На правах рукописи

СЕРЕГИН

Илья Владимирович

Распределение тяжелых металлов в растениях и их действие на рост

(03.00.12 – физиология и биохимия растений)

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
доктора биологических наук.

Москва – 2009

Работа выполнена в лаборатории физиологии корня Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва

Научный консультант:
доктор биологических наук, профессор **Иванов Виктор Борисович**

Официальные оппоненты:
доктор биологических наук,
член-корр. РАН, профессор **Гамалей Юрий Владимирович**
доктор биологических наук, профессор **Кошкин Евгений Иванович**
доктор биологических наук **Носов Александр Владимирович**

Ведущая организация: Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова, биологический факультет

Защита диссертации состоится 20 октября 2009 г. в 11 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.
Факс: (495) 977-80-18, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан « 1 » сентября 2009 г.

Ученый секретарь
совета по защите докторских
и кандидатских диссертаций,
кандидат биологических наук М.И.Азаркович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одной из важнейших задач экологической физиологии растений является изучение ответной реакции растений на ионы тяжелых металлов, которые при повышенных концентрациях оказывают токсическое действие на самые разнообразные физиологические процессы. Данная проблема имеет не только очевидное практическое значение, которое связано со все возрастающим загрязнением окружающей среды тяжелыми металлами, но также имеет и важное фундаментальное значение, которое связано с исследованием механизмов адаптации и устойчивости растений к тяжелым металлам. Среди них Cd и Pb – наиболее распространенные токсиканты, тогда как Ni и Zn относят также и к микроэлементам.

По ряду причин растения не могут не поглощать большинство тяжелых металлов и в отличие от животных, способны накапливать их в больших количествах. Именно поэтому проблема компартментации тяжелых металлов в растении является определяющей при изучении их токсического действия и механизмов устойчивости.

Способность растений накапливать тяжелые металлы реализуется на разных уровнях организации: клеточном, тканевом и органном, что связано прежде всего со способностью растений накапливать металлы в клеточных оболочках и вакуолях клеток разных тканей и органов, а также с существованием барьерных тканей, ограничивающих передвижение ряда тяжелых металлов. Накопление тяжелых металлов в метаболически-малоактивных компартментах клеток и в органах, которых растение может впоследствии лишиться, а также связывание металлов с хелаторами и их выделение в корневую слизь могут являться механизмами детоксикации тяжелых металлов, в результате чего тяжелые металлы исключаются из активного метаболизма. Благодаря эффективным механизмам детоксикации металлов растения продолжают расти при повышенном их содержании в среде.

Существует большое количество данных, касающихся токсического действия тяжелых металлов и их распределения по органам растений, меньше известно об их внутриклеточном распределении. Данные о распределении металлов на тканевом уровне практически полностью отсутствовали к началу наших исследований, хотя именно изучение их распределения по тканям растений является важным фактором для понимания механизмов их токсического действия и морфо-физиологических механизмов детоксикации. Решение этой задачи тесно связано с необходимостью разработки методов анализа распределения тяжелых металлов по тканям и клеткам растений, которые ранее практически не были разработаны. На этом основании в данной диссертации была поставлена задача разработать такие методы и с их помощью проанализировать связь между распределением, токсичностью и особенностями ростингибирующего действия металлов.

Многие виды растений способны накапливать тяжелые металлы, причем их содержание в органах растений может в десятки и даже сотни раз превышать их содержание

в окружающей среде. По способности к аккумуляции тяжелых металлов выделяют две контрастные группы растений: исключатели, у которых тяжелые металлы накапливаются, главным образом, в корневой системе, и аккумуляторы, у которых они накапливаются в больших количествах в надземных органах [Baker, 1981]. В литературе, однако, практически отсутствуют сведения о том, какими морфо-анатомическими и физиологическими особенностями обусловлена способность одних видов растений накапливать тяжелые металлы в корнях, а у других видов – в надземных органах.

Выяснение роли тканей в передвижении и накоплении металлов у исключателей и гипераккумуляторов необходимо, с одной стороны, для понимания механизма гипераккумуляции, что представляет интерес в целях изучения применения гипераккумуляторов для рекультивации почвы и очистки окружающей среды от тяжелых металлов – фиторемедиации, которая в последнее время активно разрабатывается. С другой стороны, это важно для выяснения структурных и физиологических особенностей исключателей, определяющих ограниченное поступление металлов в надземные органы, что представляет несомненный интерес для сельскохозяйственной практики.

Поступая в клетки, тяжелые металлы реагируют с функциональными группами белков и других соединений, что может являться одним из механизмов детоксикации, (металлотионеины и фитохелатины), но вместе с тем приводит к многочисленным нарушениям метаболизма и лежит в основе высокой токсичности тяжелых металлов. Прочность связывания ионов тяжелых металлов с функциональными группами биополимеров может различаться, что может быть одной из причин различной токсичности тяжелых металлов. Поэтому в наших исследованиях были выбраны широко распространенные тяжелые металлы, во-первых, обладающие различным сродством к функциональным группам биополимеров, а во-вторых, накапливающиеся в разных компартментах клетки. Так, Cd, Pb, Zn связываются главным образом с SH-группами и накапливаются в апопласте, а Ni связывается с N-содержащими лигандами и накапливается преимущественно в протопласте.

Токсическое действие металлов четко видно по ингибированию роста, что широко используется для тестирования их присутствия в окружающей среде [Wilkins, 1978; Wang, 1987; Breckle, 1991; Hagemeyer, Breckle 1996]. Действие тяжелых металлов на рост напрямую зависит от особенностей их тканевого и внутриклеточного распределения в растущем участке корня, а также от эффективности механизмов детоксикации, которые по-разному могут реализоваться в различных тканях исключателей и аккумуляторов. Поэтому решение проблемы специфичности и избирательности токсического действия металлов на рост, а также выяснение клеточных механизмов действия тяжелых металлов на отдельные ростовые процессы требует понимания особенностей их передвижения и распределения по органам и тканям в связи со свойствами их ионов.

Изучение функциональных особенностей тканей корня и побега в передвижении и накоплении тяжелых металлов у исключателей и гипераккумуляторов, а также выяснение механизма ростингибирующего действия различных тяжелых металлов необхо-

димы для разработки фундаментальных основ адаптации растений к тяжелым металлам и решения ряда практических задач.

Перечисленные выше проблемы определили актуальность данного исследования.

Цель исследования состояла в выяснении роли разных тканей корня и побега исключателей и гипераккумуляторов в передвижении и накоплении тяжелых металлов в связи с особенностями их ростингибирующего действия.

Задачи исследования:

1. Выяснить роль разных тканей корня и побега в передвижении и накоплении металлов у исключателей и гипераккумуляторов
2. Выявить возможные причины избирательного накопления металлов в подземных органах исключателей и надземных органах гипераккумуляторов
3. Охарактеризовать на клеточном уровне механизмы ростингибирующего действия Pb, Ni и Sr в связи со специфичностью и избирательностью их действия.

Научная новизна работы. Предложены новые методы гистохимического определения Cd, Pb, Sr и Zn, а метод для выявления Ni существенно модифицирован, что позволило повысить его чувствительность. Установлены основные закономерности распределения металлов у исключателей и гипераккумуляторов. Впервые выяснен вклад разных тканей корня и побега в передвижении и накоплении металлов. Впервые показаны отсутствие физиологических барьеров в меристеме корня для ионов тяжелых металлов, передвигающихся по симпласту и апопласту; роль первичной коры как избирательного аккумулятора таких «апопластических» ионов тяжелых металлов, как Cd и Pb; отсутствие универсальных тканевых и клеточных барьеров для передвижения тяжелых металлов; функция перицикла как ткани-аккумулятора и «кольцевого коллектора» в передвижении Ni у исключателей. Выяснена неоднозначность влияния Ca на распределение и токсическое действие тяжелых металлов у разных видов. Показана возможная причина «защитного» действия Ca – конкуренция за общие места связывания при поглощении и транспорте. Впервые показана роль гистидина в передвижении и накоплении Ni у исключателей и гипераккумуляторов. Установлено, что феномен гипераккумуляции определяется не только отсутствием тканей-аккумуляторов и барьерных тканей в корне у гипераккумуляторов, но и ограниченным поступлением Ni в вакуоли клеток корня и повышенной скоростью поступления Ni в сосуды ксилемы в корнях гипераккумуляторов, в чем важную роль играет повышенный внутриклеточный уровень гистидина. Проведен сравнительный анализ ростингибирующего действия тяжелых металлов. Экспериментально обоснована специфика механизма действия Pb, Ni и Sr на рост наряду с общей неспецифичностью и неизбирательностью токсического действия металлов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Роль тканей растений в передвижении и накоплении тяжелых металлов не одинакова не только для разных металлов, но и у растений исключателей и гипераккумуляторов.

2. В корнях гипераккумуляторов отсутствуют барьерные ткани и ткани-аккумуляторы, в результате чего их корневая система, в отличие от исключателей, не ограничивает поступление металлов в побег.
3. Гипераккумуляторы Ni, в отличие от исключателей, характеризуются ограниченным накоплением Ni в клетках корня и повышенной скоростью поступления Ni в сосуды ксилемы, в чем важную роль у *Thlaspi caerulescens* играет внутриклеточный уровень гистидина.
4. Специфика действия отдельных тяжелых металлов на различные ростовые процессы обусловлена как различиями физико-химических свойств их ионов, так и различным характером их передвижения и распределения по тканям и органам растений.

Научная и практическая значимость исследований. Проведенные исследования имеют, прежде всего, фундаментальный характер, поскольку позволяют понять основные принципы и закономерности передвижения и распределения тяжелых металлов по разным тканям в связи с различной ролью последних как у разных видов растений, так и для разных тяжелых металлов. Результаты исследования дают новые представления о специфических и неспецифических чертах ростингибирующего действия тяжелых металлов. Установленные связи между особенностями распределения тяжелых металлов и клеточным механизмом их токсического действия на рост являются важным звеном в понимании устойчивости растений к тяжелым металлам и реакции растений на их избыток. Вместе с тем представленные результаты могут иметь и практическое значение ввиду возрастающего загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами. Полученные данные о неоднозначности «защитного» эффекта Ca необходимо учитывать в сельскохозяйственной практике, так как известкование почв – один из наиболее распространенных приемов, направленный на уменьшение поглощения и токсического действия тяжелых металлов. Понимание причин ограниченного поступления тяжелых металлов в надземные органы у растений исключателей и неограниченного – у гипераккумуляторов может быть использовано для разработки методов уменьшения содержания тяжелых металлов в сельскохозяйственной продукции, с одной стороны, и увеличении содержания металлов в надземных органах растений, используемых в технологии фиторемедиации. Кроме того, определение тяжелых металлов с помощью простых гистохимических методов имеет важное значение для экологического мониторинга. Материалы диссертации могут быть рекомендованы для включения в лекционные курсы по физиологии растений и экологии.

Апробация работы. Основные материалы диссертации были представлены на Международной конференции по анатомии и морфологии растений (Санкт-Петербург, 1997), на Международном симпозиуме «Структура и функция корня» (Словакия, 1998), на IV Съезде Общества физиологов растений России (Москва, 1999), на Международном симпозиуме Plants under Environmental Stress (Москва, 2001); на Международной конференции «Биологические ресурсы и устойчивое развитие» (Пущино,

2001); на II Международной конференции по анатомии и морфологии растений (Санкт-Петербург, 2002), на I Молодежной конференции ИФР РАН (Москва, 2003), на V Съезде Общества физиологов растений России (Пенза, 2003), на VIII Международной конференции ботаников (Санкт-Петербург, 2004), на Международной научной конференции «Проблемы физиологии растений Севера» (Петрозаводск, 2004), на III научном семинаре «Биоразнообразие природных и антропогенных экосистем» (Екатеринбург, 2004), на Международной конференции «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия» (Вологда, 2005), на IV Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, 2005), на Международной конференции «Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты» (Москва, 2005), на I (IX) Международной конференции ботаников (Санкт-Петербург, 2006), на Международной конференции «Физиология растений – фундаментальная основа современной фитобиотехнологии» (Ростов-на-Дону, 2006), на семинарах лаборатории экологии и физиологии растений Свободного университета (Амстердам, Голландия, 2005, 2006, 2007, 2008), на секции экологии Дома ученых (Москва, 2007), на Костычевских чтениях (Санкт-Петербург, 2007), на Международном семинаре Phytoremediation and Monitoring of Contaminated soil (Санкт-Петербург, 2007), на VI Съезде Общества физиологов растений России (Сыктывкар, 2007), на Международной конференции «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений» (Екатеринбург, 2008).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 48 научных работ, в том числе 23 статьи в отечественных и зарубежных рецензируемых научных журналах.

Личный вклад соискателя. Работа выполнена в лаборатории физиологии корня Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений РАН. Из исследований, проведенных в соавторстве с коллегами, в диссертационную работу включены и вынесены на защиту только те результаты, в получении которых автору принадлежит существенная или определяющая роль. Автор выражает глубокую благодарность Е.И. Быстровой, А.Д. Кожевниковой, а также Н.В. Алексеевой-Поповой, А.И. Беляевой, М.Н. Катаевой, Л.К. Шпигун, R. Vooijs и доктору H. Schat (Свободный университет, Амстердам, Голландия) за оказанную помощь в проведении ряда исследований. Особо благодарен научному консультанту В.Б. Иванову за конструктивные советы и постоянное содействие в работе, а также всем коллегам, принимавшим участие в обсуждении полученных результатов.

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 333 страницах и состоит из введения, 4 глав, заключения и выводов. Список литературы включает 625 источника, из них 555 иностранных авторов. Работа содержит 26 таблиц и 99 рисунков. 11 таблиц и 88 рисунков включены в приложение (том 2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

I. Действие тяжелых металлов и Sr на рост и ветвление корня.

К тяжелым металлам относят большую группу металлов, обладающих как общими, так и специфическими особенностями их токсического действия на организмы. В литературе тяжелые металлы часто рассматривают как единую группу токсикантов. Однако отдельные металлы четко различаются по физико-химическим свойствам их ионов и токсичности. Механизмы токсического действия тяжелых металлов могут быть различны. Наряду с общими механизмами токсического действия металлов, отдельные металлы в некоторых случаях могут избирательно ингибировать процессы, более специфично связанные с ростом (например, серебро ингибирует синтез этилена [Nichols et al., 1985]). Чтобы полнее охарактеризовать действие тяжелых металлов, в данной работе мы выбрали ряд металлов, заметно отличающихся по своим свойствам, и проанализировали корреляции между свойствами их ионов, распределением металлов по тканям и клеткам и их биологическим действием.

На токсичность металлов влияют другие ионы, присутствующие в среде, наиболее важную роль среди которых играют ионы Ca. Известно, что действие Ca связано с его физиологическими функциями в клетке как вторичного мессенджера. Однако возможно, что Ca конкурирует с тяжелыми металлами как двувалентный катион. В этом случае такое же действие будет проявлять и Sr, который является аналогом Ca, но не выполняет свойственных последнему физиологических функций.

В данной работе мы попытались охарактеризовать степень специфичности и избирательности действия отдельных металлов, сравнивая между собой ряд разных металлов, отличающихся по физико-химическим свойствам. Кроме того, было изучено, в какой мере защитный эффект Ca может быть обусловлен его физиологической ролью путем сравнения действия Ca и его близкого аналога – Sr. В качестве объекта были взяты проростки кукурузы, которые в течение многих лет использовались в нашей лаборатории как объект для скрининга биологической активности разных соединений.

Действие Cd, Pb, Ni и Sr на рост и ветвление корня. Проростки кукурузы (*Zea mays* L.) выращивали в течение 7 суток на растворах $Cd(NO_3)_2$ (1, 10 мкМ), $Pb(NO_3)_2$ (10, 100 мкМ), $Ni(NO_3)_2$ (1, 10, 15, 20, 35, 50 мкМ) или $Sr(NO_3)_2$ (3 мМ, 35 мкМ) в вегетационной камере (27/25°C день/ночь; интенсивность освещения 3000 лк, 16ч $сут^{-1}$; относительная влажность 70%; постоянная аэрация раствора). При инкубации растений на растворах 10 мкМ $Cd(NO_3)_2$, 100 мкМ $Pb(NO_3)_2$ и 50 мкМ $Ni(NO_3)_2$ (LC) наблюдали почти полную гибель корней уже на вторые сутки. Боковые корни не возникали. Приблизительно 50%-ное ингибирование роста первичного корня за 24-48 ч инкубации наблюдалось при концентрациях 1 мкМ $Cd(NO_3)_2$, 10 мкМ $Pb(NO_3)_2$, 15 мкМ $Ni(NO_3)_2$, и 3 мМ $Sr(NO_3)_2$ (LC_{50}) (рис. 1а). На растворе Хогланда соответствующие

концентрации составляли 38 мкМ $Cd(NO_3)_2$, 10 мкМ $Pb(NO_3)_2$, 75 мкМ $Ni(NO_3)_2$. Ингибирование развития боковых корней наблюдалось только в присутствии $Ni(NO_3)_2$.

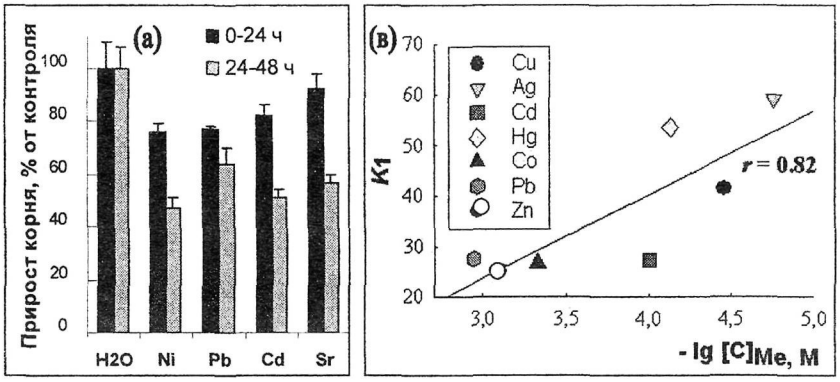
Сравнение токсичности разных металлов. Для сравнительной оценки токсического действия тяжелых металлов и Sr проростки кукурузы выращивали в чашках Петри на растворах $AgNO_3$, $Cd(NO_3)_2$, $Pb(NO_3)_2$, $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $Tl_2(SO_4)_3$, $CoCl_2$, $Ni(NO_3)_2$, $Sr(NO_3)_2$ и $HgCl_2$ (0.001 - 3 г/л) (pH 6.0). Токсическое действие солей металлов оценивали по ингибированию прироста каждого корня за 1-ые, 2-ые и 3-ьи сутки после начала инкубации, изменению длины зоны боковых корней, а также по времени развития боковых корней, которое рассчитывали по методу В.Б. Иванова (1998).

При одинаковой концентрации ионов в растворе (например, при 10^{-4} М) их токсичность уменьшалась в следующем порядке: $Tl^{3+} > Cu^{2+} > Ag^{+} > Hg^{2+} \approx Cd^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+} \approx Pb^{2+} \approx Co^{2+} > Sr^{2+}$, что в целом совпадало с рядом токсичности, если в качестве критерия принимали 50%-ное ингибирование роста корня (рис. 1б, в). Металлы по их действию на рост корня кукурузы можно условно разделить на три группы: сильнотоксичные (Cu, Tl, Ag), среднетоксичные (Cd, Ni, Hg) и слаботоксичные (Pb, Co, Zn и Sr).

Все изученные соли металлов, за исключением Ni, не влияли на время развития боковых корней (табл. 1), что согласуется с результатами более ранних исследований, которые показали, что ветвление корней очень устойчиво к действию разнообразных токсикантов [Ivanov, 1994]. При неизменном времени развития самих боковых корней, длина зоны боковых корней становилась короче, чем в контроле, за счет ингибирования роста первичного корня. В результате образуется более компактная корневая система, что является общим проявлением токсического действия тяжелых металлов [Breckle, 1991, 1996; Arduini et al., 1994; Hagemeyer, Breckle, 1996].

Токсическое действие Ni на рост и ветвление корня у исключателей и аккумуляторов различается. Для сравнения были выбраны исключатели (*Zea mays, Thlaspi perfoliatum, T. arvense*) и 5 экотипов гипераккумулятора *T. caerulescens* (St. Felix, Prayon, Lellingen, LaCalamine, Monte Prinzera), которые выращивали на растворе Хогланда в присутствии $Ni(NO_3)_2$ в концентрациях 10–30 мкМ для *T. perfoliatum* и *T.arvense*, 30–80 мкМ для *Z. mays* и 25–400 мкМ для *T. caerulescens*. Снижение накопления биомассы корней и побегов у *T. caerulescens* наблюдали при 300 мкМ $Ni(NO_3)_2$, а у *T. perfoliatum* – при 20 мкМ (рис. 2). Боковые корни развивались у *T. caerulescens* даже при 400 мкМ, в то время как у *Z. mays* ингибирование развития боковых корней наблюдалось уже при 60 мкМ $Ni(NO_3)_2$ в растворе. Причина таких различий кроется в различной роли тканей корня в накоплении тяжелых металлов у исключателей и гипераккумуляторов.

Механизм общетоксического действия тяжелых металлов. Механизмы токсичности тяжелых металлов разнообразны [Ernst, 1992, 1999; Серегин, Иванов, 2001; Серегин, Кожевникова, 2006]. Ранее были предприняты попытки проанализировать корреляции между токсичностью отдельных металлов и их физико-химическими свойствами. Особенно четкая зависимость между токсичностью тяжелых металлов и прочностью их связи с SH-группами была установлена при изучении их влияния на фермен-



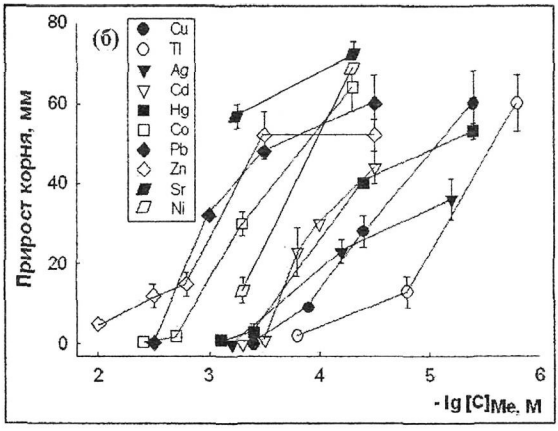


Рис. 1. Влияние тяжелых металлов на прирост первичного корня кукурузы (а, б) и корреляция между концентрацией, вызывающей 50%-ное ингибирование роста корня, и сродством тяжелых металлов к SH-группам, выраженное через константу (K_1), представляющую собой отрицательный логарифм растворимости соответствующих сульфидов (в).
(а) – 15 мкМ $Ni(NO_3)_2$, 3 мМ $Sr(NO_3)_2$, 1 мкМ $Cd(NO_3)_2$ и 10 мкМ $Pb(NO_3)_2$.

Таблица 1. Влияние солей различных тяжелых металлов в разных концентрациях на длину зоны боковых корней и время их развития у проростков кукурузы.

Соль	Длина зоны боковых корней, мм			Время развития боковых корней, ч		
	контроль	0.01 г/л	0.1 г/л	контроль	0.01 г/л	0.1 г/л
$CuSO_4$	77 ± 8 (10)	62 ± 8 (6)	33 ± 9 (4)	51 ± 3 (10)	50 ± 1 (6)	54 ± 5 (4)
$AgNO_3$	65 ± 5 (4)	42 ± 1 (3)	—	55 ± 3 (4)	55 ± 3 (3)	—
$Cd(NO_3)_2$	71 ± 8 (8)	56 ± 9 (4)	24 ± 3 (4)	50 ± 2 (8)	52 ± 4 (4)	53 ±3 (4)
$HgCl_2$	70 ± 7 (5)	58 ± 2 (4)	34 ± 3 (4)	48 ± 2 (5)	48 ± 5 (4)	50 ± 2 (4)
$CoCl_2$	74 ± 5 (6)	70 ± 9 (4)	35 ± 4 (5)	49 ± 2 (6)	53 ± 2 (4)	66 ± 2 (5)
$ZnSO_4$	75 ± 7 (8)	71 ± 5 (4)	66 ± 5 (4)	48 ± 2 (8)	47 ± 1 (4)	43 ± 1 (4)
$Pb(NO_3)_2$	67 ± 4 (4)	66 ± 8 (4)	60 ± 4 (4)	53 ± 1 (4)	53 ± 1 (4)	53 ± 1 (4)
$Ni(NO_3)_2$	52 ± 6 (3)	56 ± 1 (3)	15 ± 1 (3)	55 ± 3 (3)	54 ± 3 (3)	> **72** (3)
$Sr(NO_3)_2$	52 ± 6 (3)	48 ± 2 (3)	52 ± 4 (3)	55 ± 3 (3)	55 ± 4 (3)	53 ± 3 (3)

Примечание. Приведены средние арифметические и их стандартные ошибки. В скобках показано число независимых экспериментов. Длину зоны боковых корней измеряли на третьи сутки после начала инкубации. Прочерк означает отсутствие измерения.

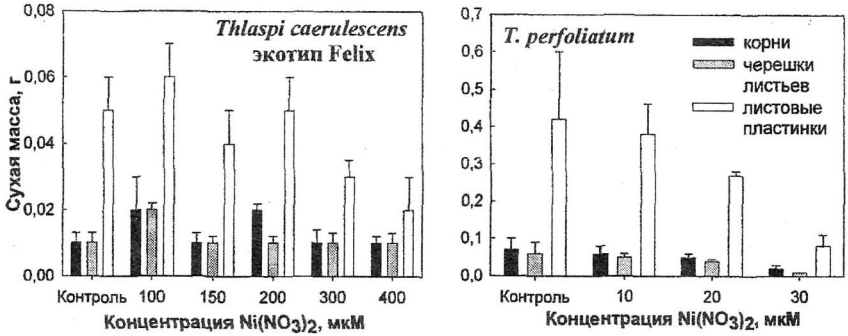


Рис. 2. Влияние различных концентраций $Ni(NO_3)_2$ на сухую массу корней, черешков листьев и листовых пластинок *Thlaspi caerulescens* (экотип Felix) и *Thlaspi perfoliatum* после 7 недель инкубации.

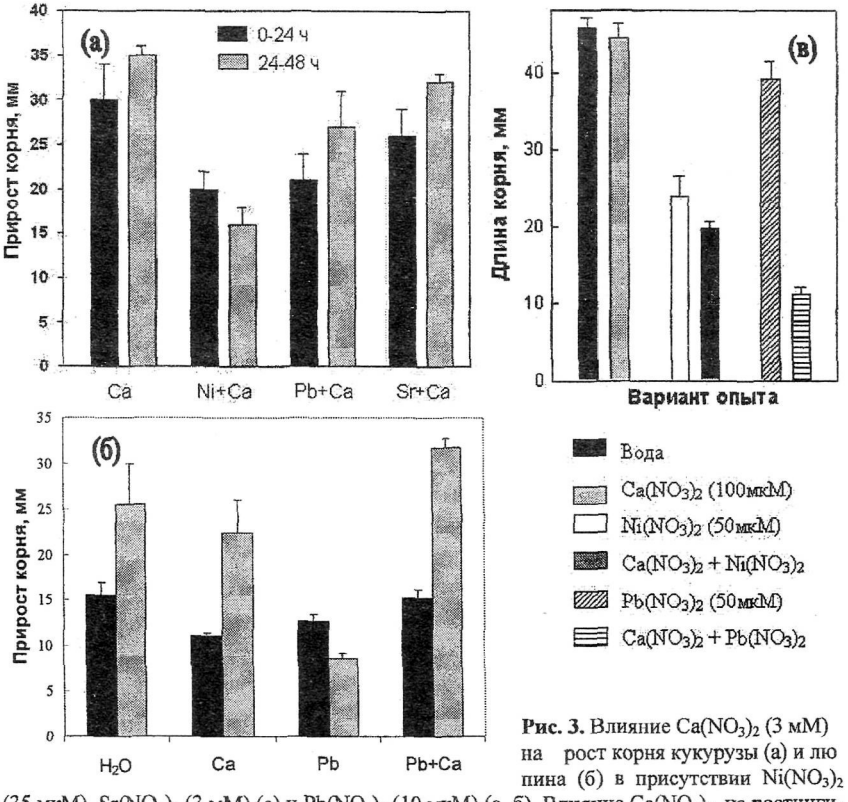


Рис. 3. Влияние $Ca(NO_3)_2$ (3 мМ) на рост корня кукурузы (а) и люпина (б) в присутствии $Ni(NO_3)_2$ (35 мкМ), $Sr(NO_3)_2$ (3 мМ) (а) и $Pb(NO_3)_2$ (10 мкМ) (а, б). Влияние $Ca(NO_3)_2$ на ростингибирующее действие Ni и Pb у проростков амаранта (в).

ты *in vitro* у разных водных беспозвоночных и рыб [Левина, 1972]. Для растений такие данные нами получены впервые.

Для анализа зависимости токсического действия тяжелых металлов на рост от физико-химических параметров были вычислены коэффициенты корреляции между наиболее значимыми величинами, определяющими свойства атомов и ионов металлов, и молярными концентрациями, вызывающими 50%-ное ингибирование роста корня (LC_{50}). Существенная положительная корреляция (r = 0.82) была выявлена только между сродством металла к SH-группам и молярными концентрациями, при которых рост тормозится на 50% (рис. 1в). Корреляций с другими изученными параметрами мы не обнаружили.

В ряде работ сравнивали влияние на рост корней одного вида растения разных тяжелых металлов [Neiboer et al., 1980; Wong, Bradshaw, 1982; Karataglis, 1987], не сопоставляя их токсичность и физико-химические свойства. Обработка этих данных выявила четкую корреляцию между сродством металлов к SH-группам и степенью ингибирования роста корней. При нашем анализе данных Wong и Bradshaw (1982) для *Lolium perrene* и Karataglis (1987) для *Triticum aestivum* была обнаружена высокая корреляция между молярными концентрациями, вызывающими 50%-ное ингибирование роста корня, и электроотрицательностью (r = 0.9), что свидетельствует о связи между токсичностью металлов и их способностью образовывать прочные ковалентные связи. Однако для корней проростков кукурузы высокой корреляции между этими параметрами не выявлено.

Токсичность тяжелых металлов не определяется только их взаимодействием с SH-группами белков, а зависит также от реакций с другими функциональными группами, от подвижности ионов и других их свойств. Поэтому относительная токсичность отдельных металлов для разных видов растений или других организмов различается.

Выявленная корреляция между степенью ингибирования роста и сродством металлов к SH-группам, необходимым для функционирования большого числа ферментов, позволяет предположить общий для разных металлов механизм неспецифической и неизбирательной токсичности, на который могут накладываться отдельные частные реакции. Поэтому тяжелые металлы можно рассматривать как неспецифически действующие вещества. Их действие обусловлено общими причинами, среди которых важную роль играет взаимодействие с SH-группами белков. Не исключено, что в случае Ni может происходить также инактивация ферментов, в активные центры которых входит гистидин, так как сродство Ni к N-содержащим лигандам выше, чем к S-содержащим, что определяет особенности его токсического действия.

Общие закономерности влияния тяжелых металлов на рост корней. Несмотря на существенные различия в токсичности (рис. 1б), все изученные соли тяжелых металлов имеют общие особенности токсического действия на рост корней: 1) диапазон концентраций, при которых рост ингибируется, невелик, 2) степень ингибирования роста, за исключением Ni, мало изменяется со временем, 3) ветвление корня не инги-

бируется, за исключением Ni, несмотря на сильное ингибирование роста первичного корня (рис. 1, табл. 1). Согласно ранее полученным данным, эти признаки характерны для самых разных соединений: неспецифически действующих неэлектролитов; ряда антибиотиков, не обладающих избирательным действием на рост или деление клеток; солей калия, натрия и других соединений [Ivanov, 1994]. Все эти вещества тормозят рост только при концентрациях, близких к летальным, что в значительной степени обусловлено неспецифическим общим нарушением структуры и метаболизма клеток.

Влияние Ca на ростингибирующее действие тяжелых металлов. Несмотря на активное изучение физиологической роли макроэлементов, и в особенности Ca как вторичного мессенджера в самых разнообразных сигнальных системах, его влияние на проявление токсического действия тяжелых металлов оставалось малоизученным. Для изучения влияния Ca была проведена серия экспериментов, в которой проростки кукурузы инкубировали на растворах $Ni(NO_3)_2$ (15, 20, 25, 35 мкМ), $Sr(NO_3)_2$ (3 мМ, 35 мкМ), $Cd(NO_3)_2$ (1 мкМ) или $Pb(NO_3)_2$ (10 мкМ); люпина *Lupinus rubrum* – на растворе $Pb(NO_3)_2$ (10 мкМ) и амаранта *Amaranthus caudatus* – на растворах $Pb(NO_3)_2$ (50, 100, 200, 700 мкМ), или $Ni(NO_3)_2$ (10, 50, 100, 500 мкМ) в присутствии $Ca(NO_3)_2$ (3 мМ для кукурузы и люпина и 100 мкМ для амаранта). Действующие концентрации Ca и тяжелых металлов были подобраны в предварительных экспериментах.

Результаты настоящей работы ясно показывают, что действие Ca неоднозначно. В отличие от кукурузы и люпина (рис. 1а, 3а, б), токсическое действие Ni и Pb на рост корня амаранта увеличивалось в присутствии Ca (рис. 3в), что согласуется с увеличением их содержания в растущем участке корня. Сходные результаты были получены при изучении поглощения Cd корнями березы [Greger, Jensen, 1995] и Ni гипераккумулятором *Berkheya coddii* [Boyd, Martens, 1998].

II. Роль различных тканей растений в передвижении и накоплении тяжелых металлов и Sr.

Тяжелые металлы и Sr поступают в растение главным образом через корневую систему. С целью изучения роли отдельных тканей растений в передвижении и распределении тяжелых металлов, были разработаны гистохимические методы определения Cd, Pb, Sr и Zn, а также модифицирован метод определения Ni, что позволило значительно повысить его чувствительность. Используемые реагенты (дитизон для определения Cd и Pb, диметилглиоксим для определения Ni, родизонат натрия для определения Sr, цинкон и Zinpyr-1 для определения Zn) обладают высокой чувствительностью к изучаемым металлам и способны проникать в неповрежденные клетки. Изучение распределения металлов проводилось с помощью современных методов световой микроскопии, что позволило проанализировать распределение металлов по тканям корня и побега исключателей и гипераккумуляторов, в результате чего были выявлены основные закономерности распределения и передвижения Cd, Pb (рис. 4), Sr (рис. 5),

Ni (рис. 6) и Zn (рис. 7). Анализ проводили непосредственно после приготовления срезов корня или побега в условиях, при которых возможность перераспределения металлов ограничена, о чем свидетельствуют результаты специально проведенных серий экспериментов, более подробно описанных в диссертации. Результаты гистохимического анализа были подтверждены данными количественного определения металлов в различных участках корня и в побегах методами анодной инверсионной вольтамперометрии [Шпигун, Копытова, 1997] (рис. 4е) или атомно-абсорбционной спектрофотометрии (рис. 5о, 6и, 7).

Подобные данные, особенно для Cd и Sr, полностью отсутствовали в литературе, так как гистохимические методы их определения ранее не были разработаны. Однако существует ряд работ, касающихся распределения Ni в надземных органах растений-гипераккумуляторов [Severne, 1974; Heath et al., 1997; Psaras, Manetas, 2001; Bidwell et al., 2004] и распределения Pb по тканям подземных органов ряда видов [Glater, Hernandez, 1972; Wierzbicka, 1987; Tung, Temple, 1996; Gzyl et al., 1997]. Полученные этими авторами результаты согласуются с данными гистохимического анализа, что также позволяет заключить, что разработанные методы выявляют истинное распределение изучаемых металлов. Следует отметить, что при изучении окрашенных срезов, по интенсивности окрашивания мы можем полуколичественно оценивать и сравнивать содержание металла в разных участках среза на единицу площади, в то время как сравнение содержания металла в клетках разных тканей возможно лишь при сходном размере клеток на срезах. На основании полученных данных подробно проанализирована роль отдельных тканей корня и побега в распределении металлов на примере как однодольных (*Zea mays*), так и двудольных (*Lupinus rubrum, Thlaspi perfoliatum, Thlaspi caerulescens, Amaranthus caudatus*) растений, относящихся, кроме того, к разным стратегиям: исключателям и гипераккумуляторам. Оценено также влияние Ca на накопление и распределение металлов.

Корневой чехлик. Клетки корневого чехлика и ризодермы участвуют в образовании слизи, покрывающей апикальный участок корня [Данилова, 1974]. Способность слизи связывать тяжелые металлы зависит от сродства ионов металлов к функциональным группам биополимеров слизи. Чем прочнее ионы металлов связываются со слизью, тем медленнее они поступают в корень. Наиболее высоким сродством к этим группам обладают ионы Pb [Mench et al., 1987], которые прочно связывается со слизью. Sr связывается с материалом слизи значительно слабее, что обусловливает его высокую мобильность и быстрое поступление в корень. Для Ni также существенно связывание с материалом слизи. Однако его сродство к уроновым кислотам слизи ниже, чем у Pb, так как Ni образует связи преимущественно с N-лигандами [Левина, 1972]. Таким образом, слизь может играть роль своеобразного аккумулятора для тех ионов металлов (Pb), физико-химические свойства которых определяют их высокое сродство к функциональным группам углеводов.

Поступая в клетки корневого чехлика кукурузы, тяжелые металлы и Sr распределяются в них достаточно равномерно (рис. 5м). Ni накапливался преимущественно в

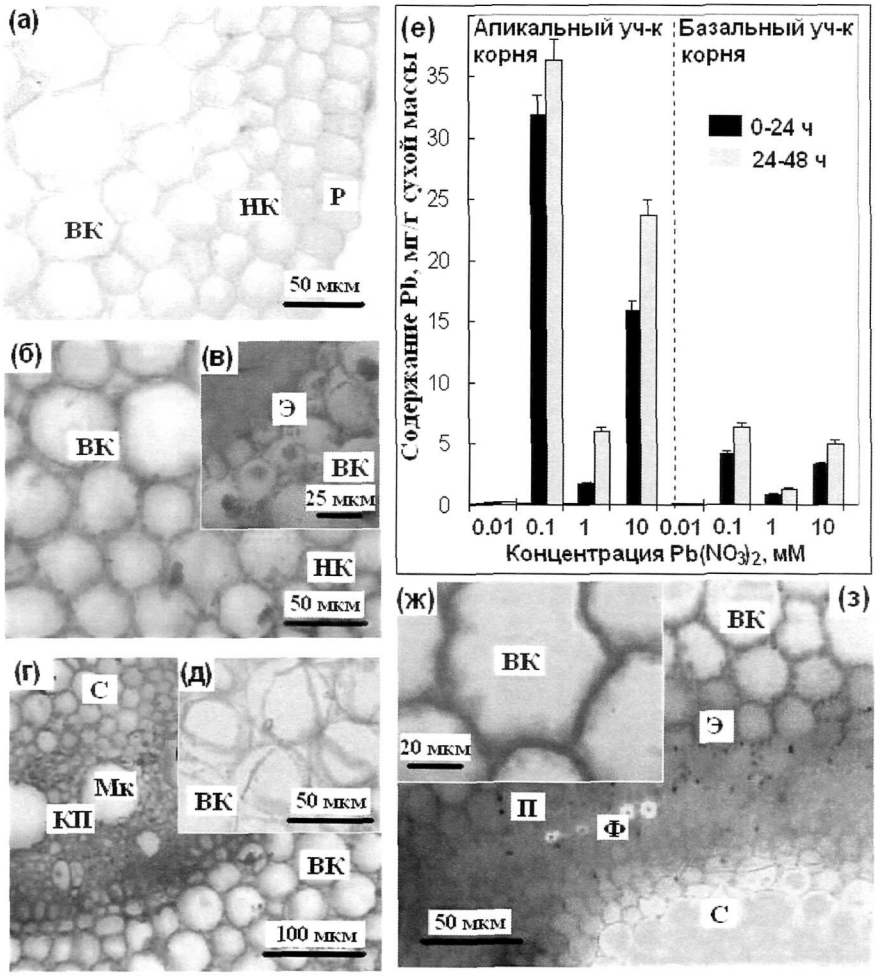


Рис. 4. (а) – отсутствие Pb в контрольных корнях. Распределение Pb в проростках кукурузы (б-д), люпина (ж, з), амаранта (и, к) после 24 ч (б, г, д); 48 ч (в, з); 7 суток (ж, и, к) инкубации на растворах 10 мкМ (б, в, д, ж, з), 0.1 мМ (г, и, к) $Pb(NO_3)_2$ в отсутствие Ca (б-д, ж, з, и), в присутствии Ca (к). Показано распределение металлов в апикальном (в, и, к), среднем и базальном участках корня (б, г, д, ж, з) при LC_{50} (б, в, г, д, ж-к) и LC (г). (е) – содержание Pb в корнях проростков кукурузы после 1-2 сут выращивания в присутствии 0.01 и 0.1 мМ $Pb(NO_3)_2$ (вегетационные сосуды) и 1 и 10 мМ $Pb(NO_3)_2$ (чашки Петри). (д) – плазмолиз 0.7М сахарозой (1ч)

ВК – внутренняя кора; **К** – кора; **КП** – ксилемная паренхима; **Кс** - ксилема; **Мк** – метаксилема; **НК** – наружная кора, **П** – перицикл; **Р** – ризодерма; **С** – сердцевина; **Ф** – флоэма; **Э** – эндодерма. Для Cd на проростках кукурузы получены аналогичные результаты.

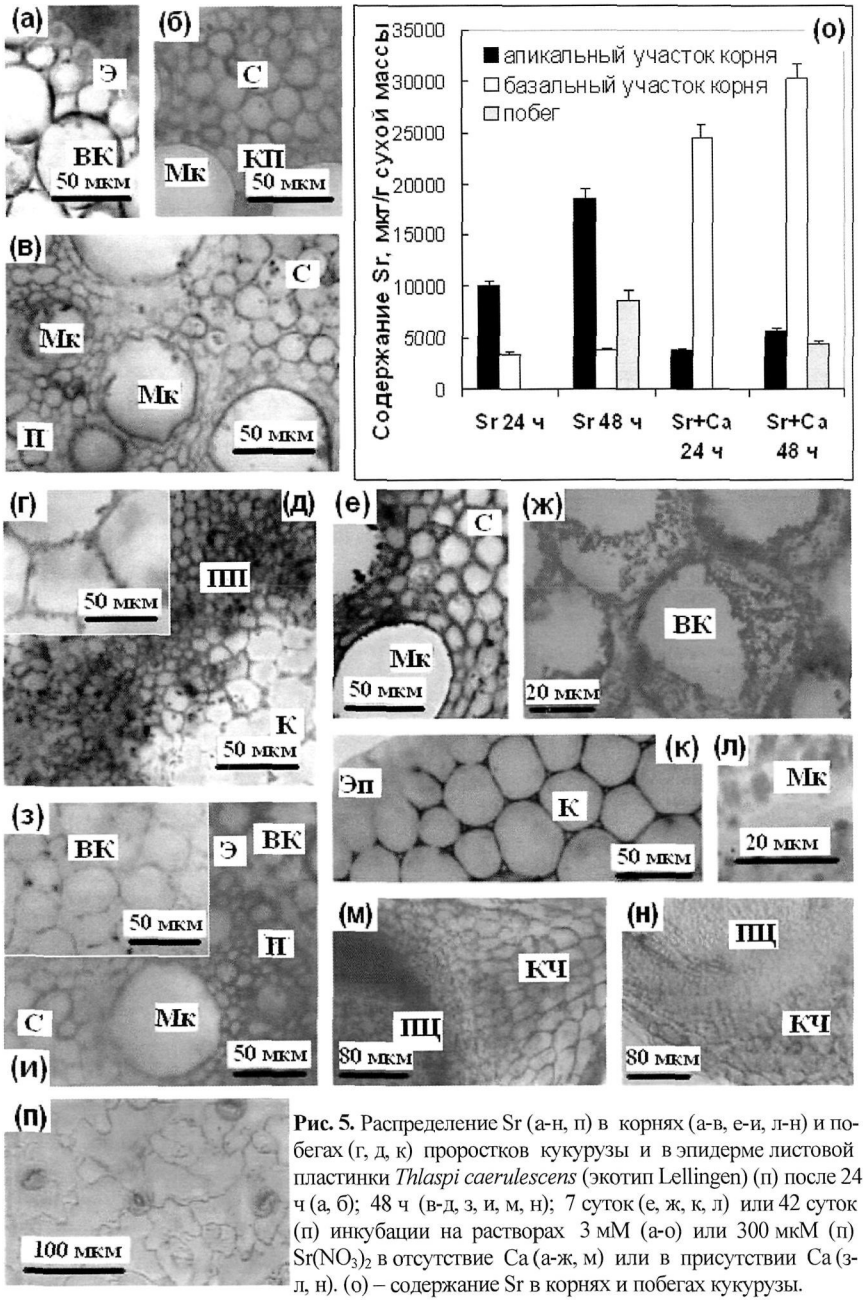
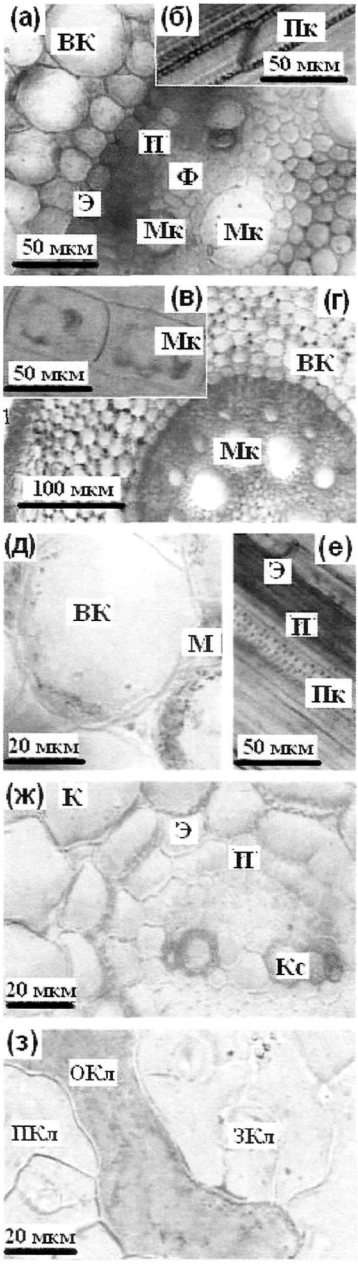


Рис. 5. Распределение Sr (а-н, п) в корнях (а-в, е-и, л-н) и побегах (г, д, к) проростков кукурузы и в эпидерме листовой пластинки *Thlaspi caerulescens* (экотип Lellingen) (п) после 24 ч (а, б); 48 ч (в-д, з, и, м, н); 7 суток (е, ж, к, л) или 42 суток (п) инкубации на растворах 3 мМ (а-о) или 300 мкМ (п) $Sr(NO_3)_2$ в отсутствие Ca (а-ж, м) или в присутствии Ca (з-л, н). (о) – содержание Sr в корнях и побегах кукурузы. **КЧ** – корневой чехлик; **ПП** – проводящий пучок; **ПЦ** – покоящийся центр; **Эп** – эпидерма. Остальные обозначения как на рис. 4.



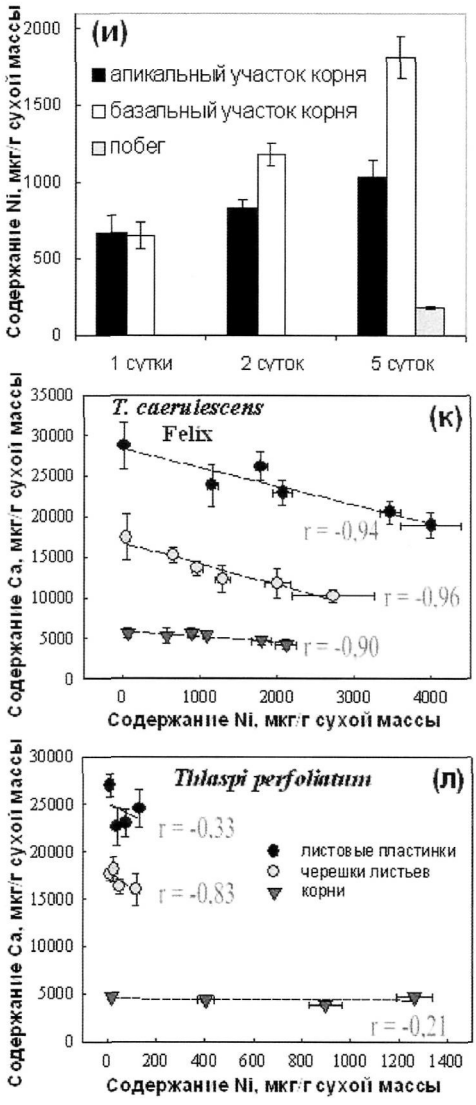


Рис. 6. Распределение Ni в растениях кукурузы (а-е) и *Thlaspi caerulescens* экотипов Felix (ж) и Prayon (з) после 48 ч (а, б, д); 4 суток (в); 7 суток (г, е) или 7 недель (ж, з) инкубации на растворах $Ni(NO_3)_2$ (35 мкМ (а-в, е), 75 мкМ (в, д), 300 мкМ (ж, з) в отсутствие Ca (а), в присутствии Ca (б-з). (г) – апикальный участок корня, (з) – нижняя эпидерма листа. (и) – содержание Ni в проростках кукурузы (75 мкМ $Ni(NO_3)_2$). (к, л) – корреляции между содержанием Ni и Ca в растениях *T. caerulescens* и *T. perfoliatum*. **М** – межклетник; **ЗКл, ОКл, ПКл** – замыкающие, основные, побочные клетки.

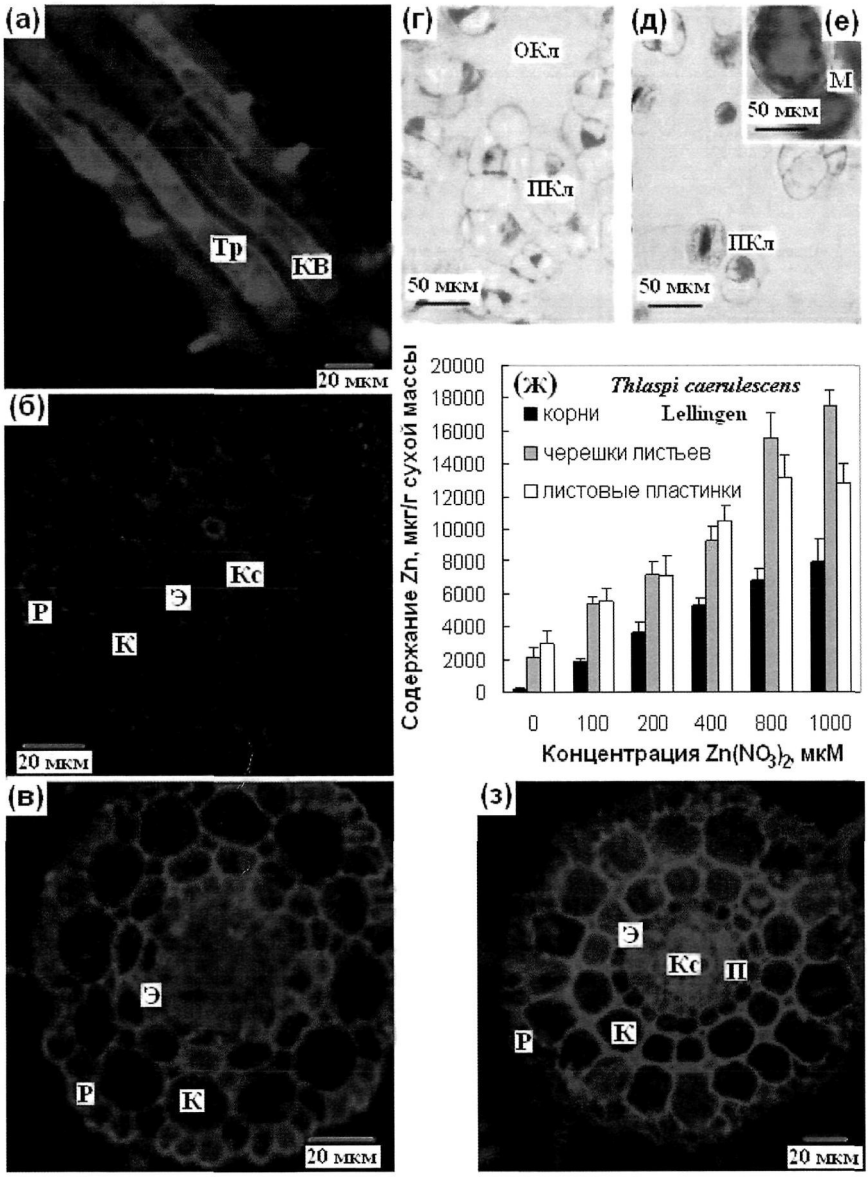


Рис. 7. Распределение Zn в корнях (а-в, з), мезофилле (е), нижней (г) и верхней (д) эпидерме листовой пластинки *Thlaspi caerulescens* (экотип Lellingen) (а-д) и *Thlaspi perfoliatum* (з) после 7 недель инкубации на растворах $Zn(NO_3)_2$ (2 мкМ (а, б), 70 мкМ (з), 200 мкМ (в), 800 мкМ (е), 1000 мкМ (г, д). (ж) – содержание Zn в растениях *T. caerulescens*. Закономерности распределения Zn по тканям при всех изученных концентрациях сохраняются неизменными. **КВ** - корневой волосок, **М** – мезофилл, **Тр** – трихобласт. Остальные обозначения как на рис. 4, 6.

симпласте (мы будем называть такие металлы «симпластическими»), а остальные изученные металлы – преимущественно в апопласте (будем называть такие металлы «апопластическими»). Так как поверхностные клетки чехлика и клетки колумеллы различаются по ультраструктуре и выполняемой функции [Данилова, 1974], можно заключить, что различия в строении различных клеток чехлика не обуславливают каких-либо особенностей распределения этих металлов. Равномерное распределение металлов по клеткам корневого чехлика может определяться функциональной однородностью апопласта, в результате чего Cd, Pb и Sr беспрепятственно поступают в клетки всех слоев чехлика. Ni также проникает в клетки колумеллы, что даст основания полагать, что транспорт Ni по протопластам клеток чехлика ничем не ограничен.

Распределение металлов по клеткам чехлика может изменяться в зависимости от присутствия Ca. Так, в присутствии Ca (3 мМ), Pb и Sr были обнаружены только в поверхностных клетках чехлика (рис. 5н), а содержание Ni во всех клетках чехлика было ниже, чем в отсутствие Ca, что может быть связано с конкуренцией за общие места связывания при транспорте и поступлении ионов в корень. Наиболее выражено явление конкуренции наблюдается в случае Pb, Sr, так как Ca также транспортируется преимущественно по клеточным оболочкам [White, Broadley, 2003].

Разные клетки корневого чехлика кукурузы почти в равной степени накапливают Ni, в то время как клетки чехлика гипераккумулятора *Thlaspi caerulescens* существенно отличаются по этой способности: содержание Ni в клетках колумеллы намного превышало его содержание в периферическом слое клеток и клетках, примыкающих к инициалям. Следовательно, клетки корневого чехлика у разных видов растений различаются по способности накапливать Ni. Пока еще неясно, насколько эти различия обусловлены различиями между исключателями и гипераккумуляторами.

Апикальная меристема корня и зона растяжения. Меристема и зона растяжения характеризуются наличием не полностью дифференцированных тканей.

В меристеме корня находится небольшая группа клеток, названная «покоящимся центром». Содержание Cd и Pb в клетках покоящегося центра проростков кукурузы было ниже, чем в окружающих клетках меристемы, в то время как содержание Sr в клетках покоящегося центра и окружающих его клетках заметно не отличалось (рис. 5м). До конца неясно, какие особенности строения апопласта клеток покоящегося центра определяют ограниченное поступление в них Cd и Pb. Так как транспорт этих металлов происходит преимущественно по апопласту, предполагается, что структура клеточных оболочек и плазмалеммы этих клеток отличаются от структуры оболочек и плазмалеммы окружающих клеток меристемы, что и снижает поступление этих металлов в покоящийся центр [Wierzbicka, 1987]. Однако эти особенности клеточных оболочек клеток покоящегося центра практически не ограничивают поступление Sr, что, по крайней мере отчасти, может определяться более высоким по сравнению со Sr сродством Cd и Pb к материалу оболочек. Не исключено, что апопласт клеток покоящегося центра проницаем для ионов Sr, как он, вероятно, проницаем и для Ca [Peterson, Cholewa, 1998], аналогом которого является Sr.

В незначительной степени ограничивается поступление в покоящийся центр веществ по симпласту. Содержание Ni в покоящемся центре кукурузы было лишь несколько ниже, чем в окружающих тканях меристемы. Можно полагать, что это связано с меньшим, по сравнению с окружающими клетками, количеством плазмодесм между клетками покоящегося центра и клетками окружающих тканей [Clowes, Juniper, 1964].

Таким образом, в зонах деления и растяжения отсутствуют физиологические барьеры для радиального передвижения как «апопластических», так и «симпластических» ионов металлов.

Распределение металлов в меристеме зависит от присутствия Ca, однако его влияние неоднозначно для разных видов растений. Накопление металлов в апексе кукурузы в присутствии Ca уменьшается (рис. 5о, з). Sr обнаруживается только в поверхностных слоях клеток, тогда как Ni поступает вглубь меристемы. Меньшая конкуренция между Ni и Ca по сравнению со Sr и Ca может определяться преимущественным транспортом Ca [White, 1998; White, Broadley, 2003] и Sr по апопласту, в то время как Ni транспортируется в апикальном участке корня главным образом по симпласту. Распределение Ni в присутствии Ca становится еще более неравномерным по сравнению с его распределением в отсутствие Ca. Более интенсивно окрашивается слой клеток, примыкающий к калиптрогену, перицикла и проводящие ткани. В клетках незрелой метаксилемы Ni накапливался в протопластах и, особенно, – на границе с ядерной оболочкой. Важно, что ядра в присутствии Ca практически не окрашивались (рис. 6в). Все это может быть причиной снижения токсического действия тяжелых металлов и Sr на рост корня в присутствии Ca (рис. 1а, 3а).

В апикальном участке корня амаранта в присутствии Ca накапливалось существенно больше Pb, чем в его отсутствие (рис. 4и, к), что сопровождалось усилением ростингибирующего действия (рис. 3в). Одним из возможных объяснений такого изменения в распределении и накоплении Pb является предположение о том, что Pb, накапливающийся в клеточных оболочках может поступать туда из симпласта посредством «контейнерных перевозок» с участием пузырьков Гольджи. Этот процесс является Ca-зависимым, а следовательно, в присутствии Ca содержание Pb увеличивается [Antosiewicz, 2005]. Несмотря на то, что эта гипотеза нуждается в дальнейшем подтверждении, становится очевидным, что для одного и того же металла пути его поступления в корень могут различаться у разных видов растений.

Молекулярный механизм защитного действия Ca изучен еще недостаточно. Показано участие в поступлении тяжелых металлов Ca(II)-транспортера пшеницы LCT1 [Clemens et al., 1998] и других переносчиков [Rogers et al., 2000; Kochian, 2000], а также Ca каналов [Perfus-Barbeoch et al., 2002; Ehlken, Kirchner, 2002] и фитосидерофоров [Kochian, 2000]. Возможно, катион-связывающие участки транспортеров и каналов имеют более высокое сродство к ионам Ca, чем к ионам тяжелых металлов. Поэтому существует пороговая концентрация (3мМ), при превышении которой ионы Ca конкурируют за общие места связывания, в том числе и на переносчиках, в результате

чего поступление тяжелых металлов снижается (рис. 8). В присутствии Ca меньшее накопление тяжелых металлов в корне происходит за счет физико-химических процессов, основанных на конкуренции за поглощение между ионами Ca и ионами тяжелых металлов. При замене Ca на Sr, ионы которого имеют сходные с Ca физико-химические свойства, но который не играет функциональной роли, свойственной Ca [Костюк, 1986], накопление Ni и его ростингибирующее действие уменьшалось в той же степени, что и в присутствии Ca (рис. 8). Накопление Sr в тканях в присутствии Ni также уменьшалось.

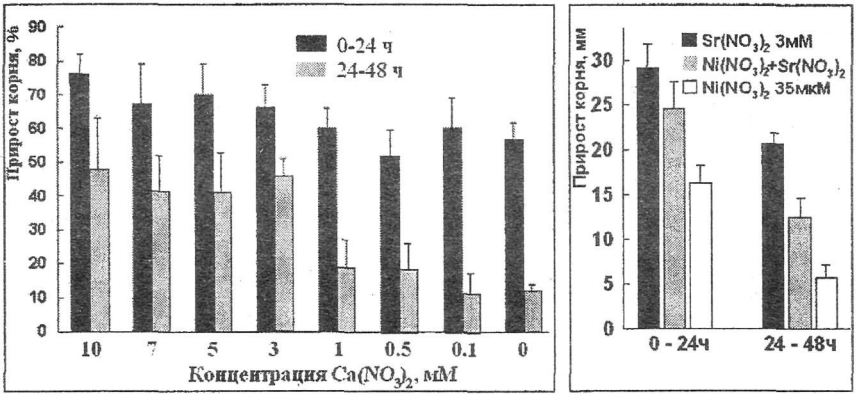


Рис. 8. Прирост корня кукурузы (в % от соответствующего контроля) на растворе 35 мкМ $Ni(NO_3)_2$ в присутствии $Ca(NO_3)_2$ (а) и влияние Sr на ростингибирующее действие Ni (б).

Представляют интерес данные, касающиеся изменения соотношения между Ca и Ni в надземных органах ярутки при увеличении концентрации Ni в растворе. Установлена отрицательная корреляция между содержанием этих двух элементов, которая прослеживалась только для двух экотипов *T. caerulescens* (St.Felix и Prayon), тогда как для экотипа Lellingen её не наблюдалось, а у *T. perfoliatum* она прослеживалась только для черешков листьев (рис. 6к, л). Последнее явление пока трудно объяснить. Уменьшение содержания Ca при увеличении концентрации Ni в растворе, вероятно, можно рассматривать не только как результат конкуренции за общие места связывания при поглощении и транспорте, но и как один из механизмов токсического действия Ni. Можно предположить, что несмотря на различия в распределении, поступление Ni, Sr и Ca в корень опосредовано сходными механизмами, например, через Ca каналы. Однако должны существовать и другие пути поступления металлов, так как Ca каналы большую часть времени остаются закрытыми, в результате чего поддерживается низкая концентрация Ca в цитоплазме [White, 2000; White, Broadley, 2003].

Таким образом, ткани апикального участка корня исключателей, где отсутствуют физиологические барьеры для радиального передвижения металлов, можно рассмат-

ривать в качестве тканей-накопителей, где металлы накапливаются только в отсутствие ионов конкурентов.

Рассмотрев особенности распределения и передвижения изучаемых металлов в растущем участке корня, остановимся более подробно на распределении и передвижении металлов в зоне корневых волосков и зоне дифференцированных тканей.

Ризодерма. При выращивании проростков кукурузы на растворах солей тяжелых металлов, они выявлялись в клетках ризодермы (рис. 6г), причем их содержание, как и в других тканях, увеличивалось со временем.

Ризодерма всех изученных нами видов состоит из удлиненных, расположенных в один слой клеток (рис. 4а). Клетки ризодермы (трихобласты) способны к образованию корневых волосков. Вопрос о их роли в поглощении металлов остается мало изученным. С одной стороны, при выращивании проростков кукурузы на растворах тяжелых металлов в чашках Петри, все изученные металлы были обнаружены в хорошо развитых корневых волосках. С другой стороны, в водной культуре, когда новые корневые волоски у кукурузы развиваются очень слабо, металлы также беспрепятственно поступали в ткани корня, из чего можно заключить, что само по себе наличие корневых волосков не определяет поступление металлов в корень.

Не исключено, что роль ризодермы в поглощении и накоплении различных тяжелых металлов неодинакова. Так, например, Cd, Pb и Sr обнаруживались главным образом в апопласте клеток ризодермы, в то время как Ni накапливался преимущественно в протопластах (рис. 6г). Накопление Zn в атрихобластах и трихобластах обоих видов ярутки существенно различалось: Zn накапливался главным образом в трихобластах и растущих корневых волосках (рис. 7), чего не наблюдалось для других металлов..

Первичная кора. Значительную часть площади поперечного сечения корня занимают клетки коры (рис. 6г). Кора значительно увеличивает диаметр и площадь поверхности корня, что может играть важную роль в накоплении тяжелых металлов. Однако распределение разных металлов, в том числе и в клетках коры, существенно различается. Вклад клеток коры в накопление металлов, транспорт которых происходит по апопласту или по симпласту, будет неодинаков. Для ионов, передвигающихся по апопласту (Cd, Pb, Sr), наиболее важную роль будет играть «емкость апопласта» клеток коры, которая включает межклетники, клеточные оболочки и периплазматическое пространство. Для металлов, накапливающихся преимущественно в протопласте (Ni) важна «общая емкость протопласта» клеток коры. Вероятно, чем выше эти показатели для данного вида растений, тем больше металла может накапливаться в соответствующем компартменте. Важно, что основной объем зрелых клеток коры занимает центральная вакуоль, а слой цитоплазмы местами не превышает толщины клеточных оболочек [Данилова, Стамболцян, 1975]. Основываясь на этих общих предположениях, сравним вклад апопласта и протопласта в связывании ионов.

Емкость апопласта зависит от объема межклетников и катионобменной способности клеточных оболочек, что в свою очередь зависит как от их состава, так и от сродства ионов металлов к материалу оболочек.

При выращивании растений в присутствии Cd и Pb, их высокое содержание было выявлено в клеточных оболочках кукурузы (рис. 4б, г), люпина (рис. 4ж, з), амаранта (рис. 4к). Однако прочность связи различных ионов металлов с компонентами клеточной оболочки неодинакова. Она коррелирует с величиной констант стабильности (log *K*) комплексов металлов с карбоксильными группами углеводов. Для Pb, например, log *K* равен 6.4, а для Cd – 4.9 [Рудакова и др., 1988]. Сродство других тяжелых металлов к полигалактуроновой кислоте уменьшается в ряду: Pb > Cr > Cu > Ca > Zn [Ernst et al., 1992]. Как результат, Pb связывается с материалом клеточных оболочек сильнее, чем Cd, Zn и Sr, а следовательно и скорость его передвижения по апопласту наименьшая. Среди изученных ионов Sr наиболее мобилен. Сравнение констант стабильности ясно показывает, что тяжелые металлы могут успешно конкурировать с Ca за места связывания в «замковых зонах» пектинов.

Клеточные оболочки, связывая большое количество металлов, могут ограничивать их поступление в цитоплазму. Связывание металлов в клеточных оболочках, главным образом, клеток коры, можно рассматривать как один из морфофизиологических механизмов детоксикации, направленный на изоляцию металла в метаболически малоактивном компартменте клетки. Многослойную кору растений-исключателей можно рассматривать в качестве ткани-аккумулятора для ионов металлов, обладающих высоким сродством к материалу оболочек и пониженной способностью поступать внутрь клетки (Pb и в меньшей степени – Cd). Кора является тканью-аккумулятором только в том случае, когда экзодерма не выполняет барьерной роли, а эндодерма, напротив, выполняет роль барьера, ограничивающего поступление тяжелых металлов в центральный цилиндр. Если же барьерной роли эндодерма не выполняет и поток ионов в более глубокие ткани корня не ограничен, то и в коре металл будет выявляться, но не накапливаться, как это наблюдается в случае Sr (рис. 5а) и Zn (рис. 7).

Емкость апопласта определяется не только связыванием металла материалом клеточных оболочек, но и их поступлением в периплазматическое пространство и накоплением на поверхности протопласта. Действительно, Pb, Sr (рис. 4д, 5ж) и Cd были найдены не только в самих клеточных оболочках, но и на поверхности протопласта, что четко демонстрирует характер распределения металлов в плазмолизированных клетках. Более сложная ситуация прослеживается в случае Ni. В плазмолизированных клетках он был обнаружен как внутри протопласта, так и в периплазматическом пространстве. Хотя Ni выявлялся в межклетниках, в самих клеточных оболочках его содержание было низким (рис. 6д), что, вероятно, определяется его низким сродством к их материалу.

Таким образом, наряду с клеточными оболочками, играющими роль аккумулятора тяжелых металлов, плазмалемма играет роль важнейшего внутриклеточного барьера, ограничивающего проникновение Cd, Pb и Sr в цитоплазму. Возможность симпластного транспорта для ионов Cd, Pb и Sr ограничена, хотя и не исключена полностью. Накапливаясь на

поверхности протопласта, тяжелые металлы вызывают разнообразные нарушения в строении и функционировании плазматической мембраны [Meharg, 1993; Ouariti et al., 1997], в результате чего их поступление в клетки может увеличиваться пассивно. Все эти изменения, наряду с инактивацией мембранных ферментов, могут привести к нарушению ионного гомеостаза в клетке.

Накопление Cd и Pb в клетках коры обуславливает токсическое действие на них тяжелых металлов. Однако накопление металлов в клетках коры приводило их к гибели только при концентрациях, полностью ингибирующих рост корня, что было показано при использовании красителя проционового яркоголубого RS, проникающего только в мертвые клетки (рис. 9а). Накопление Cd в клетках наружной коры может быть также одной из причин утолщения клеточных оболочек этих клеток, которое оценивали по их автофлуоресценции и которое наиболее четко наблюдалось на расстоянии 3-4 см от кончика корня (рис. 9б). Подобные модификации оболочек могут иметь важное значение, ограничивая поступление металлов по апопласту.

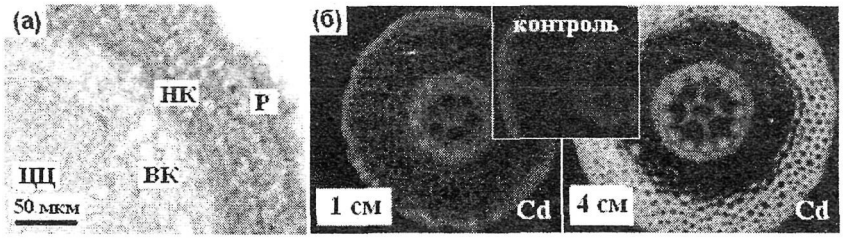


Рис. 9. (а) – отмирание клеток ризодермы и наружной коры апикального участка корня после инкубации проростков кукурузы на растворе $Pb(NO_3)_2$ (0.1 мМ) в течение 24 ч, (б) – утолщение клеточных оболочек коры корня на расстоянии 3-4 см от кончика после инкубации в течение 5 суток в присутствии 38 мкМ $Cd(NO_3)_2$ (автофлуоресценция). Обозначения как на рис 4. **ЦЦ** – центральный цилиндр.

Гистохимический анализ распределения Ni при разных условиях эксперимента показал, что в клетках коры корня кукурузы, за исключением внутренней коры, содержание Ni на единицу площади клетки невелико. Накопления значительного количества металла в вакуоли также, по-видимому, не происходит (рис. 6д). Таким образом, для «апопластических» ионов кора является важнейшей тканью-аккумулятором, в то время как для «симпластических» ионов тяжелых металлов ее роль сводится только к передвижению металлов по радиусу корня и накоплению во внутренней коре.

Клеточные оболочки наружного слоя коры (экзодермы) в базальном участке корня кукурузы утолщаются, в результате чего экзодерма часто рассматривается в качестве апопластического барьера [Hose et al., 2001]. Металлы, передвигающиеся по апопласту (Cd, Pb), аккумулируются во всех слоях клеток коры (рис. 4б), хотя в базальном участке корня их содержание в более внутренних от экзодермы слоях клеток ниже. Как по-

казали исследования с локальным воздействием высоких концентраций Cd и Pb на ограниченный участок корня, вертикальное передвижение этих металлов по клеткам коры ограничено. Отсюда можно полагать, что часть металлов проходит через модифицированные клеточные оболочки экзодермы. Ni накапливался в протопластах клеток экзодермы в базальном участке корня, в то время как содержание металла в подлежащем слое коры было существенно ниже. Sr, в отличие от Cd, Pb и Ni, свободно поступал через клетки экзодермы в прилежащие ткани (рис. 5). Все эти данные свидетельствуют о том, что барьерная функция экзодермы, так же как и в случае эндодермы, не универсальна. Именно эффективность тканевых барьеров (экзо- и эндодермы) наряду с другими факторами, рассмотренными выше, определяет функционирование всей коры или только наружного ее слоя в качестве ткани-аккумулятора.

У всех изученных экотипов гипераккумулятора *T. caerulescens* и у исключателя *T. arvense* кора представлена только двумя слоями клеток. Ni не накапливается в клетках коры корня *T. caerulescens* вплоть до концентрации соли Ni в растворе 400 мкМ (рис. 6ж), что в 20 раз больше концентрации, при которой Ni накапливался в коре корня *T. arvense* и в 5 раз больше концентрации, при которой наблюдалось высокое содержание Ni во всех тканях корня кукурузы. Принимая во внимание, что большинство гипераккумуляторов представляют собой растения с маленькой биомассой и низкой скоростью роста, можно предположить, что аккумулирующая способность корневой системы у таких видов понижена, но взамен этого они обладают более эффективными механизмами транспорта металлов в надземные органы.

Одно из возможных объяснений данного явления заключается в том, что растения *T. caerulescens* неспособны эффективно транспортировать Ni в вакуоли клеток корня, в то время как у *T. arvense* он закачивается в вакуоль. Эта точка зрения согласуется с результатами Lasat с соавт., которые показали, что вакуолярная фракция Zn у *T. caerulescens* была меньше, чем у *T. arvense* [Lasat et al., 1998]. Немаловажную роль в этом могут играть низкомолекулярные хелаторы, такие как гистидин, на чем мы более подробно остановимся ниже.

Таким образом, первичная кора корня исключателей является основной аккумулирующей тканью для ряда тяжелых металлов, способность клеток которой накапливать металлы зависит как от сродства ионов к функциональным группам пектинов оболочки, так и от эффективности функционирования экзодермального и эндодермального барьеров.

Эндодерма. Хорошо известно, что эндодерма является важнейшим функциональным барьером, ограничивающим поступление Pb в центральный цилиндр корня у целого ряда видов [Wierzbicka, 1987; Ksiazek, Wozny, 1990; Tung, Temple, 1996]. Аналогичные данные были нами получены на корнях однодольных (кукуруза) и двудольных (люпин) растений. Pb был обнаружен главным образом в ризодерме и коре (рис. 4б, в, з). Эндодерма у 3-4 дневных проростков вышеупомянутых видов в среднем участке корня находилась на разных стадиях развития. В то время, как у кукурузы выявлялись

только пояски Каспари, у люпина утолщение распространялось и на внутренние тангентальные клеточные оболочки. Следовательно, для ограничения транспорта Pb достаточно формирования поясков Каспари и необязательно развития суберинового пластинки и U-образных утолщений. Так как пояски Каспари присутствуют фактически у всех сосудистых растений [Peterson, Cholewa, 1998], можно полагать, что барьерная роль эндодермы для ионов Pb и аналогичных веществ, транспорт которых происходит по апопласту, универсальна для всех видов растений.

Барьерная роль эндодермы определяется не только суберинизацией клеточных оболочек, но и малой проницаемостью плазмалеммы, плотно прилегающей к оболочке в области пояска [Данилова, 1974]. В результате передвижение ионов по периплазматическому пространству становится невозможным, а клетка получает возможность контролировать поступление ионов в симпласт, а следовательно, и в центральный цилиндр. Поэтому существует определенный концентрационный порог токсичных ионов в апопласте (скорее всего – в периплазматическом пространстве), при превышении которого нарушается структура и функционирование плазмалеммы, увеличивается ее проницаемость, а следовательно, ионы металлов беспрепятственно проходят в ткани стелы. Действительно, при летальных концентрациях Pb в растворе, он был обнаружен во всех тканях корня уже после первых суток инкубации (рис. 4г). Важно, что при данной концентрации, как показали исследования с использованием проционовых красителей, клетки эндодермы оставались живыми (рис. 9а). Следовательно, неконтролируемое поступление Pb в центральный цилиндр было обусловлено только нарушением проницаемости мембраны эндодермы, а не являлось следствием отмирания ее клеток.

Важно выяснить, насколько универсальна барьерная роль эндодермы для разных ионов. Транспортируясь по апопласту клеток коры, Sr, в отличие от Cd и Pb, уже через сутки после начала инкубации был обнаружен во всех тканях корня (рис. 5а, б). Проникновение металлов через эндодерму не может быть результатом изменения свойств гидрофобного слоя поясков Каспари или особенностей упаковки и состава углеводов клеточных оболочек в корнях. При передвижении через эндодерму ионы должны пройти через цитоплазму этих клеток. Содержание Sr в эндодерме было достаточно высоким, причем интенсивное окрашивание, свидетельствующее о его присутствии, было обнаружено в протопластах клеток (рис. 5а). Исходя из этого, можно предположить, что его транспорт через эндодерму осуществляется по симпласту.

Поступление Ni в протопласты клеток определяет иное, по сравнению с Cd и Pb, распределение по тканям корня. Уже на вторые сутки инкубации Ni был выявлен во всех тканях корня, включая центральный цилиндр (рис. 6а). Однако эти данные еще не свидетельствуют о том, что эндодерма проницаема для ионов Ni. Ni, так же как Cd и Pb, мог поступать в центральный цилиндр через апикальный участок корня, где пояски Каспари еще не развиты. Для выяснения этого вопроса проростки кукурузы инкубировали на растворах с нетоксичной концентрацией $Ni(NO_3)_2$ (1 мкМ). В этих опытах

кончик корня отрезали, а поверхность среза замазывали ланолином или вазелином, которые предотвращали поступление Ni в корень через поверхность среза. Размер отрезанного участка корня составлял 1 см, что незначительно превышало в совокупности длину зоны деления и растяжения у проростков кукурузы. Отсутствие Ni под ланолиновым чехлом свидетельствовало как об ограниченном поступлении металла из вышележащего участка корня, так и об отсутствии существенного проникновения Ni через ланолин или вазелин. Однако в базальном участке корня Ni был обнаружен не только в ризодерме и коре, но и в тканях центрального цилиндра, и особенно в эндодерме.

Таким образом, эндодерма проницаема для ионов Ni, хотя в интактных корнях нельзя исключить их поступление через апикальный участок корня. Степень проницаемости эндодермы для ионов Ni невысока. В тканях центрального цилиндра и даже в перицикле содержание Ni было ниже, чем в эндодерме (рис. 6а, е). Об этом можно судить, так как клетки эндодермы, перицикла и ксилемной паренхимы имеют соизмеримый размер на поперечном срезе. Можно предположить, что накопление большого количества Ni в эндодерме определяется как наличием в этих клетках крупной вакуоли [Grymaszewska, Golinowski, 1987], так и присутствием большого количества белка, о чем свидетельствует интенсивное окрашивание клеток эндодермы проционовым синим RS. В этом проявляются свойства эндодермы как ткани-аккумулятора Ni при потере ее барьерных свойств.

Следовательно, барьерная роль эндодермы для Cd и Pb характерна для растений-исключателей из разных классов цветковых растений и в этом отношении, по-видимому, универсальна. В то же время барьерная роль эндодермы не универсальна для разных металлов (Ni, Sr) и зависит от способа передвижения металлов по тканям корня, что в свою очередь может определяться как физиологическими особенностями растений, так и физико-химическими свойствами ионов металлов.

Распределение Ni в клетках эндодермы исключателей и аккумуляторов различается. У кукурузы эндодерма играет роль аккумулятора Ni, в то время как у *T. caerulescens* содержание Ni в клетках эндодермы было часто ниже предела определения гистохимического метода даже при концентрации $Ni(NO_3)_2$ в растворе в 5 раз большей (рис. 6ж). Маловероятно, что Ni поглощается и поступает в проводящие ткани только в апикальном участке корня, где всегда наблюдается наиболее интенсивное окрашивание тканей. Надо полагать, что наряду с незначительной аккумулирующей способностью клеток коры корня *T. caerulescens*, эндодерма проницаема для Ni и не участвует в его накоплении. В отличие от *T. caerulescens*, клетки корня *T. perfoliatum* и *T. arvense* накапливали определяемые количества Ni в клетках коры и эндодермы при концентрации $Ni(NO_3)_2$ в растворе в 20 раз меньше. Понятно, что токсическое действие Ni на клетки корня исключателей будет больше, чем у гипераккумуляторов. Отсутствие барьерной роли эндодермы у ярутки показано также для Sr и Zn (рис. 7).

Итак, в отличие от Cd и Pb, Ni способен поступать в центральный цилиндр через эндодермальный барьер, и эта способность проявляется в большей степени у расте-

ний-гипераккумуляторов. Такие особенности передвижения и распределения Ni могут являться одной из причин наличия в природе намного большего числа растений гипераккумуляторов Ni по сравнению с аккумуляторами Cd и Pb [Salt, Ensley, 2000].

Перицикл и паренхима стелы. Роль клеток перицикла в передвижении ионов, в том числе и тяжелых металлов, мало изучена. Металлы, которые не проникают через эндодермальный барьер (Cd и Pb), практически не поступают в клетки перицикла (рис. 4з). Однако ионы, которые проходят через эндодерму по симпласту, выявляются в перицикле. Среди изученных металлов локализация Ni и Sr в перицикле существенно различалась: Ni накапливался в протопластах клеток перицикла проростков кукурузы (рис. 6а, г, е), в то время как Sr выявлялся преимущественно в клеточных оболочках (рис. 5в, и). Полученные данные свидетельствуют о том, что Sr, пройдя через эндодерму по симпласту, вновь транспортируется через плазмалемму и выходит в апопласт. Можно предположить, что Sr, так же как и Ca, поступает в симпласт эндодермальных клеток через Ca каналы и транспортируется через мембрану посредством Ca^{2+}-АТФазы или Ca^{2+}/H^{+} антипортера в клетках стелы на границе с эндодермой [White, 1998].

Содержание Ni в клетках перицикла, хотя и меньше, чем в эндодерме, но зачастую гораздо больше, чем в клетках ксилемной паренхимы (рис. 6а, г, е), в то время как преимущественного накопления Sr в клетках перицикла кукурузы по сравнению с другими тканями центрального цилиндра не наблюдалось (рис. 5в, е, и). При сходных размерах этих клеток на поперечном срезе, мы можем сравнивать содержание металлов на единицу площади клеток по интенсивности их окрашивания. Уменьшение интенсивности окрашивания клеток ксилемной паренхимы по сравнению с перициклом свидетельствует о том, что поступление Ni из клеток перицикла в другие ткани центрального цилиндра ограничено. Причина ограниченного поступления Ni в ткани стелы может заключаться в том, что транспорт Ni в центральном цилиндре происходит по симпласту, а большая часть плазмодесм в перицикле расположена в наружных тангентальных и радиальных оболочках клеток перицикла. Только около 10% плазмодесм у 7-дневных проростков злаков находилось на внутренних тангентальных оболочках [Vakhmistrov, 1981; Вахмистров, 1991]. Ясно, что у таких исключателей как кукуруза, перицикл играет роль «кольцевого коллектора», накапливающего Ni, возможно еще и благодаря высокому содержанию белка, являясь, таким образом, одновременно и тканью-аккумулятором. Впервые коллекторная роль перицикла для ионов калия была показана Д.Б. Вахмистровым [Вахмистров, 1991]. При мощном поступлении Ni из клеток коры, клетки эндодермы и перицикла структурно имеют значительно меньший «выход», аккумулируя тем самым Ni в протопласте. Конечно, подобное явление было бы невозможным, если бы ионы Ni были способны, подобно Sr, проходить через плазмалемму клеток стелы и транспортироваться по апопласту.

В отличие от Ni, содержание Sr в клеточных оболочках клеток перицикла и центрального цилиндра уже после двух суток инкубации было приблизительно одинако-

во. Роль перицикла как «коллектора» ионов свойственна, по-видимому, только для ионов, передвигающихся по симпласту.

Важно установить, играет ли перицикл роль коллектора у гипераккумуляторов. При изученных концентрациях Ni, его накопления в перицикле *Thlaspi caerulescens* не происходило. Следовательно, в корнях гипераккумуляторов отсутствуют не только барьеры для передвижения Ni, но и, что возможно более важно, – отсутствуют ткани-аккумуляторы и ткани-«коллекторы» и, как следствие, корневая система не играет барьерной функции, свойственной исключателям. Причины этих различий могут скрываться как в структурных, так и в физиологических особенностях клеток этих тканей.

Клетки перицикла, расположенные против сосудов ксилемы, наряду с признаками дифференцированных тканей, несут черты ультраструктуры, характерные для меристем, что играет важную роль в заложении и развитии боковых корней. Развитие боковых корней устойчиво к действию большинства тяжелых металлов (табл. 1). Однако причины этой устойчивости различаются. С одной стороны, металлы могут не поступать в перицикл (Cd и Pb) и поэтому не влиять на ветвление корня. С другой стороны, металлы могут проходить через эндодерму, но накапливаться в клетках перицикла в метаболически-малоактивном компартменте – клеточных оболочках. Это свойственно Sr, что наряду с его слабой токсичностью, обуславливает нормальное заложение боковых корней. Уникальным в этом отношении является Ni, для которого перицикл является аккумулятором и «коллектором». Накапливаясь в протопласте и обладая высокой цитотоксичностью, Ni ингибирует ветвление корня, что наблюдалось также у проростков риса даже при более низких, чем в наших экспериментах, концентрациях Ni в растворе [Samantaray et al., 1997].

Ингибирующее действие Ni на образование боковых корней не наблюдалось у *T. caerulescens*, что связано с низким содержанием Ni в клетках перицикла даже при концентрации соли Ni в растворе в 10 раз большей, чем для кукурузы. Перицикл гипераккумуляторов не играет роли аккумулятора и «коллектора» Ni и не препятствует его поступлению в ксилему.

Итак, устойчивость образования боковых корней у исключателей в присутствии тяжелых металлов определяется либо ограниченным их поступлением в клетки перицикла (Cd или Pb), либо накоплением металла в клеточных оболочках (Sr). Различия в ответе на Ni у исключателей и гипераккумуляторов определяются, по-видимому, различиями в накоплении Ni в перицикле как результат отсутствия аккумулирующей и коллекторной функции перицикла у гипераккумуляторов.

Паренхимные клетки стелы включают в себя ксилемную паренхиму и паренхиму сердцевины, клетки которых отличаются по своей структуре. Клетки ксилемной паренхимы в корнях кукурузы имеют утолщенные клеточные оболочки, что также отличает их от паренхимы первичной коры [McCully, Canny, 1988]. Поступая через эндодермальный барьер, уже через сутки после начала инкубации Sr выявлялся в апопла-

сте клеток всех тканей стелы (рис. 5б), что, казалось бы, находится в противоречии с данными о структурных особенностях клеточных оболочек этих клеток. Однако данное противоречие легко объяснить, если принять во внимание, что прочность связывания Sr с материалом клеточных оболочек невысока. Кроме того, значительная часть металла находится на поверхности клеточных оболочек или в периплазматическом пространстве (рис. 5ж). В совокупности это может определять высокую мобильность Sr, в результате чего модификация клеточных оболочек паренхимы стелы не ограничивает его передвижение в более глубокие ткани корня, в том числе в клетки сердцевины (рис. 5б, в, е, и).

Чтобы проверить, для всех ли ионов металлов апопласт ксилемной паренхимы также проницаем, как для ионов Sr, было изучено распределение Cd и Pb в разрезанных вдоль корнях. У таких корней ветвление корня не ингибировалось в присутствии Cd и Pb, хотя эндодерма уже и не выполняла барьерной функции. Этот факт заставляет предположить, что проницаемость апопласта коры и центрального цилиндра для ионов Cd и Pb различна. При гистохимическом исследовании распределения Cd и Pb в разрезанных вдоль корнях было обнаружено, что Cd и Pb проникали только через 2-3 слоя клеток от поверхности разреза, тогда как по коре они доходили до эндодермы. Принимая во внимание, что Cd и Pb могут поступать в стелу и проводящие ткани через апекс корня, где отсутствуют физиологические барьеры для передвижения ионов, клетки ксилемной паренхимы можно рассматривать в качестве избирательного, неуниверсального для разных ионов, барьера, ограничивающего их передвижение по апопласту центрального цилиндра. Данное предположение подтверждается накоплением Cd и Pb только в паренхиме, окружающей сосуды метаксилемы, что для Pb подтверждается другими работами [Tung, Temple, 1996; Pielichowska, Wierzbicka, 2004].

При различиях в транспорте разных ионов по апопласту стелы, транспорт по симпласту ничем не ограничен. Ni, проходя через эндодермальный барьер поступал во все ткани стелы. Его содержание в протопластах клеток стелы было ниже, чем в эндодерме и перицикле (рис. 6а), что определяется аккумулирующей ролью последних.

Проводящие ткани. Ведущая роль в дальнем транспорте ионов по ксилеме отводится сосудам метаксилемы [McCully, 1995]. Основным принципом в организации тканей стелы корня является пространственное разделение флоэмы и ксилемы при непосредственном контакте каждой из этих тканей с перициклом. Cd и Pb в незначительных количествах выявлялись в проводящих тканях корня и побега, особенно при отсутствии ионов-конкурентов в среде, что еще раз свидетельствует о существовании в апикальном участке корня «обходного» пути поступления этих металлов в стелу. Sr уже через двое суток накапливался во всех тканях побега (рис. 5г, д), что свидетельствует об отсутствии барьеров на пути его передвижения. Содержание Ni в надземных органах проростков кукурузы было незначительным. Одной из причин подобного ограниченного поступления Ni в побеги исключателей может являться его накопление в областях перфораций между члениками сосудов метаксилемы (рис. 6б).

Вопрос о возможности транспорта металлов по флоэме до настоящего времени остается до конца не решенным. Как Sr, так и Ni были обнаружены во флоэмных элементах (рис. 5в, и, 6а). Возможность транспорта Ni по флоэме была показана ранее [Zeller, Feller, 1998], однако Sr такой способностью, по-видимому, не обладает [Koranda, Robinson, 1978; Zeller, Feller, 2000] или эта способность ограничена.

Таким образом, у растений-исключателей низкое содержание металлов в надземных органах определяется барьерной функцией корневой системы. Для Cd и Pb эта функция определяется барьерной ролью эндодермы, в то время как для металлов, проходящих через эндодермальный барьер (Ni), могут функционировать иные морфофизиологические барьеры на уровне корня, например накопление в местах перфораций. Все перечисленные барьеры, однако, не универсальны для всех металлов. В отличие от исключателей, у гипераккумуляторов функциональные барьеры на уровне корня и побега отсутствуют.

Ткани надземных органов растений. В побегах исключателей Cd, Pb и Ni были обнаружены в проводящих тканях, в эпидерме, а также, в случае Ni, в клетках эндодермы мезокотиля кукурузы. Особенностью распределения Sr в надземных органах является его накопление во всех тканях побега (рис. 5г, д, к). В побеге кукурузы для Sr характерен апопластный транспорт, для которого в побеге не существует функциональных барьеров.

Иные закономерности распределения металлов можно проследить у гипераккумуляторов, что четко проявляется в случае Ni и Zn. В то время как у исключателей тканями-аккумуляторами являются отдельные ткани корня, то у гипераккумуляторов сходную роль играет эпидерма стебля и листа, в клетках которой наблюдается накопление Ni (рис. 6з) и Zn (рис. 7г, д). Повышенное содержание Ni в эпидерме листа было отмечено и у других гипераккумуляторов [Bidwell et al., 2004; Broadhurst et al., 2004].

Роль отдельных клеток эпидермы в накоплении Ni различна и литературные данные в этом отношении крайне противоречивы. При сравнении распределения Ni у разных экотипов *T. caerulescens* было показано, что Ni накапливается преимущественно в крупных клетках эпидермы стебля, черешка листа и водозапасающих клетках эпидермы листовой пластинки (рис. 6з), причем клетки нижней и верхней эпидермы листа различаются по способности накапливать Ni: в нижней эпидерме эти клетки аккумулируют больше металла, чем те же клетки верхней эпидермы.

Само по себе существование подобных «емкостных» клеток в покровной ткани не определяет способность гипераккумуляторов накапливать Ni в надземных органах, так как подобные клетки, хотя и меньших размеров, имеются у *T. arvense* и *T. perfoliatum*. Их существование является необходимой предпосылкой, определяющей способность к гипераккумуляции, которая проявляется только при отсутствии барьерной функции корневой системы и неограниченном поступлении металла в побег.

Можно ожидать, что если бы накопление Ni в эпидерме определялось бы только явлением транспирации, то наибольшее содержание Ni было бы обнаружено в клетках

устьичного аппарата, что наблюдалось у *T. caerulescens* в случае Sr (рис. 5п). Вероятно, у гипераккумуляторов существует механизм, посредством которого Ni закачивается в «емкостные» клетки, хотя о его металлоспецифичности судить пока рано. Накопление в водозапасающих клетках эпидермы листовой пластинки было показано также для Cd [Cossio et al., 2005] и Zn, хотя содержание Zn в замыкающих клетках устьиц на единицу площади клетки было выше, чем в водозапасающих (рис. 7).

Анализируя полученные данные можно заключить, что все изученные металлы, за исключением Sr и Zn, не способны в какой-либо значительной степени проходить через плазмалемму клеток обкладки пучка и поступать в мезофилл. Именно эта особенность обуславливает поступление Cd, Pb и Ni в клетки эпидермы листа. Накопление Ni в эпидермальных клетках гипераккумуляторов может иметь приспособительное значение.

Рассмотрев роль тканей корня и побега в передвижении и накоплении изучаемых металлов, остановимся более подробно на участии фитохелатинов и гистидина в детоксикации и транспорте тяжелых металлов.

Роль фитохелатинов в передвижении и детоксикации Cd и Pb. Несмотря на преимущественное накопление Cd и Pb в апопласте, незначительное их количество было обнаружено в протопластах клеток корня кукурузы (рис. 4, 10д), куда они поступают разными путями. Из цитоплазмы большая часть металлов поступает в вакуоль посредством Me^{2+}/H^{+} антипорта, существование которого дискуссионно [Salt et al., 1993; Chardonnens et al., 1999; Clemens, Simm, 2003] или энергозависимого транспорта с участием фитохелатинов [обзоры, Cobbett, 2000; Серегин, 2001; Clemens et al., 2002]. В вакуоли тяжелые металлы образуют трудно растворимые комплексы с органическими кислотами [Krotz et al., 1989; Mazen, Maghraby, 1997/98], что является одним из механизмов их детоксикации.

Фитохелатины представляют собой небольшие, богатые цистеином пептиды, способные связывать ионы тяжелых металлов через SH-группы, и играют наибольшую роль в детоксикации Cd [Rauser, 1999; Cobbett, 2000; Серегин, 2001; Clemens et al., 2002], тогда как в детоксикации Ni участия не принимают [Schat et al., 2002]. Однако синтез фитохелатинов у проростков кукурузы впервые нами наблюдался и в присутствии Pb, хотя и в меньшей степени по сравнению с Cd (рис. 10г), что может определяться не только более ограниченным, по сравнению с Cd, поступлением Pb в цитоплазму, но и меньшей способностью последнего активировать фитохелатинсинтазу [Grill et al., 1989; Chen et al., 1997]. Методом высокоэффективной хроматографии были обнаружены не только фитохелатины с С-терминальным глицином (PC2–PC5), но и гидроксиметилфитохелатины с С-терминальным серином (serPC2–serPC5) с наибольшим содержанием изоформ с 2–3 γ-Glu-Cys остатками (рис. 10г). Содержание фитохелатинов в базальном участке корней кукурузы было в несколько раз выше, чем в апикальном, что противоречит ранее полученным данным [Tukendorf, Rauser, 1990], но согласуется с данными по содержанию металлов, которые были получены с помощью атомно-абсорбцион-

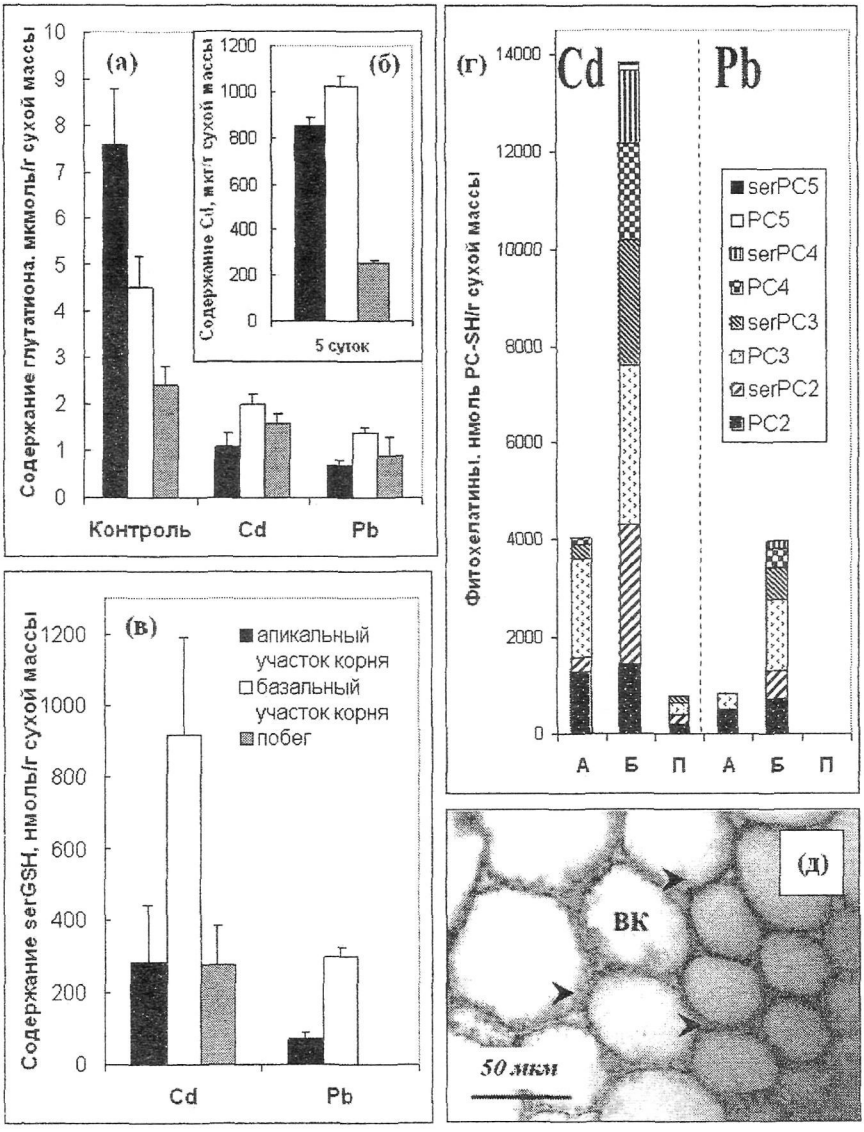


Рис. 10. Содержание GSH (а), Cd (б), serGSH (в) и фитохелатинов (PC) (г) после 5 сут инкубации проростков кукурузы (38 мкМ $Cd(NO_3)_2$ или 10 мкМ $Pb(NO_3)_2$). У контрольных проростков serGSH и фитохелатины не обнаружены. **А** – апикальный участок корня (1-й см от кончика корня); **Б** – базальный участок корня (3-й см от зерновки); **П** – побег (мезокотиль, колеоптиль и первая пара листьев). (д) – накопление Pb в апопласте коры (➤). **ВК** – внутренняя кора. Повторность всех экспериментов трехкратная.

ного и гистохимического методов (рис. 10).

Индукция синтеза фитохелатинов согласуется с уменьшением содержания глутатиона (GSH) как в апикальном, так и в базальном участках корня, а также с накоплением гидроксиметилглутатиона с С-терминальным серином (serGSH) (рис. 10а, в), что свидетельствует о том, что эти соединения являются субстратами для синтеза фитохелатинов.

Являясь индикаторами поступления ряда тяжелых металлов в цитоплазму [Keltjens, van Beusichem, 1998], присутствие фитохелатинов свидетельствует о поступлении некоторого количества Cd и Pb в цитоплазму. Связывание Cd и Pb с фитохелатинами в цитоплазме является одним из механизмов их детоксикации.

Вопрос о соотношении между количеством Cd и Pb, находящихся в клеточных оболочках и протопласте окончательно не решен. Как и в наших опытах, в ряде работ показано преимущественное накопление Cd в апопласте [Vazquez et al., 1992b; Kupper et al., 2004], тогда как результаты других исследований [Rauser, Ackerley, 1987; Vazquez et al., 1992a] свидетельствуют об обратном или же Cd был найден как в апопласте, так и в вакуоли [Wojcik et al., 2005; Cosio et al., 2005]. Данные противоречия могут объясняться различиями по способности накапливать металл между видами растений, разными концентрациями металла в среде и другими причинами.

Роль гистидина в передвижении и накоплении Ni у гипераккумуляторов и исключателей. Для понимания феномена гипераккумуляции важно выяснить физиологические механизмы, определяющие способность растений накапливать тяжелые металлы в надземных или подземных органах. Анализ литературы [Kramer et al., 1996; Persans et al., 1999; Assuncao et al., 2003; Ingle et al., 2005] показывает, что немаловажное значение в передвижении и накоплении Ni может играть гистидин, чья роль, однако до сих пор оставалась мало изученной, а в литературе по этому вопросу имеются противоречивые данные.

В наших экспериментах по изучению роли гистидина в передвижении и накоплении Ni в качестве гипераккумуляторов были выбраны четыре экотипа *T. caerulescens* (La Calamine, Saint Felix, Monte Prinzera и Lellingen), а также восемь видов гипераккумуляторов из рода *Alyssum* (*A. murale, A. fallacinum, A. corsicum, A. tenium, A. lesbiacum, A. bertolonii, A. pintodasilvae, A. obovatum*). Для сравнения использовали исключатели *T. arvense* и *A. saxatile*.

Для анализа накопления Ni в апикальных участках корней (1-1.5 мм) и в остальной части корневой системы, одномесячные растения *T. caerulescens* выращивали в течение 5 или 10 дней в присутствии 5, 25 или 250 мкМ $NiSO_4$. Для *T. arvense* использовали только концентрации 5 и 25 мкМ $NiSO_4$. Для сбора ксилемного сока 6-7 недельные растения *Thlaspi* и *Alyssum* инкубировали в течение 4 часов на растворах, содержащих 1 мМ L-His или L-Ala (pH 5.5). После предобработки корни отмывали дистиллированной водой, а побеги удаляли, после чего корневые системы инкубировали на ½ раствора Хоглэнда в присутствии 25 или 250 мкМ $NiSO_4$. В качестве контроля служи-

ли растения без предобработки. Анализ содержания Ni проводили методами графитной атомно-абсорбционной спектрофотометрии и пламенной атомно-абсорбционной спектрофотометрии. Содержание гистидина и аланина определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Выявленные различия в накоплении Ni в корнях разных экотипов *T. caerulescens* связаны с различным характером распределения Ni по тканям и участкам корня. У экотипов с низким содержанием Ni (La Calamine), содержание металла в апикальных участках корней было выше, чем в остальной части корневой системы, тогда как у экотипа с высокой способностью накапливать Ni (Monte Prinzera) наблюдалась обратная закономерность (рис. 11а). За исключением экотипа Monte Prinzera, накопления Ni в зрелых тканях корня *T. caerulescens* не наблюдалось (рис. 6ж), тогда как у *T. arvense* Ni накапливался в клетках ризодермы, коры и эндодермы. Содержание Ni в побегах *T. caerulescens* всегда значительно превышало его содержание в корнях.

Очевидно, что накопление металла в побегах гипераккумуляторов нельзя объяснить только отсутствием его накопления в клетках корня. Наряду с пониженной аккумулирующей способностью корневой системы, гипераккумуляторы, по-видимому, обладают более эффективными механизмами транспорта металлов в надземные органы. Загрузка Ni в ксилему ярутки происходит, вероятно, в составе комплекса с никотианамином, причем уровень экспрессии соответствующего транспортера выше у *T. caerulescens*, чем у *T. arvense* [Mari et al., 2006]. В загрузке Ni в ксилему также может принимать участие гистидин.

Увеличение содержания гистидина в ксилемном соке при экспозиции с Ni наблюдалось у гипераккумулятора *A. lesbiacum*, в то время как у чувствительного к Ni *A. montanum* подобных изменений обнаружено не было [Kramer et al., 1996]. В наших экспериментах было показано, что предобработка гистидином стимулирует загрузку Ni в ксилему у всех экотипов *T. caerulescens* (за исключением La Calamine при 25 мкМ) и не стимулирует у *T. arvense* (рис. 11б), что согласуется с результатами, полученными для *Brassica juncea* [Kerbeb, Kramer, 2003]. Предобработка гистидином приводила к существенному увеличению его содержания в ксилемном соке как у всех изученных экотипов *T. caerulescens*, так и у *T. arvense* (рис. 11г, д), что свидетельствует о его поглощении корнями и поступлении в ксилему. Принимая во внимание тот факт, что конститутивное содержание гистидина у всех экотипов *T. caerulescens* было примерно одинаково и значительно выше, чем у *T. arvense* (рис. 11е), эти результаты свидетельствуют о том, что образование комплекса Ni с гистидином предотвращает поступление Ni в вакуоли клеток корня *T. caerulescens*. Уровень гистидина в корнях разных экотипов *T. caerulescens* определяет количество металла, поступившего в ксилему, а следовательно, и в надземные органы. С этой точки зрения представляет интерес тот факт, что при концентрации $NiSO_4$ 25 мкМ предобработка гистидином не приводила к увеличению содержания Ni в ксилемном соке у экотипа La Calamine, тогда как у экотипа Monte Prinzera, накапливающего наибольшее количество Ni, наблю-

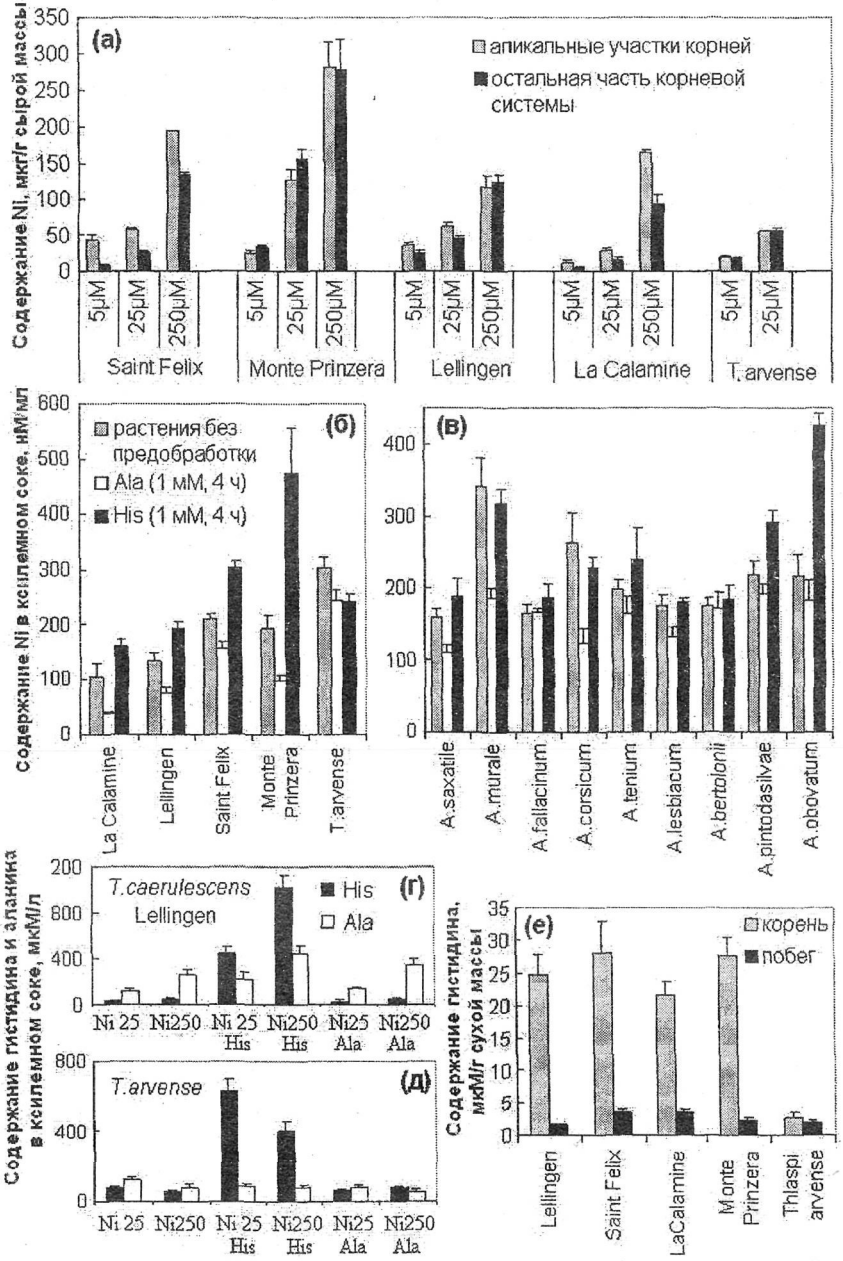


Рис. 11. Роль гистидина в накоплении и передвижении Ni (*продолжение на стр. 37*).

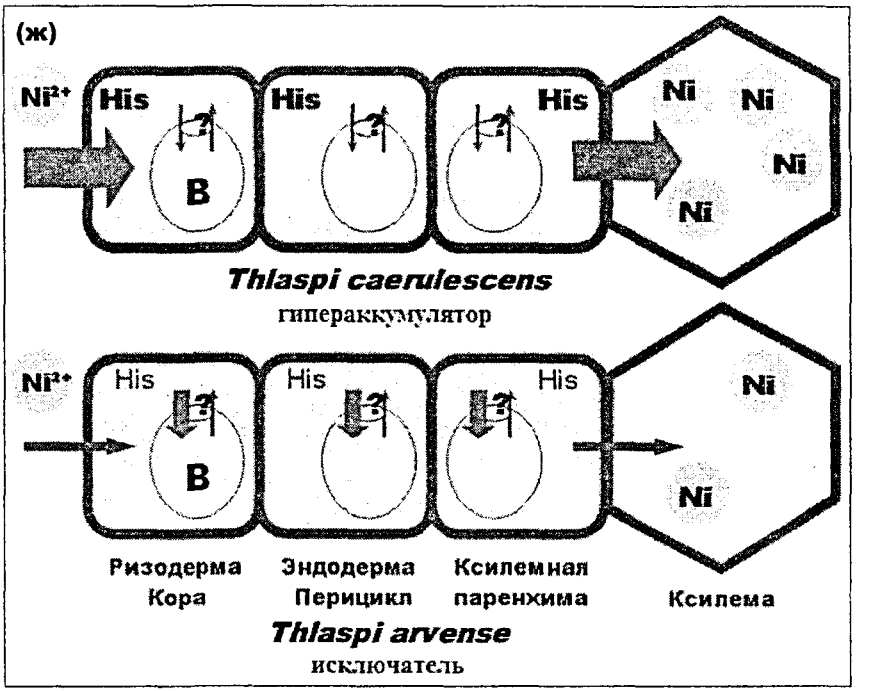


Рис. 11. Роль гистидина в накоплении и передвижении Ni у исключателей и гипераккумуляторов (*начало на стр. 36*). (а) – содержание Ni в апикальных участках корней и остальной части корневой системы исключателя *T. arvense* и четырех экотипов гипераккумулятора *T. caerulescens* после 5 суток инкубации на ½ раствора Хогланда в присутствии разных концентраций $NiSO_4$; (б, в) – влияние предобработки аланином или гистидином на содержание Ni в ксилемном соке исключателей *T. arvense* и *A. saxatile*, а также у гипераккумуляторов *T. caerulescens* и восьми видов из рода *Alyssum* (концентрация $NiSO_4$ 250 мкМ); (г, д) – содержание гистидина и аланина в ксилемном соке. На осях абсцисс концентрации $NiSO_4$ в растворе приведены в мкМ; (е) – эндогенное содержание гистидина; (ж) - схема передвижения Ni в корне гипераккумулятора *T. caerulescens* и исключателя *T. arvense*. Пути передвижения Ni показаны стрелками. Толщина стрелок условно обозначает суммарную величину потока Ni. На схеме приведены некоторые различия в передвижении Ni у этих двух видов. Наряду с отсутствием функциональных барьеров, тканей аккумуляторов и коллекторов в корне *T. caerulescens*, феномен гипераккумуляции может определяться более интенсивным поглощением металла из окружающей среды и отсутствием накопления Ni в вакуолях клеток корня. Последнее может быть связано с более высоким эндогенным уровнем гистидина у *T. caerulescens* по сравнению с *T. arvense*, который образует комплекс с Ni и определяет его более интенсивную загрузку в ксилему у *T. caerulescens*. Можно полагать, что у *T. arvense* этот комплекс поступает в вакуоли клеток корня. Увеличения эндогенного содержания гистидина после инкубации на растворе Ni не происходит. Предполагаемый транспортер(ы) на тонопласте показан знаком **?**. В ксилеме Ni может находиться как в ионной форме, так и в виде комплексов, в том числе и с гистидином. **B** – вакуоль. **His** – гистидин.

далась стимуляция загрузки Ni в ксилему. Отсутствие положительного эффекта после предобработки аланином (рис. 11б) свидетельствует, что наблюдаемое явление свойственно гистидину, а не является общим свойством аминокислот.

Следовательно, помимо различной роли тканей корня у исключателей и гипераккумуляторов, феномен гипераккумуляции может определяться также ограниченным поступлением металла в вакуоли клеток корня *T. caerulescens* и повышенной скоростью поступления Ni в сосуды ксилемы у гипераккумуляторов, в чем важную роль у *T. caerulescens* играет внутриклеточный уровень гистидина. В то же время, у *T. arvense* большая часть поглощенного металла поступает в вакуоль и не загружается в ксилему (рис. 11в). Однако об универсальности роли гистидина в загрузке Ni в ксилему и поступлении в вакуоли клеток корня у гипераккумуляторов и исключателей судить еще преждевременно, так как из 8 изученных гипераккумуляторов из рода *Alyssum*, предобработка гистидином приводила к увеличению содержания Ni в ксилемном соке только у *A. pintodasilvae* и *A. obovatum* (рис. 11в). Причины выявленных различий еще предстоит выявить.

III. Связь между распределением металлов и их токсическим действием на рост

Рост корня определяется делением и растяжением клеток, которые обладают различной чувствительностью к разным воздействиям. До сих пор оставалось неизученным, как особенности передвижения и распределения тяжелых металлов, а также физико-химические свойства их ионов связаны с механизмом ростингибирующего действия тяжелых металлов на клеточном уровне и существует ли какая-либо специфика действия разных металлов на деление и растяжение клеток, связанная с особенностями их передвижения и распределения. Для решения этой задачи было изучено влияние Pb, Sr и Ni на деление и растяжение клеток проростков кукурузы. Исследования проводили в присутствии и в отсутствие Ca, что позволило количественно оценить «защитное» действие Ca.

Клеточный механизм ростингибирующего действия Ni, Pb и Sr. Для выявления структурных изменений в тканях меристемы корня, апикальные участки корней кукурузы (8-10 мм), подвергавшихся в течение 1-2 суток воздействию $Ni(NO_3)_2$ (35 мкМ), $Pb(NO_3)_2$ (10 мкМ) или $Sr(NO_3)_2$ (3 мМ) в присутствии и отсутствие $Ca(NO_3)_2$ (3 мМ), фиксировали в смеси Бродского [Бродский, 1960], заключали в парафин, а затем в канадский бальзам после окрашивания проционовым синим МХ-R для выявления различий в концентрации белков; галлоцианином для выявления РНК с подкрашиванием клеточных оболочек алциановым синим; ШИК-методом, что в совокупности позволило четко выделить клетки покоящегося центра на срезах.

Чтобы выявить избирательность действия металлов на деление и растяжение клеток измеряли среднюю длину меристемы, длину закончивших рост клеток; подсчитывали процент делящихся клеток от общего количества клеток в меристеме (митотиче-

ский индекс, МИ), число клеток меристемы в ряду, определяли продолжительность клеточного цикла и скорость образования клеток в меристеме [Иванов, 1974] (табл. 2).

Для соединений, не действующих избирательно на деление клеток, характерно слабое изменение ингибирования роста корня со временем [Ivanov, 1994], как это наблюдалось в случае Cd, Pb и Sr. Напротив, если вещество избирательно подавляет деления клеток (Ni), то его эффект резко усиливается со временем. Механизм этого заключается в следующем. Растущая часть корня состоит из меристемы, в которой клетки делятся, и зоны растяжения, где они достигают окончательного размера за счет быстрого роста. Скорость роста корня в момент наблюдения определяется ростом растягивающихся клеток, так как они растут значительно быстрее меристематических. Однако рост клетки растяжением продолжается короткое время. Поэтому для поддержания роста корня необходим постоянный переход клеток к растяжению. В нормально растущем корне за время одного митотического цикла к растяжению переходит базальная половина клеток меристемы, но при этом размер меристемы не меняется благодаря продолжающемуся делению клеток в ее апикальной части. Все клетки меристемы, за исключением самых апикальных клеток покоящегося центра, со временем из нее уходят. В большинстве случаев, время жизни большинства клеток в меристеме весьма стабильно. Со временем скорость перехода к растяжению замедляется, что является отражением экспоненциального возрастания числа клеток в потомстве меристематических клеток, переходящих в данное время к растяжению. Следовательно, если вещество тормозит деление и растяжение клеток, то ингибирование роста корня со временем не усиливается, так как с самого начала воздействия рост корня замедляется за счет подавления растяжения.

Поступив в меристематические ткани, Ni, Pb и Sr, несмотря на преимущественную апопластную локализацию последних, ингибируют деления клеток в меристеме, что четко прослеживается по снижению МИ в коре (табл. 2, рис. 12). Падение МИ при инкубации корней на растворах солей Ni и Pb было описано рядом авторов на разных растениях [Wierzbicka, 1994; L'Huillier et al., 1996; Knasmuller et al., 1998; Wierzbicka, 1999; Демченко и др., 2005]. Снижение МИ наблюдалось также в клетках первых трех слоев колумеллы корневого чехлика. Однако в присутствии Sr такого снижения МИ не происходило.

Снижение МИ может быть результатом как изменений длительности клеточного цикла, так и нарушений в прохождении митоза вследствие прямого взаимодействия вещества с ДНК или общего нарушения метаболизма клетки. В присутствии всех изученных металлов продолжительность клеточного цикла возрастала (табл. 2, рис. 12).

Остается до конца неясным, какой вклад в снижение МИ вносит прямое связывание металлов с ДНК и поступают ли металлы в ядро при нелетальных концентрациях. Возможность взаимодействия тяжелых металлов с ДНК показана [Alex, Dupuis, 1989], в результате чего они могут вызывать нарушения в прохождении митоза и хромосомные аберрации [Wierzbicka, 1989, 1994; Lui et al., 1995a, b; Samardakiewicz, Wozny, 2005], а также нарушение синтеза ДНК и РНК [Wojtyla-Kuchta, Gabara, 1991; Gabara, Krajewska,

Таблица. 2. Влияние Ni, Pb и Sr на клеточные параметры роста корня.

Вариант	t, ч	N_m ($\bar{N}_m$)	l_l ($\bar{l}_l$), мкм	V, мкм/сут	T, ч	V_m, сут$^{-1}$	МИ
H_2O		134 ± 9 (129)	176 ± 9 (171)	30000	11.5	186.4	7.1 ± 0.9
Ca 3 мМ		139 ± 5 (131)	156 ± 8 (161)	30000	10.7	202.3	7.3 ± 1.1
Ni 35 мкМ		80 ± 9 (102)	146 ± 7 (156)	17000	25.6	65.9	3.3 ± 0.6
Ni + Ca	24	107 ± 7 (115)	151 ± 14(159)	20000	17.3	110.2	3.6 ± 0.7
Sr 3 мМ		77 ± 3 (100)	187 ± 11(177)	28000	14.8	112.2	4.8 ± 0.7
Sr + Ca		111 ± 9 (117)	150 ± 13(158)	26300	12.7	154.5	5.9 ± 0.3
Pb 10 мкМ		—	117 ± 11(141)	15000	—	—	3.3 ± 0.2
Pb + Ca		120 ± 4 (122)	150 ± 5 (158)	20800	15.9	128.6	4.2 ± 0.5
H_2O		138 ± 8 (136)	156 ± 7 (166)	35000	10.5	214.8	6.1 ± 1.1
Ca		143 ± 8 (141)	128 ± 3 (142)	35000	9.3	250.5	6.9 ± 1.0
Ni		55 ± 4 (68)	116 ± 3 (131)	4000	204.7	5.5	1.8 ± 0.4
Ni + Ca	48	85 ± 9 (96)	126 ± 20(139)	16000	17.0	93.5	4.1 ± 0.5
Sr		69 ± 3 (85)	210 ± 5 (199)	20000	20.2	69.8	4.1 ± 0.1
Sr + Ca		124 ± 3 (118)	125 ± 15(138)	32400	8.0	247.8	5.8 ± 0.3
Pb		—	98 ± 13(108)	13000	—	—	2.3 ± 0.6
Pb + Ca		122 ± 5 (121)	120 ± 10(135)	26800	10.1	200.5	4.9 ± 0.3

Примечание: Среднее число клеток меристемы в ряду вычисляли как среднее значение между числом клеток меристемы исходных растений (123) и растений после первых суток инкубации (в случае 24 ч) и между числом клеток меристемы после первых и вторых суток инкубации (в случае 48 ч). Среднюю длину закончивших рост клеток вычисляли как среднее значение между длинами закончивших рост клеток у исходных растений (166 мкм) и растений после первых суток инкубации (в случае 24 ч) и между длинами закончивших рост клеток после первых и вторых суток инкубации (в случае 48 ч). t – время инкубации; N_m – число клеток меристемы в ряду; $\bar{N}_m$ – среднее число клеток меристемы в ряду; l_l – длина закончивших рост клеток (мкм); $\bar{l}_l$ – средняя длина закончивших рост клеток (мкм); V - прирост корня за сутки (мкм); T - продолжительность клеточного цикла (ч); V_m – скорость образования клеток в меристеме в сутки; МИ– митотический индекс в клетках коры. T и V_m рассчитывали по Иванов, 1974. В каждом случае измерено не менее 100 клеток в 7 корнях.

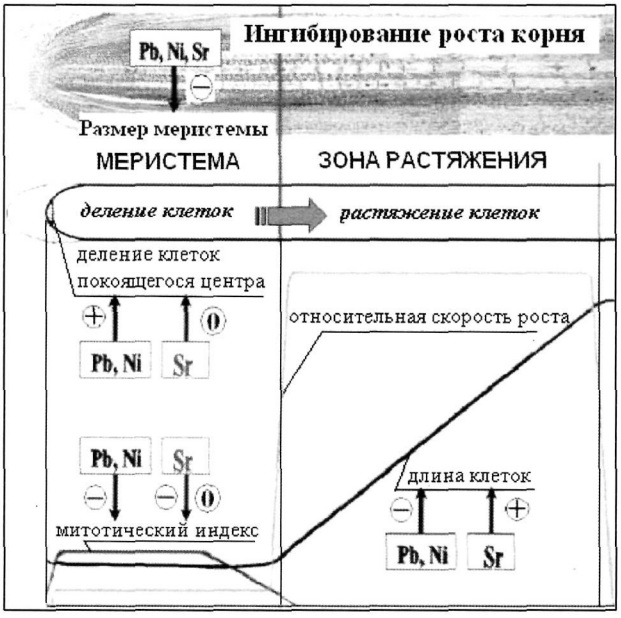


Рис. 12. Действие Pb, Ni и Sr на рост корня.

1997]. Даже для Ni, накапливающегося в протопласте, наиболее интенсивное окрашивание было обнаружено в меристематических клетках кукурузы только вокруг ядра. Само ядро оставалось практически неокрашенным. Не исключено также, что ингибирование делений клеток может быть результатом нарушения цитокинеза, что показано для Pb [Wierzbicka, 1989; Eun et al., 2000] или следствием общего нарушения метаболизма клеток.

Оказывая токсическое действие на деление клеток, металлы вызывали уменьшение размера меристемы. Увеличение продолжительности клеточного цикла в присутствии Ni на вторые сутки примерно в 20 раз свидетельствует о практически полной остановке пролиферации (табл. 2). При таком ингибировании делений клеток уменьшение размера меристемы должно быть более значительным, чем наблюдавшееся в эксперименте. Отсюда можно предположить, что Ni в данной концентрации влияет также на переход клеток к растяжению. О влиянии Pb на переход клеток к растяжению судить сложно в связи с «открыванием» меристемы в результате активации делений клеток покоящегося центра, что сопровождалось образованием нового корневого чехлика (рис. 13).

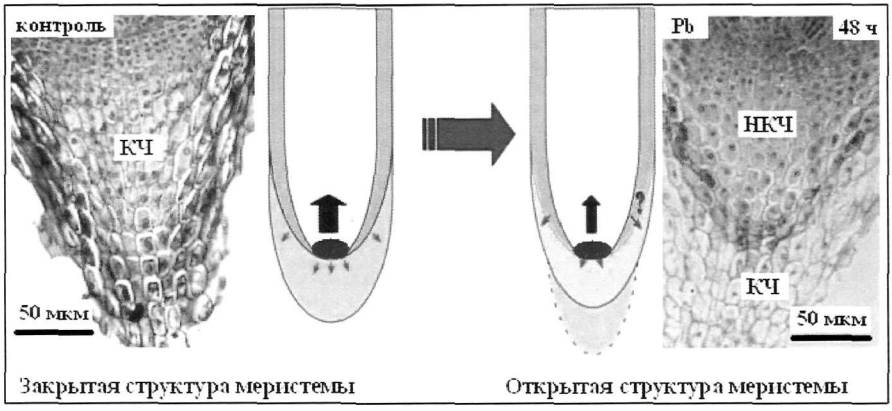


Рис. 13. Схема перестройки меристемы из закрытой в открытую под действием $Pb(NO_3)_2$ (10 мкМ). **КЧ** – корневой чехлик, **НКЧ** – новый корневой чехлик.
- корневой чехлик, - новый корневой чехлик, - дерматоген, - покоящийся центр. Стрелками (⬆) на схемах показаны направления делений клеток.

Накопление металлов в зоне растяжения, особенно в отсутствие конкурирующих ионов, свидетельствует о возможности прямого их действия на растяжение клеток. Однако действие разных металлов на растяжение имеет свои особенности. Накапливаясь преимущественно в апопласте, Pb в большей степени, чем Ni, тормозит растяжение клеток. Напротив, под действием Sr длина закончивших рост клеток увеличивалась примерно на 35% (табл. 2, рис. 12). В этом проявляется специфика механизма ростингибирующего действия Sr.

Одним из механизмов влияния тяжелых металлов на растяжение клеток может быть изменение пластичности клеточных оболочек [Lane et al., 1978; Burzynski et al., 1983; Barcelo et al., 1986]. Чем больше сродство металла к карбоксильным группам уроно-

вых кислот, входящих в состав оболочек, тем в большей степени снижается их пластичность. Отсюда ясно, что Pb, локализуясь в апопласте и обладая наибольшим сродством к функциональным группам пектинов, будет влиять на пластичность оболочек в большей степени, чем Ni, содержание которого в апопласте невелико, а сродство к пектинам незначительно. В отличие от этих металлов, Sr, поглощаясь в зоне растяжения [Мазель, 1989] и накапливаясь в апопласте, образует менее прочные, по сравнению с Ca и Pb, связи с уроновыми кислотами, в результате чего пластичность оболочек может несколько увеличиваться, в том числе и благодаря конкуренции с ионами Ca, аналогом которых он является. Как следствие, при инкубации проростков в присутствии $Sr(NO_3)_2$ в апикальном участке корня часто наблюдаются бесформенные клетки, нарушаются клеточные ряды в меристеме. Однако, по данным В.Б. Иванова [Ivanov, 1994], самые разнообразные вещества и, в том числе не реагирующие с карбоксильными группами, вызывают уменьшение длины закончивших рост клеток при высоких концентрациях. Поэтому нельзя исключить, что действие Pb и тем более Ni на процесс растяжения обусловлено также общим нарушением метаболизма клеток.

В присутствии Ca все изученные ростовые параметры под действием металлов изменяются значительно меньше, чем в отсутствие Ca, что проявляется в меньшем ингибировании роста корня (табл. 2). По-видимому, это связано главным образом с уменьшением накопления металлов в растущем участке корня как результат конкуренции за общие места связывания при поглощении и транспорте.

Таким образом, ростингибирующее действие металлов определяется как общим механизмом неизбирательной токсичности, так и специфическим действием отдельных металлов на определенные ростовые процессы (рис. 12). Результатом первого механизма может быть общее нарушение метаболизма клеток. В результате второго избирательно затрагиваются отдельные процессы роста. Так, Ni, в отличие от других металлов, действует главным образом на деление клеток, и в значительно меньшей степени – на их растяжение, что согласуется с усилением ингибирования роста со временем. Напротив, Sr действует главным образом на растяжение клеток, увеличивая длину закончивших рост клеток, а его действие на деление выражается как в увеличении продолжительности клеточного цикла, так и в снижении митотического индекса. Pb же примерно в равной степени ингибирует деление и растяжение клеток (рис. 12).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время не возникает никаких сомнений относительно важности изучения механизмов адаптации растений к тяжелым металлам. Решение фундаментальных и практических задач в этой области невозможно без понимания роли тканей растений исключателей и гипераккумуляторов в передвижении и накоплении тяжелых металлов, а также без выяснения механизмов ростингибирующего действия металлов – од-

ного из основных показателей токсичности. Проведенный комплексный анализ распределения металлов позволил выявить роль различных тканей растений в накоплении и передвижении металлов. Было показано, что эта роль неодинакова как для разных металлов, так и у растений, относящихся к исключателям и гипераккумуляторам. Все ткани по выполняемым функциям можно разделить на несколько групп (табл. 3).

Таблица 3. Роль тканей корня и побега в поглощении, передвижении и распределении Cd, Pb, Sr, Zn и Ni у растений-исключателей и аккумуляторов.

Орган	Металл / Ткань	Cd(1)	Pb(1)	Sr(1)	Zn(1)	Zn(2)	Ni(1)	Ni(2)
Корень	Ризодерма							
	Наружная кора							
	Внутренняя кора							
	Эндодерма							
	Перицикл							
	Ксилема							
	Флоэма							
	Паренхима стелы							
	Меристема							
Побег	Эпидерма							
	Мезофилл							
	Ксилема							
	Флоэма							

– ткань, участвующая в поглощении, – ткань-аккумулятор, – ткань, в которой металл выявляется, но не накапливается, – ткань, выполняющая барьерную роль, – ткань-коллектор, – проводящие ткани, участвующие в дальнем транспорте, – ткань, в которой металл накапливается только в отсутствие ионов-конкурентов, – содержание металла в ткани незначительно или он в ней отсутствует. (1) – растение-исключатель, (2) – растение-гипераккумулятор.

К первой группе относятся ткани, ответственные за поступление тяжелых металлов в растение из окружающей среды. Основной поглотительной тканью является ризодерма, наличие корневых волосков у которой не определяет саму возможность поступления металлов в корень, а лишь многократно увеличивает площадь его соприкосновения со средой и облегчает поступление ионов в корень (табл. 3).

Ко второй группе относятся *ткани, выполняющие барьерную функцию* – эндодерма и экзодерма, которые ограничивают радиальный транспорт металлов по корню. Барьерная роль этих тканей свойственна только зрелым клеткам с модифицированными клеточными оболочками и не универсальна для всех металлов. Эти ткани могут ограничивать у исключателей только передвижение «апопластических» ионов с низкой способностью поступления в симпласт, что свойственно для Pb и в меньшей степени для Cd, в то время как передвижение «симпластических» ионов ограничивается незна-

чительно. Эндодермальный и экзодермальный барьеры могут быть полными или частичными в зависимости от свойств ионов, концентрации металла в растворе, степени его токсичности, стадии развития клетки, особенностей строения барьерных тканей у разных видов. У гипераккумуляторов тканевые барьеры полностью отсутствуют. Отсутствуют физиологические барьеры для всех изученных металлов и в меристематических тканях обеих групп растений, что может быть связано с недостаточной дифференцировкой клеток барьерных тканей (табл. 3).

К третьей группе тканей можно отнести *ткани-аккумуляторы* и ткани, в которых металл выявляется, но не накапливается. Способность ткани накапливать большие количества тяжелых металлов зависит от целого ряда факторов: анатомических и физиологических особенностей строения ткани и составляющих ее клеток, физико-химических свойств ионов, которые определяют особенности их передвижения по растению, эффективности функционирования физиологических барьеров для радиального транспорта тяжелых металлов, а также от принадлежности растения к исключателям или гипераккумуляторам. Для исключателей основной тканью-аккумулятором «апопластических» ионов является обычно многослойная кора. Многослойность коры определяет большую «емкость апопласта», что необходимо для связывания и детоксикации «апопластических» ионов Cd и Pb. Однако эффективность функционирования этой ткани определяется наличием эндодермального барьера, ограничивающего поступление металлов в центральный цилиндр. Для «апопластических» ионов, способных проходить через этот барьер по симпласту и обладающих высокой мобильностью (Sr, Zn), аккумулирующие свойства коры будут ограничены. В данном случае кора, как впрочем, и другие ткани корня, будет выполнять лишь функцию передвижения металлов по радиусу корня, то есть будет являться тканью, в которой металл выявляется, но не накапливается. Для «симпластических» ионов (Ni) кора также является аккумулятором, за исключением наружных слоев у проростков кукурузы, несмотря на отсутствие эндодермального барьера. У исключателей роль аккумулятора Ni выполняют также клетки экзодермы, эндодермы, перицикла, что определяет особенности передвижения этого металла и его токсического действия на ветвление корня. Высокая аккумулирующая способность свойственна также слизи, выделяемой клетками ризодермы и корневого чехлика, однако она проявляется только в том случае, когда ионы имеют высокое сродство к ее материалу, как это свойственно Pb.

У гипераккумуляторов, в отличие от исключателей, в корне отсутствуют как барьерные ткани, так и ткани-аккумуляторы, в результате чего ионы поступают в надземные органы, а ветвление корня устойчиво не только к «апопластическим» (Sr), но и к «симпластическим» ионам (Ni). Ограниченная способность Ni, в отличие от Sr и Zn, проходить через плазмалемму клеток обкладки пучка в листовой пластинке гипераккумуляторов определяет его поступление в покровную ткань, минуя мезофилл. Благодаря наличию в эпидерме листа водозапасающих клеток с большой центральной вакуолью, эпидерма играет роль аккумулирующей ткани у гипераккумуляторов (табл. 3).

К четвертой группе принадлежат *ткани коллекторы*, роль которых для «симпластических» ионов выполняет перицикл. Основные функция этой тканей – перераспределение ионов по периметру центрального цилиндра, их накопление и участие в поступлении металла в проводящую систему. Коллекторная функция ткани определяется как структурными особенностями клеток ткани, так и спецификой передвижения ионов тяжелых металлов. Благодаря неравномерному распределению плазмодесм по клеточным оболочкам, перицикл кукурузы имеет мощный «вход» «симпластических» ионов (Ni) и значительно меньший «выход», накапливая тем самым большие количества металла в протопласте. Роль коллектора перицикл не играет в случае Sr, который способен проходить через эндодерму и транспортироваться далее по апопласту. Эта ткань не выполняет коллекторной функции также для «апопластических» ионов, которые в значительной степени не поступают в ткани центрального цилиндра через эндодермальный барьер. Поэтому роль перицикла как ткани коллектора не универсальна для всех элементов, а свойственна, по-видимому, только для ионов, передвигающихся по симпласту, причем проявляется только у исключателей. У гипераккумуляторов перицикл не является коллектором и аккумулятором, что определяет нормальное его функционирование в качестве меристемы при образовании боковых корней (табл. 3).

К пятой группе тканей относятся *проводящие ткани, участвующие в дальнем транспорте металлов,* роль которых играют ксилема и флоэма. Sr способностью транспортироваться по флоэме, по-видимому, не обладает или эта способность ограничена. Транспорт Ni по ксилеме у исключателей (кукуруза) может быть ограничен за счет накопления металла в местах перфораций между члениками сосудов ксилемы. Такого явления не наблюдается у гипераккумуляторов. Эффективность транспорта Cd и Pb в побеги исключателей также невысока вследствие наличия барьерных тканей и поступления металлов в центральный цилиндр главным образом через апикальный участок корня, где барьерные ткани не дифференцированы (табл. 3).

Наконец, **к шестой группе** можно отнести *ткани-накопители*, способные к аккумуляции металлов, но только *в отсутствие ионов конкурентов*, что отличает их от тканей аккумуляторов. К таким тканям у исключателей относятся ткани апикального участка корня в зонах деления и растяжения, а также корневой чехлик. За исключением покоящегося центра, в отсутствие, например, Ca, эти ткани накапливают значительные количества металлов, что является причиной их ростингибирующего действия. Содержание тяжелых металлов в клетках покоящегося центра часто ниже, чем в окружающих их клетках меристемы, что может быть обусловлено структурными особенностями его клеток. Благодаря этому, при невысоких концентрациях металлов, не обладающих цитотоксическим действием, возможна активация делений клеток покоящегося центра и восстановление роста корня. Определенную роль в этом восстановлении играют клетки корневого чехлика. В отличие от исключателей, у аккумуляторов содержание металла в растущем участке корня в присутствии других ионов может возрастать, и в этом отношении действие ионов конкурентов не универсально, что

также свидетельствует о возможных различиях в путях поступления тяжелых металлов в меристему у разных видов (табл. 3).

Гетерогенность распределения металлов проявляется не только на тканевом, но также на органном и внутриклеточном уровнях, что во многом определяется крайне неравномерным распределением соответствующих транспортеров не только в клетках разных тканей, но также и в разных клетках одной и той же ткани [Kupper et al., 2007]. Морфофункциональные особенности строения клеток разных тканей, а также различия физико-химических свойств ионов разных металлов определяют различную роль тканей корня и побега в передвижении и распределении металлов. Исходя из вышесказанного, становятся очевидными ограничения, возникающие при анализе содержания металлов или любых других веществ в перерасчете на единицу массы органа, так как их содержание в разных клетках может существенно различаться.

Принадлежность растений к гипераккумуляторам определяется не только структурно-функциональными, но также физиологическими и биохимическими особенностями тканей и клеток корня. К структурно-функциональным особенностям гипераккумуляторов можно отнести отсутствие как барьерных тканей, так и тканей аккумуляторов и коллекторов, вследствие чего их корневая система не выполняет барьерной функции и металлы беспрепятственно поступают в ксилему, а следовательно, и в надземные органы растений. Отсутствие накопления Ni в клетках корня гипераккумуляторов обусловлено высоким эндогенным уровнем гистидина (а возможно, и других низкомолекулярных хелаторов), который, образуя комплекс с Ni, предотвращает его поступление и накопление в вакуолях клеток корня. Связывание Ni с гистидином является причиной его более интенсивной загрузки в ксилему, в результате чего Ni в значительных количествах поступает в надземные органы, где и накапливается в особых водозапасающих клетках эпидермы. Кроме того, способность растений накапливать тяжелые металлы в надземных органах может определяться более эффективными системами поглощения ионов, устойчивых к действию тяжелых металлов, а также более эффективными механизмами детоксикации металлов направленных на поддержание гомсостаза (табл. 4, рис.11).

Накопление тяжелых металлов в подземных органах, а следовательно, и принадлежность растений к исключателям, также как и в случае гипераккумуляторов, определяется не только структурно-функциональными, но также физиологическими и биохимическими особенностями тканей и клеток корня. К структурно-функциональным особенностям можно отнести, например, наличие функциональных барьеров, ограничивающих поступление тяжелых металлов в стелу корня, а следовательно, и в проводящие ткани, в результате чего тканями-аккумуляторами являются отдельные ткани корня. Способность исключателей накапливать Ni в подземных органах, как было продемонстрировано на примере *Thlaspi arvense*, обусловлено существенно более низким эндогенным содержанием гистидина и вероятно ограниченной способностью к загрузке комплекса гистидина с Ni в ксилему, в то время как его поступление в ваку-

оль клеток корня неограниченно. В результате происходит накопление Ni в отдельных тканях корня, которые выполняют роль тканей-аккумуляторов. Кроме того, ограниченная способность исключателей накапливать тяжелые металлы может определяться в целом менее эффективными механизмами детоксикации тяжелых металлов, в результате чего эти виды менее устойчивы к токсическому действию тяжелых металлов (табл. 4, рис. 11).

Способность клеток определенных тканей накапливать тяжелые металлы может с одной стороны являться одним из механизмов их детоксикации и участвовать в адаптации растений к тяжелым металлам, а с другой стороны, при поступлении в цитоплазму, может быть одной из причин их токсического действия. В результате гетерогенности распределения металлов по тканям, токсическое действие может по-разному проявляться в клетках разных тканей у растений с разными стратегиями выживания.

Накопление металлов в растущем участке корня является основной причиной ингибирования роста. В целом токсическое действие тяжелых металлов неизбирательно и определяется взаимодействием с функциональными группами биологически-активных веществ. Сродство к этим группам во многом определяет силу воздействия металла на тот или иной процесс, что проявляется в ингибировании роста органа. Однако для каждого из металлов прослеживается своя специфика, которая выражается в различной степени влияния на отдельные ростовые процессы. Специфика ростингибирующего действия металлов во многом определяется особенностями их передвижения и накопления в разных тканях апикального участка корня.

Таблица 4. Сравнительная характеристика исключателей и гипераккумуляторов Ni.

Исключатели	**Гипераккумуляторы**
Накапливают металлы преимущественно в	
подземных органах	надземных органах
Барьерные ткани в корне	
имеются	отсутствуют
Ткани-аккумуляторы в корне	
имеются (кора, эндодерма, перицикл)	отсутствуют
Ткани-аккумуляторы в побеге	
отсутствуют	имеются
Эндогенный уровень хелаторов (гистидина) в корне	
низкий	высокий
Эндогенный уровень хелаторов (гистидина) в побеге	
низкий	низкий
Скорость поступления металлов в ксилему	
низкая	высокая
Способность накапливать металлы в вакуолях клеток корня	
высокая	низкая
Устойчивость ростовых процессов к действию металла	
ниже	выше

В заключение осталось отметить, что как токсическое действие, так и детоксикация металлов является комплексным процессом и не определяется каким-либо одним механизмом, а является сочетанием различных, зачастую взаимосвязанных, механизмов. Эффективность последних и является, по-видимому, тем главным фактором, который определяет устойчивость растения и способность к гипераккумуляции. Именно особенности передвижения и распределения металлов в корнях растений определяют их способность накапливать металлы в подземных или надземных органах, а следовательно, и их принадлежность к группе исключателей или аккумуляторов.

ВЫВОДЫ

1. Особенности поступления, передвижения и распределения тяжелых металлов в корневой системе определяют возможность их накопления в подземных или надземных органах растений, а следовательно и принадлежность того или иного вида растений к группе исключателей или аккумуляторов, о чем свидетельствует гистофизиологический анализ распределения и накопления Cd, Pb, Ni, Sr и Zn, проведенный с помощью разработанных гистохимических методов.
2. Специфика ростингибирующего действия отдельных тяжелых металлов определяется их разной степенью воздействия на деление и растяжение клеток и зависит как от физико-химических свойств их ионов, так и от особенностей их распределения в растущем участке корня.
3. В зонах деления и растяжения корня отсутствуют физиологические барьеры для передвижения ионов тяжелых металлов. При отсутствии или недостатке ионов-конкурентов (Ca), ткани апикального участка накапливают тяжелые металлы, что является причиной ростингибирующего действия последних. В результате конкуренции с ионами Ca за общие места связывания при поглощении и транспорте, накопление тяжелых металлов в клетках меристемы исключателей уменьшается, с чем связано ослабление их токсического действия на рост.
4. Первичная кора корня исключателей является основной аккумулирующей тканью для ионов Cd и Pb. Значение «емкости апопласта» для разных ионов неодинаково и зависит как от сродства ионов к функциональным группам клеточной оболочки, так и от эффективности функционирования экзодермального и эндодермального барьеров.
5. Эндодерма и экзодерма ограничивают у исключателей радиальное передвижение Cd и Pb, но не Sr и Zn. Для Ni эндодерма исключателей играет роль ткани-аккумулятора, в то время как у гипераккумуляторов как барьерная, так и аккумулирующая функции этой ткани отсутствуют, в результате чего Ni свободно поступает в надземные органы.
6. Перицикл играет роль «коллектора» только для «симпластических» ионов тяжелых металлов (Ni), одновременно являясь тканью-аккумулятором, возможно, за счет

незначительного симпластного «выхода» в центральный цилиндр. Подобная роль перицикла не универсальна и не свойственна гипераккумуляторам.

7. Ветвление корня чрезвычайно устойчиво к действию большинства тяжелых металлов, за исключением Ni, для которого наряду с его высокой цитотоксичностью отсутствуют физиологические барьеры радиального транспорта, а перицикл выполняет роль коллектора и аккумулятора, накапливая Ni в протопластах клеток.

8. В результате отсутствия в корнях гипераккумуляторов барьерных тканей, тканей-аккумуляторов и коллекторов, их корневая система в отличие от исключателей не играет барьерной функции и не ограничивает поступление ионов в побег, а ветвление корня у гипераккумуляторов устойчиво даже к «симпластическим» ионам с высокой цитотоксичностью.

9. В то время как у исключателей тканями-аккумуляторами являются отдельные ткани корня (внутренняя кора, эндодерма, перицикл), у гипераккумуляторов сходную роль играет эпидерма стебля и листа, способность отдельных клеток которой накапливать тяжелые металлы различается.

10. Принадлежность растений к исключателям или гипераккумуляторам определяется не только различными функциональными особенностями тканей корня, но и ограниченным поступлением металла в вакуоли клеток корня и повышенной скоростью поступления Ni в сосуды ксилемы гипераккумуляторов, в чем важную роль у *Thlaspi caerulescens* играет внутриклеточный уровень гистидина.

11. Распределение металлов в надземных органах определяется как путями транспирационного тока, так и функционированием барьерных тканей. Неспособность Cd, Pb и Ni проходить через плазмалемму клеток обкладки пучка в листовой пластинке обуславливает их накопление преимущественно в покровной ткани и отличает их распределение от распределения Sr и Zn, которые, обладая этой способностью, накапливается также в мезофилле.

12. Совокупность полученных данных позволяет заключить, что роль тканей растений в поступлении, передвижении и накоплении тяжелых металлов неодинакова не только для разных металлов, но и для растений исключателей и гипераккумуляторов, что в свою очередь определяет металло- и тканеспецифичность токсического действия металлов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Серегин И.В.**, Иванов В.Б. Гистохимические методы изучения распределения кадмия и свинца в растениях // Физиология растений. 1997. Т. 44. С. 915–921.

2. **Серегин И.В.**, Иванов В.Б. Является ли барьерная функция эндодермы единственной причиной устойчивости ветвления корней к солям тяжелых металлов // Физиология растений 1997. Т. 44. С. 922–925.

3. **Серегин И.В.**, Иванов В.Б. Барьерная роль эндодермы при поступлении Cd и Pb в корень //Труды Международной конференции по анатомии и морфологии растений. Санкт-Петербург. 1997. С. 40–41.

4. **Серегин И.В.**, Иванов В.Б. Передвижение ионов кадмия и свинца по тканям корня // Физиология растений. 1998. Т. 45. С. 899–905.

5. Obroucheva N.V., Bystrova E.I., Ivanov V.B., Antipova O.V., **Seregin I.V.** Root growth responses to lead in young maize seedlings // Plant Soil. 1998. V. 200. P. 55–61.

6. Sobotik M., Ivanov V.B., Obroucheva N.V., **Seregin I.V.**, Martin M.L., Antipova O.V., Bergmann H., Barrier role of root system in lead - exposed plants // Angew. Bot. 1998. V. 72. P. 144–147.

7. Obroucheva N.V., Antipova O.V., Ivanov V.B., **Seregin I.V.**, Bystrova E.I., Sobotik M., Bergmann Y. Root growth inhibition by lead // Int. Symp. on Structure and Function of Roots. Slovakia. 1998. P. 81.

8. **Серегин И.В.** Функционально-анатомическое изучение токсического действия кадмия и свинца на корень проростков кукурузы. Дисс. канд. биол. Наук. Москва, МПГУ. 1999. 190 с.

9. **Серегин И.В.** Функционально-анатомическое изучение токсического действия кадмия и свинца на корень // Труды IV съезда физиологов растений России. Москва. 1999. С. 459.

10. **Серегин И.В.**, Иванов В.Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // Физиология растений. 2001. Т. 48. С. 606–630.

11. **Серегин И.В.** Фитохелатины и их роль в детоксикации кадмия у высших растений // Успехи биологической химии. Т. 41. 2001. С. 283–300.

12. Obroucheva N.V., Ivanov V.B., Sobotik M., Bergmann H., Antipova O.V., Bystrova E.I., **Seregin I.V.**, Shpigun L.K. Lead Effects on Cereal Roots in Terms of Cell Growth, Root Architecture and Metal Accumulation // Recent Advances of Plant Root Structure and Function / Ed: Gasparikova O. et al. 2001. Kluwer Academic Publishers. P. 165–170.

13. Ivanov V.B., Bystrova E.I., **Seregin I.V.** Selectivity and specificity of heavy metal toxic effects on root growth // Abstr. Int. Symp. Plants under Environmental Stress. Moscow 2001. P. 104.

14. **Seregin I.V.**, Ivanov V.B. Cadmium and lead distribution and their toxic effects on maize roots // Abstr. Int. Symp. Plants under Environmental Stress. Moscow. 2001. P. 255.

15. Пехов В.М., **Серегин И.В.** Распределение и токсическое действие никеля на рост проростков кукурузы // Труды международной конференции «Биологические ресурсы и устойчивое развитие». Пущино. 2001. С. 178.

16. **Серегин И.В.**, Пехов В.М., Иванов В.Б. Использование плазмолиза для выяснения локализации свинца в корневых клетках // Физиология растений. 2002. Т. 49. С. 317–319.

17. **Серегин И.В.**, Кожевникова А.Д., Казюмина Е.М., Иванов В.Б. Функционально-анатомическое изучение токсического действия никеля на корень // Труды II Между-

народной конференции по анатомии и морфологии растений. Санкт-Петербург. 2002. С. 311.

18. Иванов В.Б., Быстрова Е.И., **Серегин И.В.** Сравнение влияния тяжелых металлов на рост корня в связи с проблемой специфичности и избирательности их действия // Физиология растений. 2003. Т. 50. С. 445–454.

19. **Серегин И.В.**, Кожевникова А.Д., Казюмина Е.М., Иванов В.Б. Токсическое действие и распределение никеля в корнях кукурузы // Физиология растений. 2003. Т. 50. С. 793–800.

20. **Серегин И.В.**, Кожевникова А.Д. Гистохимические методы определения локализации и токсичности тяжелых металлов и стронция // Труды V съезда общества физиологов растений России. Пенза. 2003. С. 334.

21. Кожевникова А.Д., **Серегин И.В.** Токсическое действие и распределение никеля в корнях кукурузы // Труды V съезда общества физиологов растений России. Пенза. 2003. С. 288.

22. **Серегин И.В.**, Кожевникова А.Д. Распределение и токсическое действие стронция на рост проростков кукурузы // Труды V съезда общества физиологов растений России. Пенза. 2003. С. 335.

23. **Серегин И.В.**, Кожевникова А.Д. Транспорт, распределение и токсическое действие стронция на рост проростков кукурузы // Физиология растений. 2004. Т. 51. С. 241–248.

24. **Серегин И.В.**, Шпигун Л.К., Иванов В.Б. Распределение и токсическое действие кадмия и свинца на корни кукурузы // Физиология растений. 2004. Т. 51. С. 582–591.

25. **Серегин И.В.**, Кожевникова А.Д. Токсическое действие и распределение тяжелых металлов и стронция в проростках кукурузы // Труды VIII конференции ботаников в Санкт-Петербурге. Санкт-Петербург. 2004. С. 135–136.

26. **Серегин И.В.**, Кожевникова А.Д. Распределение тяжелых металлов и стронция по тканям проростков кукурузы в связи с проблемой специфичности и избирательности их токсического действия // Биоразнообразие природных и антропогенных экосистем / Сборник статей участников молодежного научного семинара. Екатеринбург. УрО РАН. 2005. С. 92–97.

27. **Серегин И.В.**, Кожевникова А.Д. Распределение кадмия, свинца, никеля и стронция в набухающих зерновках кукурузы // Физиология растений. 2005. Т. 52. С. 635–640.

28. **Серегин И.В.**, Кожевникова А.Д., Быстрова Е.И., Иванов В.Б. Функционально-анатомическое изучение распределения и токсического действия тяжелых металлов и стронция на рост проростков кукурузы // Труды Международной конференции «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия». Вологда. 2005. С. 154.

29. **Серегин И.В.**, Кожевникова А.Д. Токсическое действие и распределение свинца и никеля по тканям и органам проростков амаранта // Труды Международной конфе-

ренции «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия». Вологда. 2005. С. 155.

30. Кожевникова А.Д., Быстрова Е.И., **Серегин И.В.**, Иванов В.Б. Действие никеля, свинца и стронция на структуру меристемы и рост корня кукурузы // Труды Международной конференции «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия». Вологда. 2005. С. 79.

31. **Серегин И.В.** Поступление в корни, распределение и токсическое действие тяжелых металлов // Труды IV Международной научной конференции. Минск. 2005. С. 211.

32. Кожевникова А.Д., **Серегин И.В.** Изучение распределения тяжелых металлов и стронция в растениях с помощью гистохимических методов // Труды IV Международной научной конференции. Минск. 2005. С. 102.

33. Быстрова Е.И., Кожевникова А.Д., Месенко М.М., **Серегин И.В.**, Иванов В.Б. Система межклеточных взаимодействий, определяющая образование и подержание стволовых клеток в меристеме корня // Труды конференции «Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты». Москва. 2005. С. 19–20.

34. **Серегин И.В.**, Кожевникова А.Д. Физиологическая роль никеля и его токсическое действие на высшие растения // Физиология растений. 2006. Т. 53. С. 285–308.

35. Кожевникова А.Д., **Серегин И.В.** Влияние тяжелых металлов на деление клеток корневого чехлика и структурную организацию меристемы // Труды IX Международной конференции ботаников в Санкт-Петербурге. Санкт-Петербург. 2006. С. 158.

36. Кожевникова А.Д., **Серегин И.В.**, Быстрова Е.И., Месенко М.М., Иванов В.Б. Покоящийся центр корня – ниша или стволовые клетки? // Труды конференции «Физиология растений – фундаментальная основа современной фитобиотехнологии». Ростов-на-Дону. 2006. С. 107.

37. **Серегин И.В.** Устойчивость растений к тяжелым металлам // Труды конференции «Физиология растений – фундаментальная основа современной фитобиотехнологии». Ростов-на-Дону. 2006. С. 30–31.

38. Кожевникова А.Д., **Серегин И.В.**, Быстрова Е.И., Иванов В.Б. Влияние тяжелых металлов и стронция на деление клеток корневого чехлика и структурную организацию меристемы // Физиология растений. 2007. Т. 54. С. 290–299.

39. **Серегин И.В.**, Кожевникова А.Д., Давыдова М.А., Быстрова Е.И., Schat H., Иванов В.Б. Роль тканей корня и побега растений исключателей и гипераккумуляторов в транспорте и накоплении никеля // Доклады Академии наук. 2007. Т. 415. N. 3. С. 422–424.

40. **Серегин И.В.**, R. Vooijs, Кожевникова А.Д., Иванов В.Б., Schat H. Влияние кадмия и свинца на накопление фитохелатинов в побегах и различных участках корня кукурузы // Доклады Академии наук. 2007. Т. 415. N. 4. С. 571–573.

41. **Серегин И.В.**, Кожевникова А.Д., Давыдова М.А., Быстрова Е.И., Иванов В.Б. Специализация тканей растений исключателей и гипераккумуляторов в транспорте и

накоплении никеля // Труды VI съезда общества физиологов растений России. Сыктывкар. 2007. С. 362–363.

42. **Серегин И.В.,** Кожевникова А.Д. Роль тканей корня и побега в транспорте и накоплении кадмия, свинца, никеля и стронция // Физиология растений. 2008. Т. 55. С. 3–26.

43. **Seregin I.V.,** Kozhevnikova A.D. Transport and Distribution of Nickel in Higher Plants // Nickel in Relation to Plants / Ed: Barket Ali, S. Hayat, A. Ahmad. 2008. Narosa Publising House Pvt. Ltd. 200 p.

44. Кожевникова А.Д., **Серегин И.В.,** Быстрова Е.И., Иванов В.Б. Влияние нитратов свинца, никеля и стронция на рост корня кукурузы // Труды Международной конференции «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений». Екатеринбург. 2008. С. 215–216.

45. Грачева В.В., **Серегин И.В.,** Кожевникова А.Д., Иванов В.Б. Распределение цинка в тканях и органах проростков кукурузы и его ростингибирующее действие // Труды Международной конференции «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений». Екатеринбург. 2008. С. 150–151.

46. **Серегин И.В.,** Кожевникова А.Д. Усиление накопления и ростингибирующего действия никеля и свинца на проростки амаранта в присутствии кальция // Физиология растений. 2009. Т. 56. С. 92–96.

47. Кожевникова А.Д., **Серегин И.В.,** Быстрова Е.И., Беляева А.И., Катаева М.Н., Иванов В.Б. Влияние нитратов свинца, никеля и стронция на деление и растяжение клеток корня кукурузы // Физиология растений. 2009. Т. 56. С. 268–277.

48. Richau K.H., Kozhevnikova A.D., **Seregin I.V.,** Vooijs R., Koevoets P.L.M., Smith J.A.C., Ivanov V.B., Schat H. Chelation by Histidine Inhibits the Vacuolar Sequestration of Nickel in Roots of the Hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens* // New Phytol. 2009. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02826.x

Подписано в печать: 27.04.2009

Заказ № 1944 Тираж - 100 экз.
Печать трафаретная.
Типография «11-й ФОРМАТ»
ИНН 7726330900
115230, Москва, Варшавское ш., 36
(499) 788-78-56
www.autoreferat.ru