	Fv/Fm	ИФ
<i>Elytrigia repens</i>					
Контроль	2.129±0.047	1.404±0.008	0.621±0.042	0.748±0.011	26.7±1.4
Cd ²⁺	1.818±0.018*	1.118±0.006*	0.608±0.035	0.742±0.048	24.4±0.9
Pb ²⁺	1.652±0.026*	1.397±0.005*	0.613±0.027	0.768±0.008	26.8±1.3
Zn ²⁺	1.567±0.018*	1.401±0.006	0.598±0.032	0.764±0.009	25.5±0.4
<i>Phleum pratense</i>					
Контроль	1.911±0.090	1.402±0.011	0.574±0.050	0.775±0.013	26.2±1.5
Cd ²⁺	1.348±0.028*	0.717±0.005*	0.581±0.013	0.780±0.022	26.5±0.6
Pb ²⁺	1.482±0.006*	0.849±0.003*	0.594±0.024	0.756±0.020	24.9±0.9
Zn ²⁺	1.440±0.011*	0.799±0.005*	0.564±0.012	0.785±0.005	22.3±1.2*

ИФ – интенсивность фотосинтеза, мкмоль/(м²·с). * – различия с контролем достоверны при P≤0.05. Концентрация кадмия в субстрате 40 мг/кг, свинца – 400 мг/кг, цинка – 160 мг/кг субстрата.

Заметные различия в ответной реакции на действие тяжелых металлов многолетних злаков от однолетних были обнаружены нами при изучении показателей водного обмена растений. В частности, у растений *Elytrigia repens* в присутствии кадмия, свинца и цинка, а у *Phleum pratense* – в присутствии кадмия скорость транспирации и устьичная проводимость возрастали по сравнению с контролем (табл. 12). При этом у опытных растений *E. repens* увеличивалась площадь устьичной щели, а у *P. pratense* – число устьиц.

Таблица 12

Влияние тяжелых металлов на показатели водного обмена у дикорастущих многолетних злаков

Вариант опыта	Кол-во устьиц, шт./мм ²	Площадь устьичной щели, мкм ²	Устьичная проводимость, ммоль/(м ² ·с)	Интенсивность транспирации, ммоль/(м ² ·с)
<i>Elytrigia repens</i>				
Контроль	176.1 ± 4.4	82.8 ± 3.6	77.6 ± 7.4	1.55 ± 0.13
Cd ²⁺	81.0 ± 4.1*	125.5 ± 5.8*	114.7 ± 5.5*	2.46 ± 0.15*
Pb ²⁺	103.5 ± 5.1*	93.2 ± 3.1*	163.1 ± 4.9*	2.90 ± 0.12*
Zn ²⁺	163.9 ± 2.8*	94.8 ± 4.7*	130.2 ± 11.9*	2.25 ± 0.30*
<i>Phleum pratense</i>				
Контроль	121.8 ± 5.1	185.8 ± 7.6	53.4 ± 5.2	1.60 ± 0.15
Cd ²⁺	228.6 ± 9.2*	183.6 ± 5.8	142.0 ± 0.2*	3.57 ± 0.23*
Pb ²⁺	130.1 ± 4.2	179.3 ± 5.8	72.3 ± 9.1	2.00 ± 0.24
Zn ²⁺	122.0 ± 3.3	167.7 ± 4.9	64.2 ± 4.4	1.93 ± 0.21

* – различия с контролем достоверны при P≤0.05. Концентрация кадмия в субстрате 40 мг/кг, свинца – 400 мг/кг, цинка – 160 мг/кг субстрата.

Полагают, что повышение скорости транспирации при замедлении роста корня в неблагоприятных условиях среды может быть связано с увеличением гидравлической проводимости корней, что является адаптивной реакцией растений, направленной на сохра-

нение оводненности тканей (Кудоярова и др., 2001). В ходе наших исследований также не было обнаружено отрицательного воздействия тяжелых металлов на оводненность тканей корня и побега многолетних злаков. И поскольку степень оводненности тканей влияет на многие стороны жизнедеятельности растений, отсутствие изменений этого показателя свидетельствует о сбалансированной работе физиологических процессов у злаков в условиях повышенных концентраций тяжелых металлов в субстрате.

5.5. Содержание восстановленного глутатиона и фитохелатинов в корнях и листьях дикорастущих многолетних злаков в присутствии кадмия

Как показали наши исследования, устойчивость многолетних злаков к тяжелым металлам обеспечивается функционированием внутриклеточных механизмов детоксикации, в частности, связыванием их ионов хелаторами. Так, в присутствии кадмия в корнях и листьях злаков активировался синтез ФХ (рис. 9).

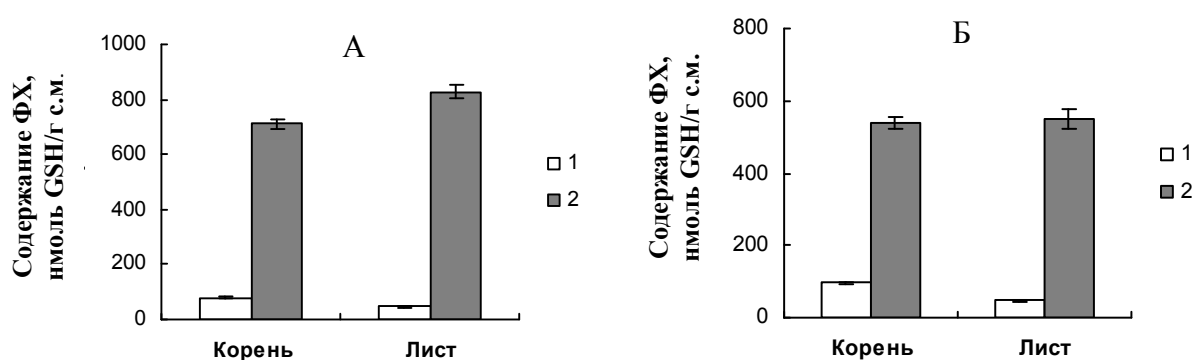


Рис. 9. Содержание фитохелатинов в корнях и листьях растений *Elytrigia repens* (А) и *Phleum pratense* (Б) спустя 60 сут воздействия кадмия (40 мг/кг субстрата). 1 – контроль; 2 – опыт.

При этом содержание GSH у *Elytrigia repens* не изменялось, а у *Phleum pratense* несколько повышалось, что характерно для устойчивых к тяжелым металлам видам растений. Необходимо также подчеркнуть, что количество ФХ у злаков было высоким даже спустя 60 сут после посева.

5.6. Интенсивность перекисного окисления липидов и активность антиоксидантных ферментов в корнях и листьях дикорастущих многолетних злаков при действии тяжелых металлов

К настоящему времени накоплено довольно большое количество сведений, касающихся влияния тяжелых металлов на интенсивность ПОЛ и содержание в клетках антиоксидантных молекул, а также участия отдельных компонентов антиоксидантной системы в механизмах устойчивости растений к тяжелым металлам. Однако в отношении дикорастущих видов злаков такие данные единичны.

Нами проведено изучение влияния кадмия, свинца и цинка на содержание МДА и активность антиоксидантных ферментов в корнях и листьях *Elytrigia repens*. В ходе исследований не было обнаружено негативного действия тяжелых металлов на интенсивность ПОЛ (табл. 13). Наоборот, отмечалось некоторое уменьшение содержания МДА у опытных растений по сравнению с контрольными. При этом в корне заметно увеличивалась активность всех изученных антиоксидантных ферментов, а в листе – активность ПО.

Содержание МДА и активность антиоксидантных ферментов
в корнях и листьях *Elytrigia repens* в присутствии тяжелых металлов

Вариант	Содержание МДА, мкмоль/г с.м.	Активность антиоксидантных ферментов		
		СОД, у.е. ак- тивности/ мг белка	КАТ, мкмоль/мг белка·мин	ПО, мкмоль/мг бел- ка·мин
Корень				
Контроль	8.1 ± 0.5	4.2 ± 2.1	18.1 ± 0.9	12.7 ± 0.4
Cd ²⁺	5.9 ± 0.4*	12.3 ± 1.1*	47.4 ± 1.3*	25.5 ± 2.5*
Pb ²⁺	3.2 ± 0.1*	27.8 ± 3.6*	97.0 ± 9.5*	34.0 ± 1.1*
Zn ²⁺	3.9 ± 0.3*	8.3 ± 7.8*	71.8 ± 3.5*	13.7 ± 0.4*
Лист				
Контроль	13.3 ± 0.5	2.0 ± 1.2	21.1 ± 2.4	1.19 ± 0.03
Cd ²⁺	10.4 ± 0.2*	1.7 ± 0.3	24.0 ± 1.7	4.33 ± 0.48*
Pb ²⁺	10.1 ± 0.5*	1.1 ± 0.5	19.5 ± 0.6	4.18 ± 0.08*
Zn ²⁺	9.8 ± 0.2*	2.9 ± 0.5	18.0 ± 1.9	2.37 ± 0.10*

* – различия с контролем достоверны при $P \leq 0.05$. Концентрация кадмия в субстрате 40 мг/кг, свинца – 400 мг/кг, цинка – 160 мг/кг субстрата.

Для объективной оценки устойчивости растений к тяжелым металлам, а также для выявления видов, пригодных для фиторемедиации загрязненных ими почв, чрезвычайно важно знать количество этих элементов в подземных и надземных органах. В этой связи нами был проведен химический анализ содержания кадмия, свинца и цинка в корнях и листьях многолетних злаков. Результаты анализа выявили, что оба вида накапливают значительные количества тяжелых металлов в корнях, тогда как в побегах их концентрация гораздо меньше, что характерно для растений-исключателей. В частности, в присутствии кадмия (40 мг/кг субстрата) содержание металла в корне *Elytrigia repens* составляло 116.2 ± 5.0 мкг/г с.м. у *Phleum pratense* – 128.3 ± 14.8 мкг/г с.м. В присутствии свинца (400 мг/кг субстрата) эти цифры составили 173.9 ± 4.5 и 95.4 ± 15.5 мкг/г с.м., а в присутствии цинка (160 мг/кг субстрата) – 184.7 ± 24.0 и 264.0 ± 42.1 мкг/г с.м. При этом содержание тяжелых металлов в корнях растений контрольных вариантов не превышало 0.4 мкг/г с.м. для кадмия и свинца и 8 мкг/г с.м. – для цинка.

Таким образом, совокупность проведенных исследований дает основание сделать вывод о высокой устойчивости дикорастущих видов злаков к тяжелым металлам, которая обеспечивается целым рядом физиолого-биохимических механизмов, позволяющих растениям в условиях их повышенных концентраций в корнеобитаемой среде поддерживать в течение длительного времени нормальный рост и развитие, сохранять высокий уровень фотосинтеза и стабильность водного режима. При этом некоторые адаптационные механизмы у изученных видов злаков сходны, а некоторые – различаются. К сходным механизмам устойчивости можно отнести: высокую всхожесть семян, поддержание активного роста листьев при замедлении роста корня, сохранение необходимой концентрации каротиноидов и активности ФС II, а также синтез ФХ и GSH. Среди специфических механизмов, характерных для отдельных видов растений: усиление или замедление побегообразования, увеличение или уменьшение количества устьиц и размеров устьичной щели, поддержание высокого уровня оводненности тканей за счет уменьшения интенсивности транспирации или увеличения гидравлической проводимости корня.

Помимо этого, многолетние злаки оказались способными накапливать значительные количества тяжелых металлов в корнях, а *Setaria viridis* – еще и в надземных органах. Полученные данные позволяют говорить о возможности использования изученных видов ди-

корастущих злаков в фиторемедиации загрязненных тяжелыми металлами почв. При этом *Elytrigia repens* и *Phleum pratense* предпочтительно использовать в фитостабилизации, а *Setaria viridis* – в фитоэкстракции.

Глава 6. Устойчивость дикорастущих злаков к техногенному загрязнению почв тяжелыми металлами в условиях таежной зоны

Для того, чтобы выяснить как обнаруженные нами в лабораторных и вегетационных условиях механизмы устойчивости злаков к тяжелым металлам реализуют себя на уровне сообществ, нами проведены полевые исследования, задачей которых явилось изучение роли и состояния многолетних злаков в травянистых сообществах, сформированных на техногенно загрязненных этими химическими элементами почвах вблизи промышленных предприятий в условиях таежной зоны.

К настоящему времени имеется целый ряд публикаций, в которых рассматривается влияние промышленного загрязнения окружающей среды на древесную растительность, в том числе в Республике Карелия (РК) (Федорец и др., 1997; Гужилкина и др., 1998; Ярмишко, 2005; Костюк и др., 2009; Сазонова и др., 2011; Марковская и др., 2015). Что касается травянистой растительности, то исследований такого рода относительно немного, а в РК они вообще единичны.

В контексте данной работы представлялось важным изучение устойчивости к техногенному загрязнению почвы тяжелыми металлами дикорастущих представителей семейства *Poaceae*. Исследования, проведенные вблизи наиболее крупных промышленных предприятий РК – Кондопожского ЦБК и Костомукшского ГОКа, – выявили в почвах изученных участков повышенное содержание никеля, меди и свинца по сравнению со средним уровнем, определенным для типов почв, характерных для указанных районов Карелии (Федорец и др., 2008), а в районе Костомукшского ГОКа – еще и железа, кобальта и хрома. При этом содержание металлов в почве возрастает по мере приближения к предприятиям, достигая наибольших значений на участках, расположенных в 0.5 км от источника загрязнения.

6.1. Ценотическая роль злаков в травянистых сообществах, сформировавшихся на техногенно загрязненных тяжелыми металлами территориях

Известно, что отрицательное влияние техногенной нагрузки на растительные сообщества проявляется, прежде всего, в изменении их структуры и видового состава (Опекунова, 2013). При этом при усилении техногенного загрязнения изменяется ценотическая роль видов: она возрастает у более устойчивых из них и уменьшается – у менее устойчивых.

Проведенный нами анализ видового состава изученных территорий выявил, что в районе Кондопожского ЦБК общее количество видов в сообществах, расположенных на разных по удаленности от предприятия участках, практически не различается. Так, в 8 км от комбината было обнаружено 29-33 вида травянистых растений, в 4 км – 23-29 видов и 0.5 км – 31-32 вида. На всех участках проективное покрытие злаков (главным образом, *Dactylis glomerata*, *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv. и *Phleum pratense*) было высоким. При приближении к предприятию увеличивалось также проективное покрытие *Elytrigia repens* и *Calamagrostis epigeios* (L.) Roth. Вместе с тем доля видов из других семейств (например, *Trifolium repens* (L.) C. Presl. (сем. *Fabaceae*) или *Angelica sylvestris* L. и *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. (сем. *Apiaceae*)) заметно снижалась.

В районе Костомукшского ГОКа число видов травянистых растений на участках зависело от их местоположения. В частности, в 8 км от предприятия было обнаружено 21-26 видов, на участках, удаленных от него на 4 км – 20-28 видов, а в непосредственной близости от предприятия – 14-16 видов. Тем не менее, проективное покрытие представи-

телей семейства *Poaceae*, таких как *Phleum pratense* и *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv., было высоким на всех изученных участках, а проективное покрытие *Calamagrostis epigeios* и *Poa pratense* увеличивалось при приближении к предприятию.

В целом, проведенные исследования выявили важную ценогическую роль многолетних злаков в сообществах, сформированных на техногенно загрязненных тяжелыми металлами территориях вблизи крупных промышленных предприятий РК. При этом, с повышением степени загрязнения участков проективное покрытие злаков увеличивается, что свидетельствует об устойчивости представителей этого семейства к загрязнению почв тяжелыми металлами. Доминирующими видами в фитоценозах, расположенных вблизи Кондопожского ЦБК и Костомукшского ГОКа, являются *Dactylis glomerata* и *Phleum pratense*, соответственно.

6.2. Влияние техногенного загрязнения почв тяжелыми металлами на морфо-физиологические показатели дикорастущих злаков, произрастающих вблизи промышленных предприятий

Показано, что о степени техногенной нагрузки на территории, расположенные вблизи промышленных предприятий, можно судить по состоянию произрастающей там растительности и/или отдельных видов растений. К основным видимым изменениям у растений, произрастающих на таких участках, можно отнести: количественные изменения их морфофизиологических признаков, появления различных деформаций органов, общее снижение продуктивности, изменение окраски листьев в результате хлороза, некроза и других причин, замедление или ускорение развития и т.д. При этом наиболее заметно эти изменения проявляются у чувствительных к загрязнению видов растений, тогда как у устойчивых видов видимых признаков может и не наблюдаться.

Изучение морфологических признаков доминирующих на обследованных нами территориях видов злаков – *Dactylis glomerata* и *Phleum pratense* – показало, что имеющаяся вблизи промышленных предприятий техногенная нагрузка не оказывает сильного негативного влияния на рост растений. Тем не менее, при приближении к источнику загрязнения у обоих видов злаков несколько уменьшалась высота побега (табл. 14). Однако площадь листовой пластинки практически не изменялась, а длина соцветия даже увеличивалась, что, отчасти, способствует сохранению семенной продуктивности растений в этих условиях.

Таблица 14

Влияние загрязнения почвы тяжелыми металлами на морфологические признаки генеративного побега растений *Dactylis glomerata* и *Phleum pratense*

Источник загрязнения (ИЗ)	Расстояние от ИЗ, км	Морфологические признаки		
		высота побега, см	площадь листа, см ²	длина соцветия, см
Кондопожский ЦБК		<i>Dactylis glomerata</i>		
	0.5	138.0 ± 2.0	16.3 ± 1.6	14.8 ± 0.6*
	4.0	131.7 ± 3.8	11.1 ± 1.2	11.9 ± 0.4
	8.0	135.2 ± 4.9	12.0 ± 0.5	11.1 ± 0.7
Костомукшский ГОК		<i>Phleum pratense</i>		
	0.5	77.3 ± 3.2*	7.7 ± 0.6*	5.16 ± 0.31*
	4.0	87.6 ± 1.9*	8.8 ± 0.6*	4.73 ± 0.32
	8.0	111.4 ± 3.1	9.9 ± 0.7	4.32 ± 0.30

* – различия по отношению к участкам, расположенным в 8 км от источника загрязнения, достоверны при P ≤ 0.05.

Кроме того, с приближением к источнику загрязнения у злаков увеличивался уровень внутривидовой изменчивости изученных морфологических показателей. Уве-

личение гетерогенности признаков в ответ на возрастание содержания тяжелых металлов в почве, как известно, может рассматриваться в качестве адаптивной реакции, направленной на повышение выживаемости популяции в подобных условиях.

В качестве дополнительных критериев при оценке состояния растений *Dactylis glomerata* и *Phleum pratense* в условиях почвенного загрязнения тяжелыми металлами мы использовали количество зеленых и желтых пигментов в листьях, учитывая, что эти показатели являются весьма чувствительными и информативными в неблагоприятных условиях среды. Результаты исследования показали, что у изученных видов злаков наиболее высокое содержание всех форм пигментов оказалось на участках, расположенных в непосредственной близости от источника загрязнения. Так, у *Dactylis glomerata* вблизи Кондопожского ЦБК содержание хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов в среднем оказалось почти в 1.5 раза выше, чем на наиболее удаленном участке (в 8 км). У *Phleum pratense* в 0.5 км от Костомукшского ГОКа, количество хлорофилла *a* и каротиноидов оказалось примерно в 1.2 раза, а хлорофилла *b* – в 1.4 раза выше, чем на участке, удаленном от предприятия на 8 км.

В целом, сохранение площади листовой пластинки и увеличение количества пигментов у дикорастущих злаков на наиболее загрязненных участках, очевидно, способствует поддержанию необходимого уровня фотосинтеза в условиях повышенных концентраций тяжелых металлов в почве.

6.3. Содержание тяжелых металлов в подземных и надземных органах дикорастущих злаков

Химический анализ растительных образцов показал, что у обоих видов злаков в корнях содержание почти всех изученных тяжелых металлов (за исключением цинка) довольно высокое. При этом, при приближении к источнику загрязнения возрастает концентрация удерживаемых в корнях металлов, тогда как их содержание в побегах практически не изменяется (табл. 15). Это свидетельствует об увеличении барьерной функции корня у растений. Так, на расстоянии 8 км от ЦБК количество тяжелых металлов в корнях *Dactylis glomerata* составляло 45-79% от общего содержания в растениях в зависимости от металла, тогда как на расстоянии 0.5 км – 89-99%. Аналогичный эффект наблюдался и у *Phleum pratense* при приближении к Костомукшскому ГОКу. Исключение составил цинк, который у обоих видов распределялся между подземными и надземными органами примерно поровну (52% и 48% от общего содержания в растении, соответственно) и его содержание в растениях практически не зависело от удаленности участка от источника загрязнения.

Таблица 15

Содержание тяжелых металлов в корнях и побегах растений *Dactylis glomerata* (мкг/г с.м.), произрастающих на участках, расположенных на разном расстоянии от Кондопожского ЦБК

Расстояние от ЦБК, км	Орган	Тяжелые металлы			
		медь	никель	свинец	цинк
0.5	корень	44.8 ± 4.4*	10.2 ± 0.8*	8.9 ± 0.4*	30.7 ± 4.9
	побег	5.7 ± 0.6*	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.01*	26.1 ± 2.6
4.0	корень	35.6 ± 3.4*	4.1 ± 0.3*	2.6 ± 0.3	37.7 ± 6.0
	побег	2.3 ± 0.3	1.3 ± 0.1	0.6 ± 0.01	32.8 ± 2.2
8.0	корень	11.9 ± 1.2	2.8 ± 0.2	2.1 ± 0.02	20.7 ± 3.3
	побег	3.12 ± 0.4	1.0 ± 0.2	0.5 ± 0.01	24.8 ± 4.0

* – различия по сравнению с участками, расположенными в 8 км от предприятия, достоверны при $P \leq 0.05$.

Таким образом, проведенные нами полевые исследования вблизи крупных промышленных предприятий РК подтверждают вывод о высокой устойчивости растений из семейства *Poaceae* к тяжелым металлам, что позволяет злакам играть важную ценотическую роль в сообществах, сформированных на техногенно загрязненных территориях. При этом разные виды злаков, произрастающие в различных природно-климатических условиях (северная и южная Карелия) имеют практически одинаковую ответную реакцию на загрязнение почвы тяжелыми металлами, что позволяет говорить о действии сходных механизмов адаптации. Среди них обнаруженное нами возрастание уровня внутривидовой изменчивости морфологических признаков генеративного побега, что может рассматриваться в качестве адаптивной реакции, направленной на повышение выживаемости ценопопуляций; сохранение роста подфлагового листа даже на наиболее загрязненных участках; увеличение размеров соцветия при приближении к источнику загрязнения, способствующее поддержанию в этих условиях высокого уровня семенной продуктивности; повышение концентрации фотосинтетических пигментов, обеспечивающее активную работу ФСА. Указанные изменения являются, на наш взгляд, адаптивными, направленными на повышение выживаемости злаков в условиях техногенного загрязнения почвы тяжелыми металлами.

Высокая устойчивость злаков к тяжелым металлам, а также их способность к накоплению этих элементов в корнях в относительно больших количествах позволяет говорить о возможном использовании *Dactylis glomerata* и *Phleum pratense* в фитостабилизации почв на территориях, расположенных в непосредственной близости от промышленных предприятий, в условиях таежной зоны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение механизмов устойчивости растительных организмов к повышенному содержанию тяжелых металлов в окружающей среде в настоящее время является чрезвычайно актуальной задачей экологической физиологии растений, о чем, в частности, свидетельствует значительное число публикаций, появившихся в последние годы в отечественных и зарубежных журналах. Исследование в этом плане растений семейства *Poaceae* имеет не только определенный научный интерес, но и большое практическое значение, что связано с хозяйственной ценностью целого ряда видов этого семейства, а также с их важной ценотической ролью в формировании травянистых фитоценозов во многих природно-климатических зонах.

Проведенные нами эксперименты показали, что кадмий, свинец и цинк, которые являются приоритетными загрязнителями окружающей среды среди группы тяжелых металлов, в наиболее высоких из изученных концентраций ингибируют рост и развитие злаков, оказывают отрицательное влияние на фотосинтез и водный режим, уменьшают подземную и надземную биомассу. При этом степень ингибирования тяжелыми металлами физиологических процессов у злаков зависит, в большей степени, от токсичности металла и его концентрации, а также от фазы развития и возраста растений, и в гораздо меньшей степени – от вида растений в пределах данного семейства. Вместе с тем в присутствии изученных нами концентраций кадмия, свинца и цинка указанные изменения не приводят к нарушению согласованности основных метаболических процессов, обеспечивая не только возможность роста растений в этих условиях в течение длительного времени, но и формирование семенного потомства.

Анализ полученных результатов позволил выявить целый ряд физиолого-биохимических и молекулярно-генетических механизмов, действующих на разных уровнях организации, которые способствуют повышению устойчивости растений семейства *Poaceae* к тяжелым металлам (рис. 10). Большинство из этих механизмов функционируют у всех изученных нами злаков, причем независимо от вида металла. Некоторые же механизмы различаются как в зависимости от видовой принадлежности растения, так и от вида металла.

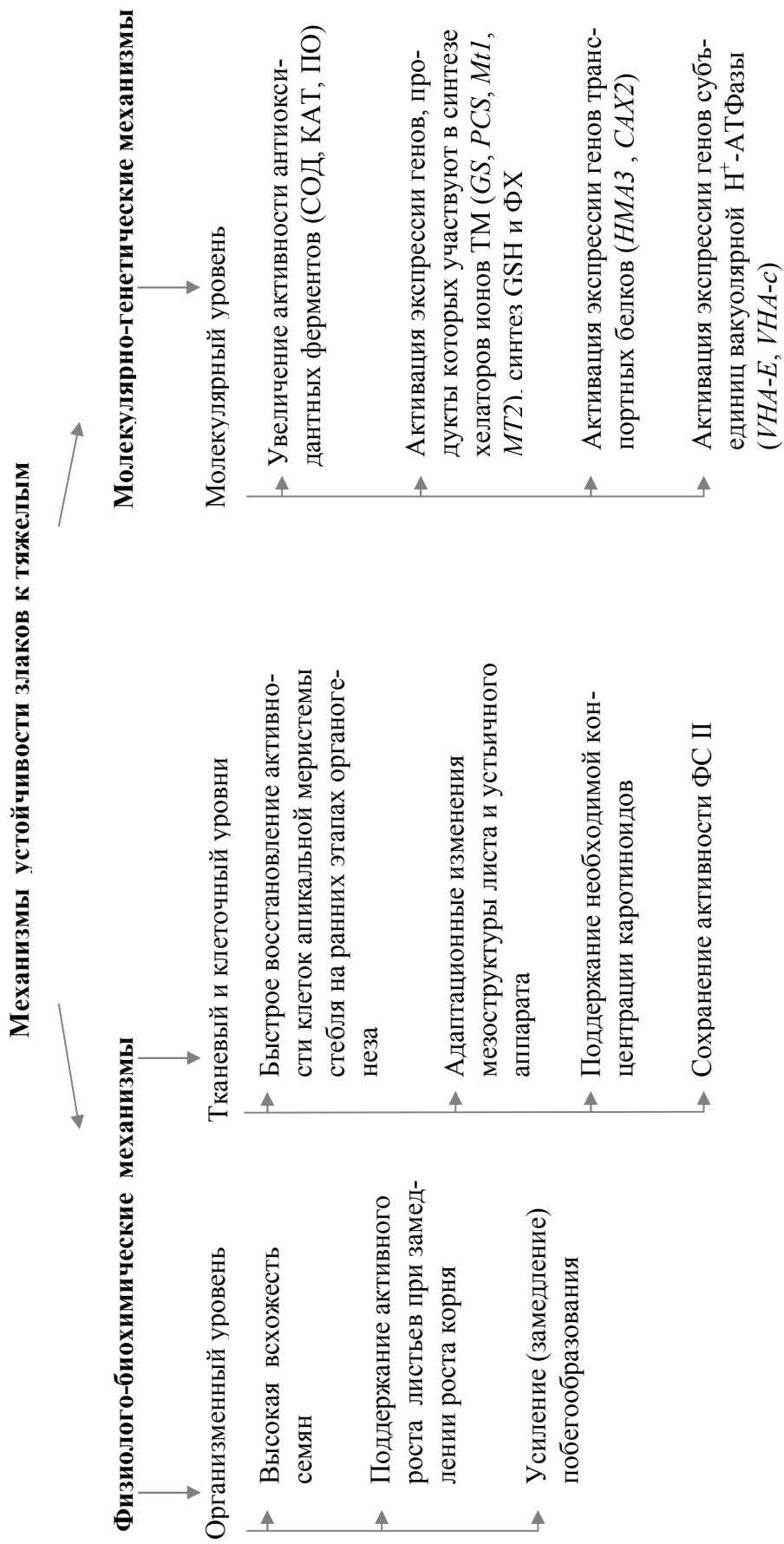


Рис. 10. Механизмы устойчивости злаков к тяжелым металлам

Важная роль в адаптации культурных и дикорастущих представителей семейства *Poaceae* к тяжелым металлам принадлежит физиолого-биохимическим механизмам, действующим на организменном, тканевом и клеточном уровнях. Нами обнаружено, что для всех изученных видов злаков характерна высокая всхожесть семян в присутствии довольно высоких концентраций тяжелых металлов в субстрате, поддержание активного роста листьев при замедлении роста корня, а также усиление или, наоборот, торможение побегообразования.

Поскольку все структурные элементы растения формируются апикальными меристемами, и именно от их функционирования в значительной степени зависит габитус растения и его продуктивность, особое внимание в нашей работе было уделено изучению влияния тяжелых металлов на апикальную меристему стебля у культурных злаков. Учитывая данные отечественных и зарубежных авторов, касающихся ингибирующего действия тяжелых металлов на меристему корня, нами было высказано предположение об их возможном негативном действии и на рост стеблевых апикальных меристем. Результаты наших экспериментов показали, что в присутствии кадмия, свинца и цинка у культурных видов злаков уменьшаются размеры конуса нарастания, что обнаруживается уже на самых ранних этапах их развития. Кроме того, снижается количество закладываемых на конусе нарастания будущих элементов соцветия. Тем не менее, отмеченные нарушения морфогенеза не приводят к остановке роста и развития злаков. Более того, на ранних фазах органогенеза апикальная меристема стебля быстро восстанавливает свою активность, что позволяет растениям в дальнейшем перейти к генеративному развитию и сформировать семена.

Сохранению высокой активности ФСА злаков способствуют адаптационные изменения мезоструктуры листа, которые различаются в зависимости от вида растений и вида металла, а также поддержание необходимой концентрации каротиноидов и активности ФС II. Необходимый уровень оводненности тканей достигается некоторыми изменениями устьичного аппарата, а также замедлением скорости транспирации и устьичной проводимости при уменьшении размеров корневой системы.

Еще одним важным аспектом нашей работы явилось изучение молекулярно-генетических механизмов адаптации злаков к тяжелым металлам, в частности к кадмию. При этом нами учитывались различия в устойчивости растений к металлу, связанные с их возрастом. Результаты исследования показали, что высокая устойчивость 7-дневных проростков ячменя к кадмию связана с эффективной работой механизмов детоксикации и изоляции ионов в метаболически малоактивных компартментах клетки. В частности, с увеличением количества транскриптов генов *HvGS*, *HvPCS*, *HvMT1* и *HvMT2*, участвующих в синтезе хелаторов ионов металла, и с возрастанием содержания GSH и ФХ в клетках корня и листа. Опыты также выявили наличие прямой зависимости между содержанием хелаторов в клетке и устойчивостью проростков разного возраста к кадмию.

Перемещение ионов кадмия в вакуоль обеспечивает транспортная система тонопласта. Предполагалось, что в этом процессе участвуют белки-переносчики катионов тяжелых металлов (в том числе HMA3 и CAH2), а также вакуолярная H^+ -АТФаза, которая обеспечивает работу антипортеров (в том числе CAH-белков). На основании проведенных исследований можно с большой долей уверенности говорить об участии генов *HMA3* и *CAH2*, а также генов субъединиц E и с вакуолярной H^+ -АТФазы в механизмах устойчивости растений к металлу.

В адаптации растений к тяжелым металлам значительная роль отводится антиоксидантной системе, компоненты которой защищают клетки растений от окислительного стресса. Сохранение у изученных видов злаков интенсивности ПОЛ в присутствии кадмия на уровне контрольных растений свидетельствует об отсутствии сколько-нибудь значимых нарушений клеточных мембран при данном типе стрессового воздействия. По-видимому, антиоксидантные ферменты, в частности СОД, КАТ и ПО, активность которых при действии металла увеличивается, хорошо защищают клетки от развития окислительного стресса.

При этом, уровень активности антиоксидантных ферментов в большей степени зависит от органа растений и в меньшей – от токсичности металла или возраста проростков.

Среди изученных нами дикорастущих злаков большой интерес, как с научной точки зрения, так и в плане практического использования, представляет однолетний вид – *Setaria viridis*, характеризующийся C₄-типом фотосинтеза. Исследования показали возможность роста и развития растений этого вида в присутствии довольно высоких концентраций кадмия и цинка в корнеобитаемой среде. В основе устойчивости *Setaria viridis* к тяжелым металлам лежат механизмы адаптации, характерные для культурных злаков, а также некоторые особенности, свойственные только C₄-растениям, в частности, поддержание высокого уровня фотосинтеза даже при частично закрытых устьицах. Кроме того, как оказалось, растения этого вида способны к накоплению значительного количества ионов металлов не только в корнях, но и в побегах.

Высокая устойчивость дикорастущих злаков к тяжелым металлам обеспечивает им возможность нормального роста и развития на техногенно загрязненных тяжелыми металлами почвах, а также позволяет им в этих условиях занимать ведущие позиции в фитоценозах. Проведенное нами обследование территорий, расположенных вблизи наиболее крупных промышленных предприятий РК – Кондопожского ЦБК и Костомукшского ГОКа – показало, что с повышением степени загрязнения участков проективное покрытие злаков увеличивается, при этом доминирующими видами в изученных фитоценозах являются *Dactylis glomerata* и *Phleum pratense*, соответственно. Отсутствие явных признаков угнетения растений, произрастающих на наиболее загрязненных участках, связано с целым рядом адаптационных изменений, действующих на уровне физиологических процессов. Способность дикорастущих злаков успешно произрастать в течение длительного времени на субстратах с высоким уровнем тяжелых металлов и накапливать довольно большое их количество в органах, позволяет нам говорить о возможности использования *Dactylis glomerata* и *Phleum pratense* в фитостабилизации, а *Setaria viridis* – в фитоэкстракции загрязненных тяжелыми металлами почв в условиях таежной зоны.

Таким образом, можно заключить, что изученные нами виды культурных и дикорастущих злаков обладают высокой устойчивостью к тяжелым металлам, в основе которой лежат многочисленные механизмы, действующие на разных уровнях организации, среди которых важное место занимают физиолого-биохимические и молекулярно-генетические механизмы. В зависимости от видовой принадлежности растений, от вида металла и его концентрации в корнеобитаемой среде основную роль в устойчивости злаков к этим химическим элементам могут брать на себя различные механизмы, действующие на разных уровнях организации растительного организма, что, очевидно, и обеспечивает им широкие адаптивные возможности, позволяющие произрастать на загрязненных теми или иными тяжелыми металлами территориях. В целом же общая система «защиты» злаков от воздействия тяжелых металлов является многокомпонентной, что и делает ее весьма эффективной.

ВЫВОДЫ

1. Изученные виды культурных и дикорастущих злаков обладают высокой устойчивостью к кадмию, свинцу и цинку, что позволяет им не только произрастать длительное время в присутствии их повышенных концентраций в корнеобитаемой среде, но и переходить к генеративному развитию и формировать семена. Характер ответной реакции растений на действие тяжелых металлов в большей степени зависит от вида металла и его концентрации, а также от фазы развития и в меньшей степени – от видовой принадлежности.

2. Устойчивость культурных и дикорастущих злаков к тяжелым металлам обеспечивается функционированием разнообразных физиолого-биохимических механизмов, действующих на разных уровнях организации. На организменном уровне – это способность семян к прорастанию в присутствии их высоких концентраций; поддержание активного роста листьев при замедлении роста корневой системы; усиление (*Setaria viridis*) или тормо-

жение (культурные и дикорастущие многолетние злаки) побегообразования. На тканевом уровне – быстрое восстановление активности апикальной меристемы стебля; адаптационные изменения мезоструктуры листа и устьичного аппарата. На клеточном уровне – поддержание необходимой концентрации каротиноидов и активности ФС II.

3. На ранних этапах онтогенеза в устойчивости растений ячменя к кадмию наблюдаются отчетливо выраженные возрастные различия, связанные как с их физиолого-биохимическими особенностями, характерными для определенной фазы развития, так и с количественными и/или качественными различиями в активности действующих у них клеточных механизмов металлоустойчивости.

4. Устойчивость проростков ячменя к кадмию обеспечивается рядом молекулярно-генетических механизмов, в том числе активацией экспрессии генов (*HvGS*, *HvPCS*, *HvMT1* и *HvMT2*) белков, участвующих в синтезе хелаторов тяжелых металлов, а также генов (*HvHMA3* и *HvCAH2*) транспортных белков и субъединиц вакуолярной H^+ -АТФазы (*HvVHA-E* и *HvVHA-c*), которые обеспечивают связывание ионов металла в цитоплазме клеток и их транспорт в вакуоль.

5. Высокая устойчивость культурных и дикорастущих злаков к кадмию связана с возрастанием в присутствии металла в корнях и листьях растений содержания ФХ, с активацией синтеза GSH, а также с усилением активности антиоксидантных ферментов (СОД, КАТ и ПО).

6. В сообществах, сформированных на техногенно загрязненных территориях, злаки играют важную ценотическую роль, которая усиливается с возрастанием степени загрязнения. Способность доминирующих на этих участках видов злаков, таких как *Dactylis glomerata* и *Phleum pratense*, успешно произрастать в условиях техногенного загрязнения почвы тяжелыми металлами обусловлена рядом адаптационных механизмов, среди которых: повышение содержания хлорофиллов и каротиноидов, размеров соцветия, а также увеличение уровня внутривидовой изменчивости морфологических признаков, способствующее формированию металлоустойчивых популяций.

7. Высокая устойчивость дикорастущих злаков тяжелым металлам и их способность накапливать значительные количества токсичных ионов свидетельствует о возможности использования *Elytrigia repens*, *Phleum pratense* и *Dactylis glomerata* для фитостабилизации, а *Setaria viridis* – для фитоэкстракции загрязненных тяжелыми металлами почв в условиях таежной зоны.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Монографии:

1. Титов А.Ф., Таланова В.В., **Казнина Н.М.**, Лайдинен Г.Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам // Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. 170 с.

2. Титов А.Ф., **Казнина Н.М.**, Таланова В.В. Тяжелые металлы и растения // Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2014. 194 с.

Учебные пособия:

3. Титов А.Ф., Таланова В.В., **Казнина Н.М.** Физиологические основы устойчивости растений к тяжелым металлам: Учебное пособие // Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2011. 77 с.

4. Титов А.Ф., **Казнина Н.М.**, Таланова В.В. Устойчивость растений к кадмию (на примере семейства Злаков): учебное пособие // Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2012. 55 с.

5. Титов А.Ф., Таланова В.В., **Казнина Н.М.** Практикум по курсу Физиологические основы устойчивости растений к тяжелым металлам: учебно-методическое пособие // Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2013. 63 с.

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК
для докторских диссертаций:

6. Титов А.Ф., Лайдинен Г.Ф., **Казнина Н.М.** Влияние высоких концентраций кадмия на рост и развитие ячменя и овса на ранних этапах онтогенеза // *Агрохимия*. 2002. № 9. С. 61–65.
7. Лайдинен Г.Ф., Таланова В.В., Титов А.Ф., **Казнина Н.М.** Влияние свинца на рост и развитие *Setaria viridis* L. (Beauv.) // *Растительные ресурсы*. 2004. Т. 40. Вып. 3. С. 53–59.
8. **Казнина Н.М.**, Лайдинен Г.Ф., Титов А.Ф., Таланов А.В. Влияние свинца на фотосинтетический аппарат однолетних злаков // *Известия РАН. Серия Биологическая*, 2005. № 2. С. 184–188.
9. **Казнина Н.М.**, Лайдинен Г.Ф., Титов А.Ф. Влияние кадмия на апикальные меристемы стебля растений ячменя // *Онтогенез*. 2006. Т. 37. № 6. С. 444–448.
10. **Казнина Н.М.**, Титов А.Ф., Лайдинен Г.Ф., Таланов А.В. Устойчивость щетинника зеленого к повышенным концентрациям цинка // *Известия РАН. Серия биологическая*. 2009. № 6. С. 677–684.
11. **Казнина Н.М.**, Титов А.Ф., Лайдинен Г.Ф., Батова Ю.В. Влияние цинка на продуктивность ярового ячменя в вегетационном опыте // *Агрохимия*. 2010. № 8. С. 72–76.
12. **Казнина Н.М.**, Титов А.Ф., Лайдинен Г.Ф., Батова Ю.В. Влияние кадмия на водный обмен растений ячменя // *Труды Карельского научного центра РАН. Серия Экспериментальная биология*. 2011. № 3. С. 57–61.
13. Лайдинен Г.Ф., **Казнина Н.М.**, Батова Ю.В., Титов А.Ф. Способность к накоплению кадмия у *Bromopsis inermis* и *Setaria viridis* (POACEAE) // *Растительные ресурсы*. 2011. Т. 47. Вып. 3. С. 64–72.
14. Лайдинен Г.Ф., **Казнина Н.М.**, Батова Ю.В., Титов А.Ф. Состояние травянистой растительности в условиях промышленного загрязнения (на примере Южной Карелии) // *Растительные ресурсы*. 2011. Т. 47. Вып. 4. С. 51–62.
15. Батова Ю.В., Титов А.Ф., **Казнина Н.М.**, Лайдинен Г.Ф. Накопление кадмия и его распределение по органам у растений ячменя разного возраста // *Труды Карельского научного центра РАН. Серия Экспериментальная биология*. 2012. № 2. С. 32–37.
16. **Казнина Н.М.**, Титов А.Ф., Топчиева Л.В., Лайдинен Г.Ф., Батова Ю.В. Влияние возрастных различий на устойчивость растений ячменя к кадмию // *Физиология растений*. 2012. Т. 59. № 1. С. 74–79.
17. Батова Ю.В., Лайдинен Г.Ф., **Казнина Н.М.**, Титов А.Ф. Влияние загрязнения кадмием на семенную продуктивность однолетних злаков // *Агрохимия*. 2012. № 6. С. 74–79.
18. **Казнина Н.М.**, Титов А.Ф., Топчиева Л.В., Лайдинен Г.Ф., Батова Ю.В. Экспрессия генов вакуолярной H^+ -АТФазы в корнях проростков ячменя разного возраста при действии кадмия // *Физиология растений*. 2013. Т. 60. № 1. С. 61–65.
19. Батова Ю.В., **Казнина Н.М.**, Лайдинен Г.Ф., Титов А.Ф. Влияние кадмия на некоторые физиологические процессы у растений тимофеевки луговой (*Phleum pratense* L.) // *Труды Карельского научного центра РАН. Серия Экспериментальная биология*. 2013. № 3. С. 52–58.
20. **Казнина Н.М.**, Титов А.Ф., Лайдинен Г.Ф., Батова Ю.В. Влияние возраста листа на устойчивость фотосинтетического аппарата растений к кадмию // *Труды Карельского научного центра РАН. Серия Экспериментальная биология*. 2013. № 3. С. 112–118.
21. **Казнина Н.М.**, Титов А.Ф. Влияние кадмия на физиологические процессы и продуктивность растений семейства Poaceae // *Успехи современной биологии*. 2013. Т. 133. № 6. С. 588–603.
22. **Казнина Н.М.**, Титов А.Ф., Топчиева Л.В., Батова Ю.В., Лайдинен Г.Ф. Содержание транскриптов генов *HvHMA2* и *HvHMA3* у растений ячменя при действии кадмия // *Физиология растений*. 2014. № 3. Т. 61. С. 384–388.

23. **Казнина Н.М.**, Титов А.Ф., Батова Ю.В., Лайдинен Г.Ф. Устойчивость растений *Setaria viridis* (L.) Beauv. к воздействию кадмия // Известия РАН. Серия Биологическая. 2014. № 5. С. 474–480.

24. Батова Ю.В., **Казнина Н.М.**, Титов А.Ф., Лайдинен Г.Ф. Состояние травянистой растительности и накопление тяжелых металлов растениями, произрастающими в условиях техногенного загрязнения почвы // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. ГУ. 2014. Т. 19. Вып. 5. С. 1642–1645.

25. **Казнина Н.М.**, Титов А.Ф., Батова Ю.В. Содержание непротеиновых тиолов в клетках корня дикорастущих многолетних злаков при действии кадмия и свинца // Труды КарНЦ РАН. Серия «Экспериментальная биология». 2014. №5. С. 182–187.

Другие публикации:

26. Титов А.Ф., Лайдинен Г.Ф., **Казнина Н.М.** Влияние ионов свинца на рост и морфофизиологические показатели растений ячменя и овса // Физиология и биохимия культурных растений. 2001. Т. 33. № 5. С. 387–393.

27. Титов А.Ф., Таланова В.В., Лайдинен Г.Ф., **Казнина Н.М.** Влияние тяжелых металлов на растения: эколого-физиологические аспекты // Наземные и водные экосистемы северной Европы: управление и охрана. Материалы международной конференции, посвященной 50-летию Института биологии Карельского научного центра РАН. Петрозаводск. 2003 г. С. 152–157.

28. Лайдинен Г.Ф., **Казнина Н.М.**, Таланова В.В., Титов А.Ф. Влияние свинца на рост и развитие многолетних злаков // Физиологические аспекты продуктивности растений. Материалы научно-методической конференции. Орел. 2004. Ч. 1. С. 144–148.

29. **Казнина Н.М.**, Лайдинен Г.Ф., Титов А.Ф., Таланова В.В. Устойчивость растений щетинника к повышенному содержанию кадмия и цинка в корнеобитаемой среде // Структурно-функциональные особенности биосистем Севера (особи, популяции, сообщества). Материалы международной научной конференции. Петрозаводск. 2005. Ч. 1. С. 153–156.

30. **Kaznina N.M.**, Titov A.F., Laidinen G.F., Talanov A.V., Talanova V.V. Effect of cadmium on Poacea plants // *Physiologia Plantarum*. 2008. V. 133. № 3. P09-083.

31. **Казнина Н.М.**, Титов А.Ф., Лайдинен Г.Ф., Лайдинен Г.Ф., Батова Ю.В. Влияние промышленного загрязнения почвы тяжелыми металлами на морфологические признаки растений *Phleum pratense* L. // Труды Карельского научного центра РАН. Серия Экспериментальная биология. 2009. №3. С. 50–55.

32. **Казнина Н.М.**, Титов А.Ф., Лайдинен Г.Ф., Батова Ю.В. Влияние кадмия на некоторые физиологические показатели растений ячменя в зависимости от их возраста // Труды Карельского научного центра РАН. Серия Экспериментальная биология. 2010. № 2. С. 27–31.

33. **Kaznina N.M.**, Titov A.F., Laidinen G.F., Batova J.V. Estimation of the state of northern cenopopulations of *Phleum pratense* L. under industrial heavy metal soil contamination // Abstracts of Symposium Finish-Russian Nature reserve Friendship «From wild forest reindeer to biodiversity studies and environmental education». Kuhmo, Finland. 2010. P. 27.

34. **Казнина Н.М.**, Титов А.Ф., Лайдинен Г.Ф., Батова Ю.В. Влияние цинка на некоторые физиологические процессы и показатели у дикорастущих злаков // Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействием факторов среды. Материалы международной конференции. Петрозаводск. 2011. С. 116–120.

35. **Казнина Н.М.**, Титов А.Ф., Топчиева Л.В., Лайдинен Г.Ф., Батова Ю.В. Состояние ценопопуляций многолетних злаков, находящихся в условиях загрязнения почвы тяжелыми металлами: морфо-физиологический аспект // Отечественная геоботаника: основные вехи и перспективы. Материалы всероссийской научной конференции. Санкт-Петербург. 2011 г. Том 2. Структура и динамика растительных сообществ. Экология растительных сообществ. С. 369–372.

36. **Казнина Н.М.**, Титов А.Ф., Топчиева Л.В., Батова Ю.В., Лайдинен Г.Ф. Влияние кадмия на экспрессию гена *HvHMA3* в корнях и листьях растений ячменя // Актуальные проблемы экологии и физиологии живых организмов. Материалы всероссийской научной конференции. Четвертые чтения памяти профессора О.А. Зауралова. Саранск. 2013. С. 81–83.

37. **Казнина Н.М.**, Титов А.Ф., Батова Ю.В., Лайдинен Г.Ф. Содержание непротеиновых тиолов в растениях *Setaria viridis* при действии кадмия // Известия КГТУ. 2014. № 34. С. 188–194.

38. **Казнина Н.М.**, Титов А.Ф., Батова Ю.В., Лайдинен Г.Ф. Содержание непротеиновых тиолов в растениях *Setaria viridis* при действии кадмия // Известия КГТУ. 2014. № 34. С. 188–194.

39. Батова Ю.В., **Казнина Н.М.**, Лайдинен Г.Ф., Титов А.Ф. Влияние свинца на рост и некоторые физиолого-биохимические показатели растений пырея ползучего // Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 80-летию д.б.н., проф. В.И. Матвеева «Структурно-функциональная организация и динамика растительного покрова» (Самара, 30-31 января 2015 г.). Самара, 2015. С. 204–209.

Базы данных:

40. Батова Ю.В., **Казнина Н.М.**, Лайдинен Г.Ф., Титов А.Ф. Морфо-физиологические показатели, характеризующие состояние однолетних злаков при воздействии кадмия. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2014621273 от 10 сентября 2014 г.