



<http://yadyra.ru>

**Производственный процесс и фиторемедиационный потенциал сортов ярового и озимого рапса на загрязненных тяжелыми металлами почвах**

# СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1. Источники поступления в почву тяжелых металлов .....	5
1.2. Механизмы поглощения ТМ и их транспорт.....	7
1.3. Механизмы адаптации растений к действию тяжелых металлов.....	11
1.3.1. Барьерные механизмы на пути проникновения тяжелых металлов.....	12
1.3.2. Хелатирование .....	13
1.3.3. Клеточные способы детоксикации .....	16
1.4. Биологическая роль тяжелых металлов в растениях .....	17
1.5. Современное состояние и перспективы возделывания рапса.....	22
ГЛАВА 2. ЗАДАЧИ, УСЛОВИЯ И МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА.....	29
2.1. Цель и задачи .....	29
2.2. Объект исследования .....	29
2.3. Место и условия проведения эксперимента .....	30
2.4. Схема опыта .....	30
2.4. Методика проведения эксперимента.....	32
2.4.1. Измерение биомассы.....	32
2.4.2. Определение содержания тяжелых металлов.....	32
2.4.3. Определение массы 1000 семян .....	32
2.4.4. Определение содержания хлорофилла.....	32
2.4.5. Определение фертильности пыльцы .....	33
2.5. Погодные условия .....	34
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	35
3.1. Продуктивность рапса и структура урожая .....	35
3.2. Вынос ТМ надземными органами.....	43
3.3. Содержание хлорофилла.....	45
ВЫВОДЫ .....	47
ОХРАНА ТРУДА .....	48
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	51

## ВВЕДЕНИЕ

Среди большого числа абиотических факторов, вызывающих стресс у растений, в последнее время все большее значение приобретает токсическое воздействие тяжелых металлов (ТМ), что связано с возрастающей антропогенной нагрузкой на природные экосистемы [2].

Особое место среди них занимают цинк и свинец, поскольку их избыточное содержание в почве может быть результатом не только хозяйственной деятельности человека, но и естественных почвообразовательных процессов, так как эти металлы содержатся в высоких концентрациях в составе некоторых почвообразующих пород.

Учитывая эти обстоятельства, исследование механизмов адаптации растений к тяжелым металлам необходимо сопровождать оценкой уровня их аккумуляции в надземной массе. Тем более, поиск растений, способных их накапливать в надземных органах в высоких концентрациях, и тем самым выводить их из почвы, представляет особый интерес.

Использование таких растений позволяет естественным путем, т.е. за счет фиторемедиации<sup>1</sup>, очищать загрязненные почвы от избыточных количеств тяжелых металлов, что предоставляет возможность другим, менее устойчивым видам заселять в дальнейшем такие территории и вернуть их для сельскохозяйственного использования.

Фиторемедиация в последнее время привлекает все большее внимание научной общественности в следствие:

1. высокой экономической выгоды в сравнении с иными способами очистки загрязненных территорий;
2. своей «экологичности» и эстетичности.

*Природные сверхнакопители металлов.* В природе чаще всего встречаются в зонах сильного загрязнения металлами. Они способны накапливать тяжелые металлы в побегах до концентраций, на 1 – 3 порядка превышающих концентрации

---

<sup>1</sup> комплекс мероприятий, направленных на очистку окружающей среды (почвы и воды) от различных токсикантов с помощью растений

в тканях растущих рядом «нормальных» растений. Практическое использование растений-сверхнакопителей определяется скоростью накопления металлов (г/кг растительной ткани), помноженной на скорость накопления биомассы (кг биомассы на 1га/год), что дает количество удаленного из почвы металла в г или кг на 1 га в год. В зависимости от начальной концентрации металла и глубины загрязненного слоя почвы очистка территории может растянуться на 15 – 20 лет, а такой срок улучшения почв слишком велик для практического использования, поэтому необходимо направленное изменение свойств растения методами молекулярной генетики.

*Извлечение металлов при помощи растений (фитоэкстракция).* В процессе фитоэкстракции корни растений поглощают загрязняющие вещества из почвы. Для этого металлы должны быть в растворимом состоянии. После поступления в корень ионы металлов накапливаются в вакуолях или передвигаются в побеги.

*Фитостабилизация.* Эта технология основана на способности растений или выделяемых ими соединений стабилизировать содержание загрязняющих веществ на низком уровне. Например, удержание загрязнителя на поверхности или внутри клеточных стенок, связывание с гумусом почвы и другие механизмы изоляции.

*Ризофилтрация.* Эту технологию можно определить как использование корней растений для поглощения, концентрирования и осаждения из водных растворов потенциально опасных химических соединений. В водной культуре растения быстро удаляют из воды тяжелые металлы, концентрируя их в корнях и побегах. После уборки растения можно захоронить или переработать для выделения металлов.

Следует сказать, что токсическому действию высоких концентраций тяжелых металлов подвержены практически все физиологические и биохимические процессы, среди которых – минеральное питание, водный режим, фотосинтез, дыхание, рост и развитие. Однако, многие вопросы их распределения, токсического действия и механизма ответа клеток на их избыток до сих пор остаются мало изученными.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## **1.1. Источники поступления в почву тяжелых металлов**

Наличие в почве тяжелых металлов, в том числе свинца, кадмия и цинка, является не только результатом антропогенной активности, но и зачастую обусловлено особенностями генезиса почв, химическим составом тех пород, на которых формировался данный почвенный комплекс. Они относятся к рассеянным химическим элементам, содержащимся в горных породах в небольших количествах, так по данным Виноградова (1962) содержание цинка в земной коре в целом составляет 83 мг/кг, кадмия – 0,14 мг/кг, свинца – 10-40 мг/кг. Наиболее богаты солями тяжелых металлов осадочные горные породы – глины, суглинки, песчаники и пр., причем содержание данных элементов зависит не только от генезиса породы, но также в значительной степени обусловлено гранулометрическим составом, – тонкодисперсные глинистые породы, с высоким содержанием илистых частиц значительно богаче солями тяжелых металлов по сравнению с песчаниками.

В горных породах свинец, кадмий и цинк обычно приурочены к определенной группе минералов. По Хендерсону (1985), к минералам-концентраторам относятся калиевые полевые шпаты, биотит, пироксены, оливины и некоторые другие.

При выветривании горных пород главными носителями тяжелых металлов становятся вторичные минералы. Почвы, формируемые на них, характеризуются тяжелым гранулометрическим составом и, как следствие – высоким их содержанием. Одной из основных причин различной концентрации тяжелых металлов в почве является разный минералогический состав. Так, в песках преобладает кварц, почти лишенный этих элементов, тогда как в суглинках и глинах их доля достаточно велика.

Основное биологическое значение имеют подвижные формы свинца, кадмия и цинка, содержание которых в почвах различных регионов значительно различается. Причиной таких различий является, прежде всего, специфика гранулометрического и минералогического составов, уровень гумусированности, реакция среды.

Подвижные формы распределяются в профиле почв неравномерно. Повышенное их количество чаще всего свойственно гумусовому горизонту, некоторое накопление возможно также и в аллювиальном или карбонатном слоях.

Среди прочих источников техногенного поступления кадмия, свинца и цинка в почвы основное место занимают предприятия черной и особенно цветной металлургии.

Валовое количество меди и цинка в почвах, загрязненных металлургическими предприятиями может достигать внушительных размеров. Например, в слое почвы 0 – 5 см вблизи металлургических предприятий обнаружено содержание цинка до 400 мг/кг, кадмия превышает в 20-50 раз, свинца может достигать значения в 1000 раз выше фона (фоновое содержание – 19 мг/кг). Причем содержание цинка в почве рядом с цинкоплавильным производством может достигать и до 10000 мг/кг [3]. Примерно половина количества свинца, кадмия и цинка в пахотном горизонте обычно представлена подвижной их фракцией, а в подпахотном слое доля их значительно меньше – 17 – 19%. Из этого можно сделать вывод, что они, попадая в почву в металлической форме и в форме оксидов, достаточно быстро приобретают высокую мобильность.

Другим, чрезвычайно важным источником загрязнения почв могут быть загрязненные минеральные удобрения и пестициды. Так, например, в 100г суперфосфата содержится 720,2 мкг кадмия, фосфата калия - 471 мкг, селитры до 66 мкг.

Средние данные свидетельствуют о том, что загрязнение почв территории России ТМ выше предельно допустимой концентрации составляет: хромом 1,7%, медью – 1,3%, никелем – 0,8%, свинцом – 0,7%, кадмием – 0,26, цинком – 0,11. Загрязнение почв ТМ наблюдается в ряде субъектов РФ [1].

## **1.2. Механизмы поглощения ТМ и их транспорт**

Тяжелые металлы поступают в растения главным образом через корневую систему из почвы, в которой они распределены крайне неравномерно. Это зависит от типа почвы и источника попадания в нее тяжелых металлов. Часть металлов, поступивших в почву, связывается с органическим материалом почвы и становится недоступной для растений. Другая же часть остается в ионной форме и может поступать в корневую систему.

Поглощение металлов представляет собой многоступенчатый процесс, включающий в себя их связывание с материалом слизи и клеточных оболочек, поступление ионов в свободное пространство и, наконец, проникновение через мембраны в клетки.

На поверхности корня тяжелые металлы связываются главным образом с карбоксильными группами уроновых кислот слизи. Способность слизи связывать тяжелые металлы зависит от природы катиона следующим образом:  $Pb > Cu > Cd > Zn$  [8]. Но пока не изучено, какая доля тяжелых металлов остается связанной со слизью и не поступает в корень.

Скорость поглощения металлов зависит от многих факторов среды: реакции среды, температуры, аэрации, концентрации металлов в почве или растворе, ряда почвенных факторов, а также от морфо-физиологических особенностей растений. Все эти факторы определяют как скорость поглощения металлов, так и пути их дальнейшего транспорта, распределения, детоксикации.

Помимо поступления тяжелых металлов через корневую систему, в условиях аэротехногенного загрязнения они могут поступать в растения также через листья, причем способность листьев поглощать тяжелые металлы зависит от их анатомических особенностей. Чем сильнее опушенность листьев, тем более интенсивно металлы поступают через них при загрязнении атмосферы [5].

До сих пор не выявлены специфические механизмы поглощения различных тяжелых металлов, благодаря которым столь сильно может различаться способность разных видов или даже разных линий одного вида

накапливать эти металлы. В связи с этим возникает проблема — определяются ли различия между растениями по способности накапливать металлы разными скоростями их поглощения или может быть более существенной является судьба поглощенных ионов в растении, (связывание металлов в клеточных оболочках или в виде малорастворимых комплексов в вакуоли и т.д.). Возможно также, что разная способность растений накапливать тяжелые металлы определяется морфологическими и физиологическими особенностями этих видов растений, а также структурно-функциональными и биохимическими особенностями клеток разных тканей или механизмами транспорта металла по растению.

Семейства транспортеров тяжелых металлов в растениях составляют несколько групп.

*АТФазы II-типа* – транспортеры тяжелых металлов были обнаружены во многих живых организмах, в том числе и растениях, они вовлечены в мембранный транспорт целого ряда микроэлементов и потенциально токсичных для клетки металлов. Это подгруппа большого семейства II-типа АТФаз, использующих энергию АТФ для переноса различных заряженных субстратов через клеточную мембрану. АТФазы тяжелых металлов относятся к типу 1В АТФаз.

Сравнение интрамембранных последовательностей привело к разделению 1В АТФаз на два класса – 1) транспортеры одновалентных катионов, таких как Cu, Ag, 2) транспортеры двухвалентных катионов – Cd, Pb, Zn, Co [21,26].

*CDF транспортеры* (от Cation Diffusion Facilitator), впервые обнаружены у бактерий. К настоящему времени, транспортеры этого семейства, найдены у дрожжей, животных и растений, где они выполняют функцию переносчиков преимущественно ионов Zn, Cd и Co [27]. Эти транспортеры состоят из шести трансмембранных и богатого остатками гистидина связывающего катионы металлов С-концевого доменов [23]. Представители этого семейства известны своей вариабельностью в размерах и могут состоять из 280 – 740 аминокислотных остатков [27].

Впервые ZAT-ген CDF семейства транспортеров был найден у арабидопсиса. Показана 35-40% его гомология с ZnTs геном млекопитающих [27]. ZAT экспрессируется практически во всех частях растения конститутивно, однако известно усиление его экспрессии в присутствии высоких концентраций цинка. Трансгенные растения с овер-экспрессией гена данного транспортера показывают высокую толерантность к токсическим концентрациям цинка, не смотря на накопление в клетке высоких концентраций данного тяжелого металла. Предполагается, что ZAT участвует в везикулярной и вакуолярной компартментации Zn и таким образом вовлечен в детоксификацию последнего [21].

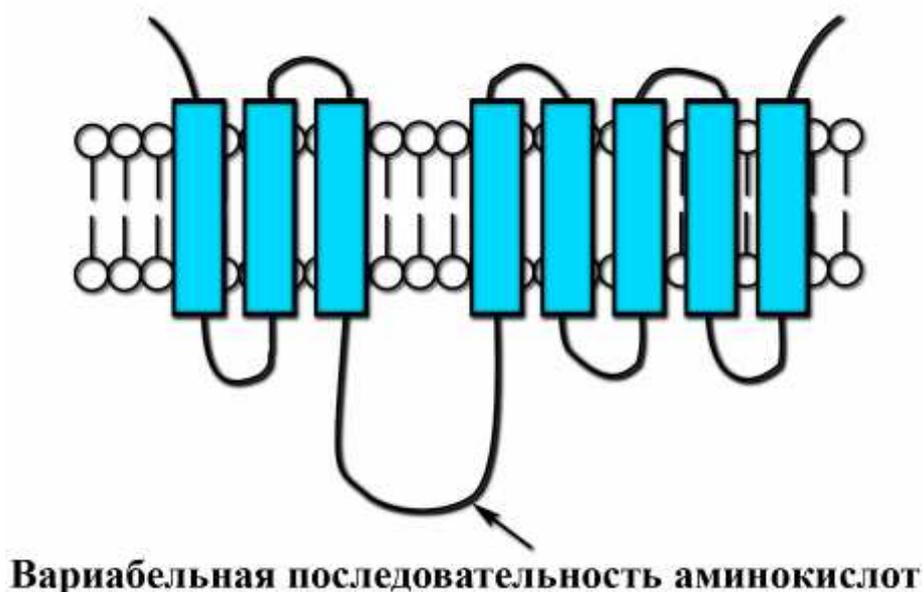
Еще один представитель CDF-семейства - ZTP1, был найден у известного гипераккумулятора цинка – *Thlaspi caerulescens*. В отличие от ZAT арабидопсиса, ZTP1 экспрессируется главным образом в листьях и лишь незначительно в корнях, интенсивность экспрессии данного гена находится под влиянием концентраций Zn, Cd и Pb в среде – растения *Thlaspi caerulescens* произрастающие на почвах с высоким содержанием цинка отличаются и высокой интенсивностью экспрессии ZTP1 (и, как следствие, высокой устойчивостью) в сравнении с растениями, обитающими на неконтаминированных почвах [27].

Изучение генома арабидопсиса показало наличие восьми генов, в той или иной степени гомологичных CDF, предлагается переименовать ZAT белки данного семейства (экспрессируемые в растениях) в MTP (metal tolerance proteins), ввиду несомненного участия данных транспортеров в формировании механизмов устойчивости к тяжелым металлам [21].

ZIP транспортеры вовлечены в транспорт Fe, Zn, Mn и Cd. Около 85 представителей ZIP семейства были найдены у бактерий и всех типов эукариотических организмов, включая растения. 15 генов ZIP транспортеров было найдено у арабидопсиса. Сравнение аминокислотных последовательностей данного семейства транспортеров позволило выделить четыре подсемейства, все ZIP транспортеры растений относятся к одной группе.

ZIP переносчики представляют собой пептиды состоящие из 8 трансмембранных доменов с C- и N- концами лежащими за наружной частью

плазмалеммы. По количеству аминокислотных остатков ZIP транспортеры довольно сильно различаются, однако различие эти касаются главным образом области лежащей между третьим и четвертым трансмембранными доменам (рис. 1).



**Рис. 1.** Общая схема ZIP транспортера

Именно эта область, богатая остатками гистидина, принимает участие в связывании катионов [21]. Наиболее консервативным участком молекулы типичного ZIP транспортера является четвертый трансмембранный домен, представляющий собой спираль и содержащий высококонсервативную последовательность гистидиновых остатков, которая составляет часть молекулы, ответственную за трансмембранный перенос ионов.

К настоящему времени функциональная роль ZIP транспортеров растений изучена недостаточно хорошо. Гены ZIP 1, 3 и 4 экспрессируются главным образом в корнях Zn-дефицитных растений [22]. Показано активное участие TcZNT1 из *Thlaspi caerulescens* в поглощении цинка, ген экспрессируется как в корнях, так и в надземных частях растений, интенсивность экспрессии находится в прямой зависимости от концентрации цинка в среде [21].

Широкий интерес к генам транспортеров ТМ обусловлен возможностью генетической модификации состава металлов в растениях, в том числе и с целью фиторемедиации. Регуляция транспорта ТМ на уровне экспрессии генов-транспортеров также важна для поддержания гомеостаза ТМ в растительных клетках и детоксикации при избыточном их поступлении в растение.

Растения по способности накапливать металлы разделяются на три группы:

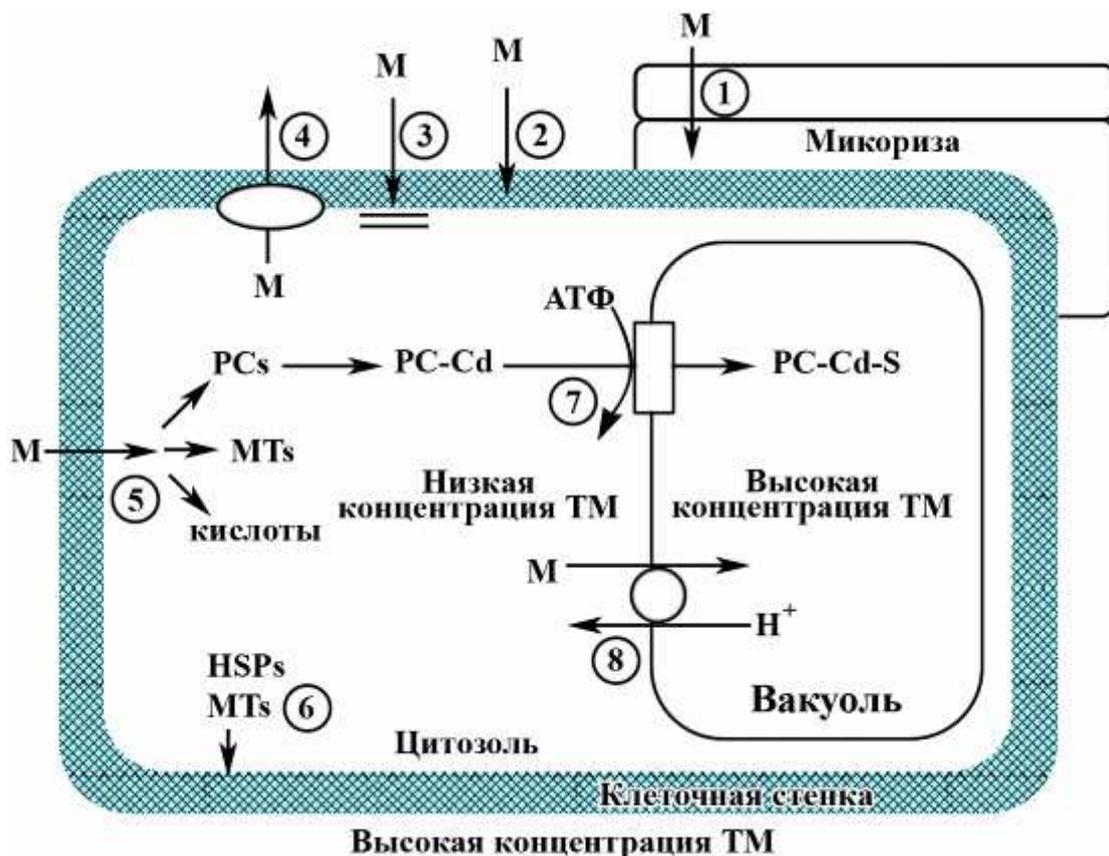
1. *аккумуляторы*, накапливающие металлы главным образом в надземной сфере при низкой и невысокой их концентрации в почве;
2. *индикаторы*, концентрация металла в которых отражает его концентрацию в окружающей среде;
3. *исключители*, в которых поддерживается низкая концентрация металлов в побегах, несмотря на их высокую концентрацию в окружающей среде.

Содержание металлов в разных органах уменьшается в следующем порядке: корни / листья / стебли / соцветия / семена, хотя этот порядок для разных видов может несколько различаться [13].

### **1.3. Механизмы адаптации растений к действию тяжелых металлов**

Растениям присущ целый ряд защитных механизмов, вовлеченных в детоксикацию высоких концентраций тяжелых металлов. Основная задача всех этих механизмов – изоляция тем или иным способом токсичных концентраций металлов от метаболически активных компартментов клетки. Это может осуществляться либо компартментацией в менее активные части, либо, в отдельных случаях, полным препятствием поступлению катионов токсичных металлов в растение (связывание корневыми эксудатами, клеточной стенкой и пр.). Последний механизм получил название стратегии «избегания». В формирование устойчивости к тяжелым металлам может быть вовлечена и цитоплазматическая мембрана. Снижение ее проницаемости для ионов этих металлов или наоборот, увеличение их оттока из цитоплазмы играет значительную роль.

На уровне протопласта белки теплового шока (БТШ) и специфические металл-связывающие пептиды, такие как металлотионеины и фитохелатины вовлечены в формирование устойчивости растения к действию тяжелых металлов. В процессах хелатирования, помимо названных пептидов, могут принимать участие и низкомолекулярные органические соединения, такие, как карбоновые и аминокислоты. Совокупность всех этих процессов схематично отражена на рис. 2.



**Рис. 2.** Схема потенциально возможных механизмов, вовлеченных в детоксикацию тяжелых металлов у высших растений [Hall J. L., 2002].

1 - снижение поглощения тяжелых металлов микоризой, 2 - связывание тяжелых металлов клеточной стенкой и корневыми эксудатами, 3 – снижение плазмалеммой поступления тяжелых металлов в цитозоль, 4 – выброс тяжелых металлов в апопласт, 5 – хелатирование, 6 – протекция плазмалеммы в стрессорных условиях, 7 – транспорт ФХ-Cd комплексов в вакуоль, 8 – транспорт и компартментация тяжелых металлов в вакуоль.

### 1.3.1. Барьерные механизмы на пути проникновения тяжелых металлов

*Микориза и эктомикориза* в случае деревьев и кустарников, может быть достаточно эффективна в детоксикации тяжелых металлов [20]. Тем не менее, в настоящее время, механизм такого действия до конца не ясен.

*Клеточная стенка и эксудаты корней.* Роль клеточной стенки в детоксикации тяжелых металлов у растений до настоящего времени остается спорной. Несмотря

на то, что клеточная стенка клеток корня находится в непосредственном контакте с ионами этих элементов, абсорбция их зависит от многих физико-химических параметров и в большинстве случаев, недостаточно эффективна [20]. Тем не менее, имеются данные, свидетельствующие о том, что металл-толерантная *Silene vulgaris* ssp. *humilis* аккумулирует в клеточной стенке корней в комплексах с белками либо в виде силикатов целый ряд тяжелых металлов.

Биологическая роль корневых эксудатов достаточно разнообразна. Известно, что образуя хелаты с катионами металлов, они увеличивают доступность последних для растения. Поскольку в составе корневого эксудата достаточно много различных составляющих, предполагается, что они могут принимать участие в связывании никеля и других тяжелых металлов.

### **1.3.2. Хелатирование**

Хелатирование<sup>2</sup> ионов тяжелых металлов – один из главнейших механизмов их детоксикации, присущий широкому спектру организмов, в том числе и растениям. Не смотря на довольно хорошую изученность, до сих пор описаны далеко не все органические хелаторы металлов.

Большое количество карбоновых и аминокислот может выступать в роли хелаторов ионов тяжелых металлов. Имеются данные об участии малата в связывании цинка в цитоплазме и дальнейшем транспорте к вакуоли.

### **Фитохелатины**

В связывании тяжелых металлов могут участвовать и фитохелатины. Фитохелатины (ФХ) – семейство небольших (6–8 kD) метал-связывающих пептидов, синтез которых индуцируется ионами тяжелых металлов [26]. В настоящее время известно несколько различающихся между собой С-концевой

---

<sup>2</sup> Хелатирование – образование комплексных соединений, в которых лиганд (молекула или ион, связанный с центральным атомом (комплексобразователем)) присоединен к центральному атому металла посредством двух или большего числа связей.

аминокислотой групп ФХ-подобных пептидов, каждая из которых встречается в нескольких семействах высших растений (табл. 1):

**Таблица 1.** Различные ФХ-подобные пептиды [26]

<b>ФХ-подобные пептиды</b>	<b>Нахождение</b>
ФХ	Различные семейства высших растений
Гомофитохелатин	Бобовые
Десглициновый ФХ	Кукуруза, дрожжи
Гидроксиметил ФХ	Злаковые
изо-ФХ	Кукуруза

ФХ были обнаружены во многих фотосинтезирующих организмах, начиная с водорослей и заканчивая покрытосемянными, имеются сведения о присутствии ФХ у некоторых грибов [26]. Это позволяет предположить, что пути синтеза ФХ развились очень давно и играли важную роль в выживании сосудистых растений в агрессивной среде.

До настоящего времени нет единого мнения в вопросе о том, действительно ли фитохелатины участвуют в детоксикации тяжелых металлов у растений. Тем не менее, доказана роль ФХ в формировании устойчивости растений к кадмию [22]. На нескольких Cd-чувствительных мутантах арабидопсиса с различной способностью к синтезу ФХ было показано, что устойчивость к действию кадмия тесно коррелирует с содержанием ФХ в растениях [22]. Кроме Cd к активации синтеза ФХ приводит обработка As, однако до настоящего времени нет данных об индукции накопления ФХ ионами Zn, Ni и Se. Ионы меди лишь в незначительной степени активируют синтез ФХ [20].

### **Металлотионеины**

Определенную роль в связывании тяжелых металлов выполняют металлотионеины. Металлотионеины (МТ) – вторая широко распространенная группа металлсвязывающих пептидов высших растений. В отличие от ФХ металлотионеины – кодируемые пептиды. Впервые они были выделены из почки

лошади в 1957 году [2]. Однако МТ растений к настоящему времени все еще остаются недостаточно изученными.

Все МТ принято делить на два больших класса [2]:

Первый класс (МТ I) – металлсвязывающие пептиды позвоночных. В металлсвязывающем домене молекула МТ I содержит 20 остатков цистеина, расположение которых крайне консервативно.

Второй класс (МТ II) – пептиды, сходные по строению с МТ I, но не имеющие столь консервативного положения остатков цистеина. Они распространены у беспозвоночных, растений, грибов, цианобактерий и некоторых других прокариот, морских водорослей и дрожжей.

Второй класс МТ в настоящее время делят на два типа. Оба типа характеризуются наличием в молекуле 12 остатков цистеина, однако МТ II типа 1 (МТ1) имеют структуру представляющую собой сочетание только последовательностей следующего вида - 6Цист-Х-6Цист (Х – неконсервативная последовательность примерно 40 аминокислот, состав которых определяется видом растения и ионом металла, вызвавшего синтез МТ), а тип 2 представляет собой более сложные полипептиды в молекуле которых встречаются как 6Цист-Х-6Цист-группировки, так и 6Цист-6Цист или 6Цист-Х-Х...Х-6Цист (в данном случае, аминокислотная вставка может быть значительно длиннее 40 остатков). В состав аминокислотной последовательности, разделяющей два металлсвязывающих домена могут входить и ароматические аминокислоты. Длина такого промежутка у МТ II других организмов составляет менее 10 аминокислотных остатков и не содержит ароматических аминокислот.

МТ синтезируются в норме в незначительном количестве. До настоящего времени нет однозначного ответа на вопрос, какую роль МТ играют в жизни растения. Предполагается, что они принимают участие в поддержании гомеостаза микроэлементов (таких, как Zn, Cu и пр.) [20]. Также, МТ возможно могут выполнять функцию антиоксидантов и мембранных протекторов.

Разные ионы металлов стимулируют синтез МТ не в одинаковой мере. Такие металлы, как Ca, Al, Na, Mg, U не индуцируют образования МТ. Повышение

содержания в клетке металлсвязывающих пептидов при действии Fe и Cs наблюдается, очевидно, в определенных условиях, зависящих от вида растения и концентрации тяжелых металлов, так как по этому поводу имеются противоречивые данные [5]. Имеются данные об индукции синтеза МТ ионами меди и цинка.

Процесс образования МТ зависит и от ионного окружения.

### **1.3.3. Клеточные способы детоксикации**

Выброс ионов за цитоплазматическую мембрану или их транспорт в вакуоль – два пути снижения токсического действия тяжелых металлов на цитоплазматические процессы.

#### **Цитоплазматическая мембрана**

Плазмалемму можно рассматривать как самую первую структуру растительной клетки, которая испытывает на себе токсическое действие тяжелых металлов. Такой симптом, как, например, повышение утечки электролитов из цитоплазмы вследствие нарушения нормального функционирования мембраны, хорошо известен. Показано, что Cu увеличивает выход ионов калия из клеток корней *Agrostis capillaris*, *Silene vulgaris*, *Mimulus guttatus* [20]. Причиной такого действия тяжелых металлов на мембраны могут служить различные механизмы, включая окисление тиоловых групп клеточных белков, ингибирование  $H^+$  АТФазы, изменения в соотношении липидных компонентов мембраны.

Плазмалемма играет значительную роль в поддержании ионного гомеостаза клетки, однако снижение трансмембранного транспорта ионов тяжелых металлов в присутствии их высоких концентраций у растений до настоящего времени изучено недостаточно.

Другим механизмом снижения цитоплазматической концентрации тяжелых металлов, связанным с деятельностью плазмалеммы, может быть активный выброс ионов из клеточного пространства, однако, практически ничего не известно о функционировании данного механизма у растений. Тем не менее, данная стратегия

является одним из главнейших компонентов устойчивости бактерий к тяжелым металлам и включает в себя функционирование таких транспортеров, как P-тип АТФазы, протонный антипортер. На животных была показана вовлеченность в регуляцию внутриклеточной концентрации ионов тяжелых металлов мембранного транспортера цинка ZnT-1 и CРх-семейства АТФаз, связанных с транспортом меди [21]. CРх АТФазы, рассмотренные подробнее в главе, посвященной вопросам трансмембранного транспорта ионов, вместе с другими переносчиками (N-ramp белками, CDF и ZIP семействами), с большой степенью вероятности могут играть роль в формировании устойчивости к тяжелым металлам и у растений [20].

### **Вакуоль**

Вакуоль является основной органеллой клетки, где накапливаются тяжелые металлы [20]. Наиболее изучена роль вакуоли в накоплении цинка. Обработка Zn меристематических клеток корня *Festuca rubra* приводила к усиленному развитию в них вакуолей, показана ключевая роль вакуолярной компартментации в развитии устойчивости к цинку ячменя. Кроме цинка в вакуоле могут накапливаться ионы Cd и Mo, в то время, как Ni преимущественно присутствует в цитоплазме. Изучение функционирования тонопластных транспортных систем в условиях индуцированного тяжелыми металлами стресса так же свидетельствует о значительной роли данного механизма детоксикации в формировании устойчивости растений к действию тяжелых металлов.

## **1.4. Биологическая роль тяжелых металлов в растениях**

*Цинк* является очень важным микроэлементом. Он необходим растению в очень малых количествах, и без него нормальная жизнедеятельность невозможна [16]. Это эссенциальный элемент, среднее его содержание в растениях лежит в пределах 20-60 мг/кг сухой массы [24]. Известно более 300 ферментов, для функционирования которых необходим цинк, среди них – щелочная фосфатаза, алкоголь-дегидрогеназа и др. [24]. Также цинк играет важную роль в стабилизации структуры многих белков, в том числе некоторых последовательностей регуляторов

транскрипции [22]. Он необходим для регуляции азотного обмена, деления клеток, синтеза ауксинов.

При дефиците цинка в растениях накапливаются редуцирующие сахара и уменьшается содержание сахарозы и крахмала, увеличивается количество органических кислот и небелковых соединений азота – свободных аминокислот и амидов. Также нарушается фосфорный обмен: происходит замедление транспорта фосфора из корней в надземную часть [16]. Наиболее характерный признак дефицита цинка – задержка роста междоузлий и листьев, развитие розеточности и мелколистности.

***Воздействие повышенных концентраций цинка на растение.*** Известно немалое число видов – гипераккумуляторов цинка, способных успешно расти в присутствии значительных концентраций данного элемента в почве, однако для большинства растений высокие концентрации Zn являются токсичными [24]. Негативному влиянию высоких его концентраций подвержены самые разные метаболические процессы, показана его токсичность для генетического аппарата, процессов фотосинтеза [24].

Среди наиболее типичных симптомов повреждающего действия высоких концентраций цинка на растения можно назвать ингибирование развития корня, скручивание и отмирание кончиков молодых листьев, хлороз [10]. Высокие концентрации цинка в цитоплазме приводят к появлению хлоротичных пятен, вследствие конкуренции с ионами железа. Так в присутствии токсичных концентраций цинка, признаки хлороза отмечаются даже при содержании железа в клетках листа более 100 ppm, в то время как в обычных условиях критический нижний порог концентрации  $Fe^{2+}$  лежит ниже 40 ppm.

Связываясь с SH-группами плазмалемных белков, цинк приводит к нарушению барьерных свойств мембран, что, в свою очередь, приводит к резкому увеличению концентрации цинка в цитоплазме и взаимодействию его с сульфгидрильными группами прочих белков. Таким образом, токсическому действию цинка подвергается целый ряд биохимических процессов [24].

Отрицательное действие цинка на процесс клеточного деления, по-видимому, это связано с нарушением структуры хроматина. Не смотря на то что цинк не участвует напрямую в окислительно-восстановительных процессах, тем не менее, активируя окислительные ферменты, он так же способен приводить к повышению концентраций свободных радикалов в клетке, оказывая отрицательное действие на мембраны и дестабилизирующее действие на ДНК активными формами кислорода [10].

Имеются данные о негативном действии токсичных концентраций цинка на фотосинтез вследствие дестабилизирующего влияния на мембраны хлоропластов и сам хлорофилл [12].

Известно, что цинк поглощается в виде двухвалентного катиона –  $Zn^{2+}$ . Показано, что одновременное присутствие в питательном растворе  $Cu^{2+}$  значительно снижает поглощение цинка растением. К надземным органам цинк транспортируется по ксилеме и, попадая в клетку, депонируется в вакуоле в виде комплексов с метал-связывающими белками, что необходимо для предотвращения его накопления в цитоплазме.

Мембранный транспорт цинка осуществляется специфическими переносчиками. В настоящее время показано участие в этом процессе П-типа АТФаз, ZAT, ZIP и некоторых других транспортеров [21].

***Взаимодействие с другими элементами.*** Наблюдаются антагонистические взаимоотношения между цинком и медью, которые проявляются в торможении поглощения одного элемента другим, что может указывать на участие в поглощении обоих элементов одних и тех же носителей.

Также широко известен антагонизм цинк – железо. Его механизм сходен с угнетающим действием других тяжелых металлов на поглощение железа. Избыток цинка ведет к заметному понижению содержания железа в растениях.

Взаимодействие цинк – фосфор наблюдается весьма часто. Известно, что нарушение соотношения фосфора и цинка, возникающее при интенсивном накоплении фосфора, вызывает дефицит цинка [10].

**Кадмий.** Биологическая роль кадмия в растениях изучена очень слабо. По мнению некоторых исследователей [10] небольшое количество этого металла может стимулировать рост и развитие организма.

По сравнению с другими тяжелыми металлами активность кадмия в любой почве сильно зависит от pH среды. Кадмий наиболее подвижен в кислых почвах в интервале 4.5 - 5.5 pH, тогда как в щелочных он относительно неподвижен. В отличие от других металлов, сорбция кадмия - очень быстрый процесс, в большинстве случаев, происходит за 10-15 минут на 95% [10].

**Воздействие повышенных концентраций кадмия на растение.** Высокая фитотоксичность кадмия объясняется его близостью по химическим свойствам к цинку. Поэтому кадмий может замещать цинк во многих биохимических процессах, нарушая работу большого количества ферментов.

Видимые симптомы, вызванные повышенным его содержанием в растениях, — это задержка роста, повреждение корневой системы, хлороз листьев, красно-бурая окраска их краев или прожилок. Помимо создания препятствий нормальному метаболизму ряда микрокомпонентов питания фитотоксичность кадмия проявляется в тормозящем действии на фотосинтез, нарушении транспирации и фиксации CO<sub>2</sub>, изменении проницаемости клеточных мембран [24]. Известно также, что он ингибирует процессы в микроорганизмах, происходящие с участием ДНК, и восстановления NO<sub>2</sub> до NO, препятствует симбиозу микробов и растений и повышает предрасположенность растений к грибковым инвазиям [10].

**Взаимодействие с другими элементами.** Некоторые элементы способны взаимодействовать с кадмием как в процессе поглощения их растениями, так и при выполнении биохимических функций. Обычно наблюдается взаимодействие кадмия с цинком, однако результаты исследований представляются противоречивыми, поскольку получены данные как об ослабляющем, так и об усиливающем действии обоих элементов. Но все имеющиеся факты можно обобщить следующим образом: в большинстве случаев цинк ослабляет поглощение кадмия корнями и листьями.

Взаимодействие кадмий - фосфор, по-видимому, носят противоположный характер. Но эффект внесения в почву фосфора может быть различным на разных почвах и у разных культур. Также имеются сведения о способности ионов кальция замещать ионы кадмия при переносе, и поглощение кадмия растениями может быть ингибировано избытком ионов кальция [10]. Есть данные, что на механизм поглощения и переноса кадмия влияет добавка калия, азота и алюминия, но эти результаты в настоящее время не вполне однозначны и могут быть связаны с какими-либо вторичными эффектами.

**Свинец.** Хотя нет данных, свидетельствующих о том, что свинец жизненно необходим для роста каких-либо видов растений, имеется много данных о стимулирующем действии на рост последних некоторых солей свинца (главным образом  $Pb(NO_3)_2$ ) при низких концентрациях. Более того, описаны эффекты торможения метаболизма растений, возникающие из-за низких уровней содержания свинца [24].

Многолетними исследованиями установлено, что поверхностные слои почвы обычно богаче свинцом, чем нижележащие. Это обусловлено высокой адсорбционной способностью гумусового горизонта почв по отношению к свинцу. С другой стороны, отмечается возможность незначительной миграции свинца в дерново-подзолистых почвах и транзитный перенос его из верхних горизонтов в нижние на эродированных почвах. Адсорбция свинца гумусом и устойчивость свинцово-гумусных связей увеличивается при подщелачивании среды.

**Воздействие повышенных концентраций свинца на растение.** Избыток свинца в растениях, связанный с высокой его концентрацией в почве, ингибирует дыхание и подавляет процесс фотосинтеза, иногда приводит к увеличению содержания кадмия и снижению поступления цинка, кальция, фосфора, серы [24]. Вследствие этого снижается урожайность растений и резко ухудшается качество производимой продукции. Внешние симптомы негативного действия свинца – появление темно-зеленых листьев, скручивание старых листьев, чахлая листва.

Известно, что свинец сильно связывается в стенках клеток, что существенно влияет на эластичность и пластичность последних. А это в свою очередь ведет к возрастанию твердости тканей.

**Взаимодействие с другими элементами.** Отмечается стимулирующее действие свинца на поглощение кадмия корнями растений, но это может быть вторичным эффектом, связанным с нарушением переноса ионов через мембраны. Антагонизм цинка и свинца выражается во взаимном неблагоприятном воздействии на перенос обоих элементов из корней в надземные части. Взаимодействие свинца с кальцием имеет большое значение для метаболизма, так как свинец способен имитировать физиологическое поведение кальция и тем самым сдерживать активность некоторых ферментов [10].

### **1.5. Современное состояние и перспективы возделывания рапса**

Возрастающая потребность населения в разнообразных продуктах питания, животноводства – в сырье, требует решения важнейшей народнохозяйственной задачи: увеличения производства масличного сырья, растительного масла и кормового белка высокого качества.

Важным резервом растительного кормового белка из масличных культур может быть рапс.

*Brassica napus* ( $2n = 38$ ) является амфидиплоидом двух видов: сурепицы (*B. campestris*,  $2n=20$ ) и листовой капусты (*B. oleracea*,  $2n=18$ ). Короткий период возделывания рапса в культуре, например, в сравнении с пшеницей, и, до недавних пор, слабая селекционная работа обусловили небольшой, морфологически довольно однотипный сортимент исходного материала рапса, представленный в мировой коллекции ВИРа.

#### ***Морфобиологическая характеристика***

Стебель высотой 50—150 см. Всё растение покрыто восковым налётом. Розеточные листья лировидно-перисто-надрезные, имеют очень редкое опушение;

стеблевые листья — от лировидных (нижние) до удлинённо-ланцетных (верхние). Соцветие — кисть (рис. 3). Цветки мелкие, жёлтые, редко белые. Стручки длинные (5—10 см), узкие (3—4 мм).

Рапс — растение длинного дня, хорошо произрастает в умеренной зоне. При коротком дне вегетативная масса увеличивается, а семенная продуктивность снижается.

Имеет озимую и яровую форму. Резких морфологических различий между обеими формами нет. Озимый рапс слабозимостоек, плохо переносит засуху. Лучшие почвы — глубокие структурные суглинистые и глинистые с большим запасом питательных веществ и с водопроницаемой подпочвой.



Рис. 3. *Brassica napus* ssp. *oleifera*

В семенах содержится жир от 33—40% (яровая форма) до 40—50% (озимая форма). Урожай семян озимого рапса 10-30 ц/га, ярового — 8-15 ц/га. Площади под рапсом в мире составляют более 20 млн. га. Его ареал охватывает Европу, Азию и

Америку. В нашей стране рапс возделывается на площади около 200 тыс. га. Масса 1000 семян составляет 2,6-5,0 г у ярового рапса и 4,0 – 7 г – у озимого. Семена сохраняют всхожесть 5-6 лет.

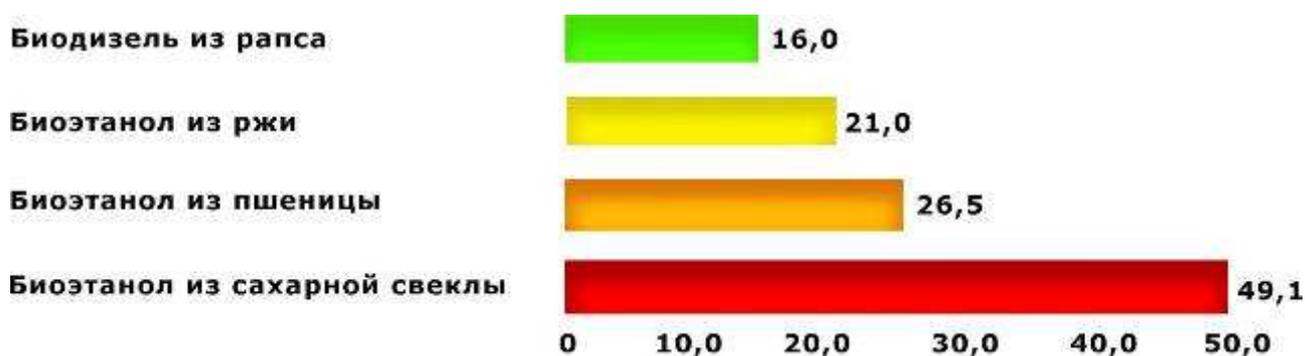
*Применение.* Основная продукция рапса – маслосемена, ежегодный мировой валовый сбор которых составляет более 25 млн. т. Их используют на пищевые (масло, маргарин, майонез, и др.), технические (смазка, горючее сырье, мыловарение, парфюмерия, текстильная, резиновая, лакокрасочная, сталелитейная промышленности) и лекарственные цели. Зеленая масса, шрот и жмых современных сортов рапса используют на корм скоту и птице. Рапс является медоносным растением.

Кроме того, рапс является потенциальным фиторемедиатором, т.е. с его помощью возможна очистка почвы от тяжелых металлов.

В связи с тенденцией роста цен на ископаемое топливо производство биодизельного топлива на основе растительного масла (в том числе рапсового) становится всё более привлекательным. В данном случае рапс является возобновляемым источником энергии. Жидкое топливо из семян рапса может применяться в виде рапсового масла в чистом виде, в виде смеси рапсового масла и дизельного топлива, а также в виде рапсового метилового эфира. По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН в 2003-04 гг. было собрано 36 млн. тонн семян рапса, а в 2004-05 гг. — 46 млн. тонн [17]. В 2005 году под рапс было отведено около 2% мировой площади пашни. Производство маслосемян рапса отличается высокой экономической эффективностью: при урожайности на уровне 25 ц/га рентабельность может составлять более 100% [17].

По объемам производства маслосемян за последние 30 лет он переместился с пятого на третье место после сои и хлопчатника [7]

Также в качестве биотоплива используют биоэтанол, полученный из разных видов растений (рис 4).



**Рис. 4.** Дальность езды (тыс. км/га) при использовании биоэтанола из сахарной свеклы, ржи и пшеницы (расход бензина 8 л/100 км, 1,4 л биоэтанола = 1 л бензина) и при использовании биодизеля из рапса (расход биодизеля = 8 л/100 км)

Главным препятствием к широкому применению рапса являлось низкое качество масла, которое из-за высокого содержания в нем эруковой и линоленовой кислот и незначительного количества линолевой относили к второсортному. А плохая усвояемость шротов, обусловленная гликозинолатами, снижала их кормовую ценность и ограничивала использование в животноводстве и птицеводстве. Однако благодаря достижениям современной селекции эти проблемы постепенно теряют свою актуальность.

**Селекция на устойчивость.** Возрастание площадей возделывания рапса, узкая генетическая база современных сортов, наличие большого количества болезней и вредителей, повреждающие рапс в течение вегетационного периода, создают реальные предпосылки для массового развития болезней и вредителей.

Наиболее вредоносными заболеваниями являются альтернариоз, пероноспороз, фузариоз, наименьшую опасность представляют мучнистая роса, черная ножка, серая гниль, кила. Наиболее распространенные вредители – крестоцветные блошки, рапсовый цветоед, семенной и стеблевой скрытнохоботники, рапсовый пилильщик.

Поиск источников устойчивости ведется в мировом сорimente рапса с последующим изучением их донорских свойств [12]. Увеличению генетического разнообразия доноров устойчивости способствует половая гибридизация на внутривидовом, межвидовом и межродовом уровнях, использование методов мутагенеза, клеточной селекции и генной инженерии.

*Создание сортов рапса продовольственного направления.* При создании сортов масличного направления основное внимание уделяется на получение высокоурожайного селекционного материала с высоким содержанием масла в семенах и улучшению его качества, определяемого соотношением жирных кислот.

Рапсовое масло состоит из ненасыщенных (олеиновая, линоленовая, эруковая, эйкозеновая) и насыщенных (стеариновая, пальмитановая) жирных кислот. Их ценность во многом определяется направлением использования растительного масла.

Для пищевого использования требуется два типа растительного масла с различным содержанием кислот: для изготовления маргарина и для жарения и приготовления различных блюд. Для обоих видов нежелательными являются эруковая и эйкозеновая жирные кислоты, оказывающие вредное воздействие на организм животных и людей. Они также вызывают помутнение растительного масла при длительном хранении, что затрудняет приготовление из него маргарина. Содержание эруковой кислоты в пищевом масле не должно превышать 2%.

Нежелательно в масле и высокое содержание полиненасыщенной линоленовой кислоты. Хотя она и обладает высокой питательной ценностью, но очень неустойчива и окисляется с образованием соединений, придающих маслу прогорклый вкус.

Одним из направлений селекции является создание сортов с содержанием в семенах более 40% линолевой кислоты. Эта полиненасыщенная кислота играет важную роль в окислительных процессах нервных клеток, является основным компонентом клеточных мембран [12].

По содержанию олеиновой кислоты и вкусовым качествам рапсовое масло приравнивается к оливковому, пользуется спросом и считается одним из лучших растительных масел.

Жмых и шрот, получаемые при прессовании или экстрагировании масла из семян рапса, содержат 40-42% белка, хорошо сбалансированного по аминокислотному составу. Однако питательная ценность ограничивается наличием серосодержащих соединений – гликозинолатов, которые под действием фермента

мирозиказы разлагаются на вредные компоненты, влияющие на щитовидную железу, уменьшающие аппетит и рост животных, и их плодовитость.

Исходя из этого, в современной селекции ведется направление на создание двунулевых сортов рапса («00»), характеризующихся отсутствием эруковой кислоты и низким содержанием гликозинолатов. Допустимое количество гликозинолатов в различных странах варьирует от 10 до 54 ммоль/г [12].

Перспективной, но труднореализуемой задачей, стоящей перед селекционерами, является создание трехнулевых сортов («000»), т.е. безэруковых, низкогликозинолатных и желтосемянных. Создать стабильные генотипы по этому признаку пока не удастся, хотя получены формы с желто-бурой и желтой окраской семян в Польше, Китае, Канаде, Швеции, России. Создание сортов типа «000» позволит снизить содержание сырой клетчатки в семенах (соответственно улучшится переваримость). За счет утоньшения семенной оболочки на 7-10% повысится суммарное количество белка и масла. Светлая окраска семян упрощает технологию производства и очистки масла – отпадает необходимость предварительного удаления оболочек, не изменяется цвет масла.

***Создание сортов рапса технического использования.*** В последнее время в некоторых странах Западной Европы и Северной Америки активизировались исследования по использованию рапсового масла как сырья для химической промышленности, а также осуществляется новый проект по использованию его а качестве биотоплива.

Для перерабатывающей промышленности необходимо создавать сорта с как можно большим выходом масла и с содержанием в нем до 75-80% эруковой кислоты. Также в нем по возможности должно меньше содержаться ненасыщенных линоленовой и линолевой кислот. Кроме этого, необходимо снижать до минимума содержание гликозинолатов в семенах.

В качестве исходного материала используют старые высокоэруковые сорта, которые скрещивают с двунулевыми сортами. Трудность поставленной задачи заключается в том, что не только генетика наследования эруковой кислоты изучена недостаточно, но и исходный материал в этом аспекте практически не изучен [12].

**Создание сортов рапса кормового направления.** Кормовое направление использования рапса предопределяет создание сортов с высоким качеством не только семян, но и зеленой массы.

Такие сорта, в отличие от продовольственных, должны накапливать большую биомассу, обладающую высокими кормовыми достоинствами.

Известно, что кормовое достоинство растений в основном характеризуется их питательной ценностью и поедаемостью животными. Поедаемость зеленого корма, в свою очередь, в значительной мере определяется облиственностью растений.

Одна из основных задач селекции рапса данного направления является дальнейшее повышения белка, хорошо сбалансированного по аминокислотному составу, снижение уровня гликозинолатов в семенах и зеленой массе.

**Селекция на продуктивность.** Продуктивность рапса, как и других сельскохозяйственных культур, обусловлена степенью развития многих количественных и качественных признаков растения. Особенно важны при формировании продуктивности количественные признаки, которые у рапса характеризуются значительной изменчивостью в различных агроэкологических условиях.

На продуктивность влияют такие количественные признаки, как число продуктивных побегов, масса семян со стручка, побега и растения; число семян в стручке, число стручков на побеге и его длина, масса 1000 семян.

Высота растений не является непосредственным элементом продуктивности, но оказывает значительное влияние на нее, т.к. от высоты растений чаще всего зависит их полегаемость, а также форма, количество, размеры и расположение листьев, определяющих уровень физиологических процессов, связанных с урожаем.

Н. И. Вавилов отмечал, что урожай сорта определяется продукцией зерна с гектара и представляет собой конечный результат всех биофизико-химических процессов в течение всей жизни растения во взаимодействии с внешними условиями.

Следовательно, урожайность – это совокупность признаков, генетическая природа большинства которых полигенна. На урожайности отражаются все воздействия факторов окружающей среды в ходе онтогенеза растений. Вследствие этого наследуемость признака урожайности относительно низка, успех отбора на этот признак точно предвидеть нельзя. В этом и кроется причина, по которой селекции на урожайность необходимо уделять особое внимание и затрачивать на нее больше всего времени и труда.

## **ГЛАВА 2. ЗАДАЧИ, УСЛОВИЯ И МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА**

### **2.1. Цель и задачи**

Цель работы – изучение накопления кадмия, свинца и цинка при различных уровнях загрязнения дерново-подзолистой почвы в надземных органах растений рапса для оценки его устойчивости и возможности использования в качестве фиторемедианта.

Основные задачи исследования:

1. Изучить накопление тяжелых металлов в надземных органах.
2. Изучить действие тяжелых металлов на продуктивность, растений рапса.
3. Изучить влияние тяжелых металлов на фертильность пыльцы, содержание хлорофилла в листьях.

### **2.2. Объект исследования**

*Объектом* исследования являлся яровой рапс (*Brassica napus ssp. oleifera*), сорт Подмосковный.

#### **Сорт Подмосковный**

Включен в Госреестр по Центральному (3) и Средневолжскому (7) регионам. Сорт 00 типа. Семядоли средней длины и ширины. Антоциановая окраска гипокотилия отсутствует или очень слабая. Листовая пластинка зеленая,

антоциановая окраска отсутствует, восковой налет на верхней стороне средний. Долей листа среднее количество. Степень развития долей средняя. Зубчатость края листа средняя. Лист средней длины и ширины. Черешок средней длины. Время цветения среднее. Лепестки желтые, средней длины и ширины. Образование пыльцы имеется. Растение при полном цветении средней высоты, общая длина растения, включая боковые ответвления, средняя. Антоциановая окраска стебля отсутствует. Стручок без носика средней длины, носик и цветоножка средней длины. Тенденция к формированию соцветия в год посева при посеве поздним летом сильная. В Центральном регионе средняя урожайность семян 8,8 ц/га на уровне стандарта. В Брянской области, где рекомендуется возделывание сорта, средняя урожайность 15,2 ц/га, выше стандарта на 0,7 ц/га. Высота прикрепления нижних ветвей 47 см. Вегетационный период 91-106 дней. Устойчивость к полеганию 4,5, к осыпанию - 4 балла. Урожайность сухого вещества 24,8 ц/га, облиственность 44,7%. В Средневолжском регионе средняя урожайность семян 11,1 ц/га, выше стандарта на 0,8 ц/га. Содержание жира в семенах 48%, близкое к стандарту или несколько выше. Высота прикрепления нижних ветвей 40 см. Вегетационный период 102-111 дней. Устойчивость к полеганию 4,8, к осыпанию - 3,8 балла. Рекомендуется для возделывания на семена и корм [28].

### **2.3. Место и условия проведения эксперимента**

Работа выполнена в вегетационном домике кафедры агрохимии в 2008-2009 гг. Опыт заложен в сосудах на дерново-подзолистой среднесуглинистой почве. В качестве минерального удобрения использовали нитроаммофоску (2,8 г/сосуд) в соотношении N, P и K 1:1:1 при массе абсолютно сухой почвы в сосуде 4,42 кг. Тяжелые металлы вносили на фоне полного минерального удобрения в виде растворов солей  $ZnSO_4$ ,  $CdCl_2$ ,  $Pb(CH_3COO)_2$ .

### **2.4. Схема опыта**

Варианты опытов подобраны таким образом, чтобы вносимые дозы металлов превышали установленные ПДК по валовым формам.

## **2008 год**

### *Варианты:*

1. контроль – фоновое содержание тяжелых металлов;
2. свинец – 50; 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400 мг/кг почвы;
3. цинк – 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800 мг/кг почвы;
4. кадмий – 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14 мг/кг почвы.

Во второй год схема опыта несколько скорректирована.

## **2009 год**

### *Варианты:*

1. контроль – фоновое содержание тяжелых металлов;
2. свинец – 100; 250; 400; 550 мг/кг почвы;
3. цинк – 200; 400; 600; 800 мг/кг почвы;
4. кадмий – 2; 8; 14; 20 мг/кг почвы.

Расположение вариантов в обоих годах эксперимента – рендомизированное, повторность опыта – четырехкратная. Растения убирали в фазе полной спелости.

### **Характеристика почвы**

Для закладки опыта использовали дерново-подзолистую почву с поля ВНИИ кормов (станция Луговая). Для взятия образца на анализ опытное поле проходили по диагонали, отбирая через равные промежутки почвенные образцы буром на глубину пахотного слоя. Полученный образец был проанализирован и получены следующие данные:

$\text{pH}_{\text{сол}} = 6,1$

$\text{Hг} = 0,63 \text{ ммоль/100г}$

$\text{N}_{\text{общ}} = 0,12\%$

$\text{P}_2\text{O}_5 \text{ подвижный} = 142 \text{ мг/кг}$

$\text{K}_2\text{O}_{\text{обменный}} = 116 \text{ мг/кг}$

Гумус = 1,9%

$\text{S} = 15,5 \text{ мгэкв/100г}$

Мех. состав: средний суглинок

Валовое содержание элементов, мг/кг:

Zn – 41,39±0,19

Pb – 13,26±0,17

Cd – не обнаружен

## **2.4. Методика проведения эксперимента**

### **2.4.1. Измерение биомассы**

Измерение сухой биомассы растений и отдельных органов проводили стандартными общепринятыми методами (Пустовой и др., 1995).

### **2.4.2. Определение содержания тяжелых металлов**

Для определения валового содержания тяжелых металлов органы растений высушивались до воздушно-сухого состояния, после этого измельчались на лабораторной мельнице.

Озоление 1 г навески проводили смесью кислот: 8 мл HNO<sub>3</sub> и 1 мл H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в СВЧ - минерализаторе Anton Paar Multiwave 3000, после чего доводили полученный раствор до 100 мл дистиллированной водой. Содержание ТМ в полученном образце определяли атомно-адсорбционным методом на спектрофотометре КВАНТ – 2 АТ.

### **2.4.3. Определение массы 1000 семян**

Определение проводилось стандартным методом. Семена высыпались на разборную доску, диагоналями делили на 4 треугольника. Из каждой двух противоположных треугольников отсчитывали без выбора по 250 целых семян. Далее объединяли по 500 семян и определяли массу двух полученных проб на технических весах с точностью до 0,01г. Если разница между двумя пробами менее 5%, то полученные данные суммируют и получают массу 1000 воздушно-сухих семян.

### **2.4.4. Определение содержания хлорофилла**

Для количественного определения содержания хлорофилла брали навеску 200 мг листьев (3 лист), помещали в фарфоровую ступку, добавляли немного

диоксида кальция (толченый мел), промытого кварцевого песка и растирали с 10 мл ацетона. После этого экстракт сливали в воронку со стеклянным фильтром №2 и отсасывали насосом.

Перед перенесением вытяжки воронку вставляли при помощи резиновой пробки в колбу Бунзена, соединенную с насосом.

Экстракцию небольшими порциями растворителя повторяли до тех пор, пока пигменты не были извлечены полностью. Колбу Бунзена дважды ополаскивали небольшой порцией ацетона, каждый раз сливая жидкость в мерную колбочку. Далее содержимое колбочки доводили ацетоном до 25 мл и закрывали притертой стеклянной пробкой.

Экстракт хранили в холодильнике, а определение пигментов проводили на рассеянном свете на спектрофотометре.

Содержание хлорофилла рассчитывали по формулам:

$$C_{\text{хл.а}} = 9,784D_{662} - 0,990D_{644};$$

$$C_{\text{хл.б}} = 21,426D_{644} - 4,650D_{662},$$

где  $C_{\text{хл.а}}$ ,  $C_{\text{хл.б}}$  – соответственно концентрации хлорофиллов  $a$  и  $b$ , мг/л;  $D$  – экспериментально полученные величины оптической плотности при соответствующих длинах волн. После этого содержание хлорофилла в мг/л переводили в мг/100 г листьев.

#### **2.4.5. Определение фертильности пыльцы**

Определение фертильности пыльцы проводили в момент начала цветения. Для этого использовали нераскрывшиеся бутоны, у которых начинал выступать венчик. Пыльники из этих цветков препаровальной иглой вскрывали и стряхивали пыльцу на препаратное стекло. Далее добавлялся раствор йода в KI, и сверху накрывалось стекло. Полученный препарат рассматривали под микроскопом. Фертильные пыльцевые зерна были равномерно окрашены коричневым цветом, а стерильные – не окрашивались.

## 2.5. Погодные условия

В целом вегетационный период 2009 года по сравнению с аналогичным периодом 2008 года был теплее на  $0,5^{\circ}$  и солнечнее (на 6%), при отсутствии разницы в относительной влажности воздуха (менее 1%). Однако в период созревания (август) в 2009 году погода была на 1,8 градуса холоднее и на 11% более солнечной.

Посев рапса в 2008 году проводили 12 мая, а в 2009 – на 10 дней позже. При более позднем посеве быстрее появились всходы и соответственно сократился межфазный период от появления всходов до полного цветения. Даты наступления последующих фаз совпадали. На подобную тенденцию указывала В.А. Радовня [7].

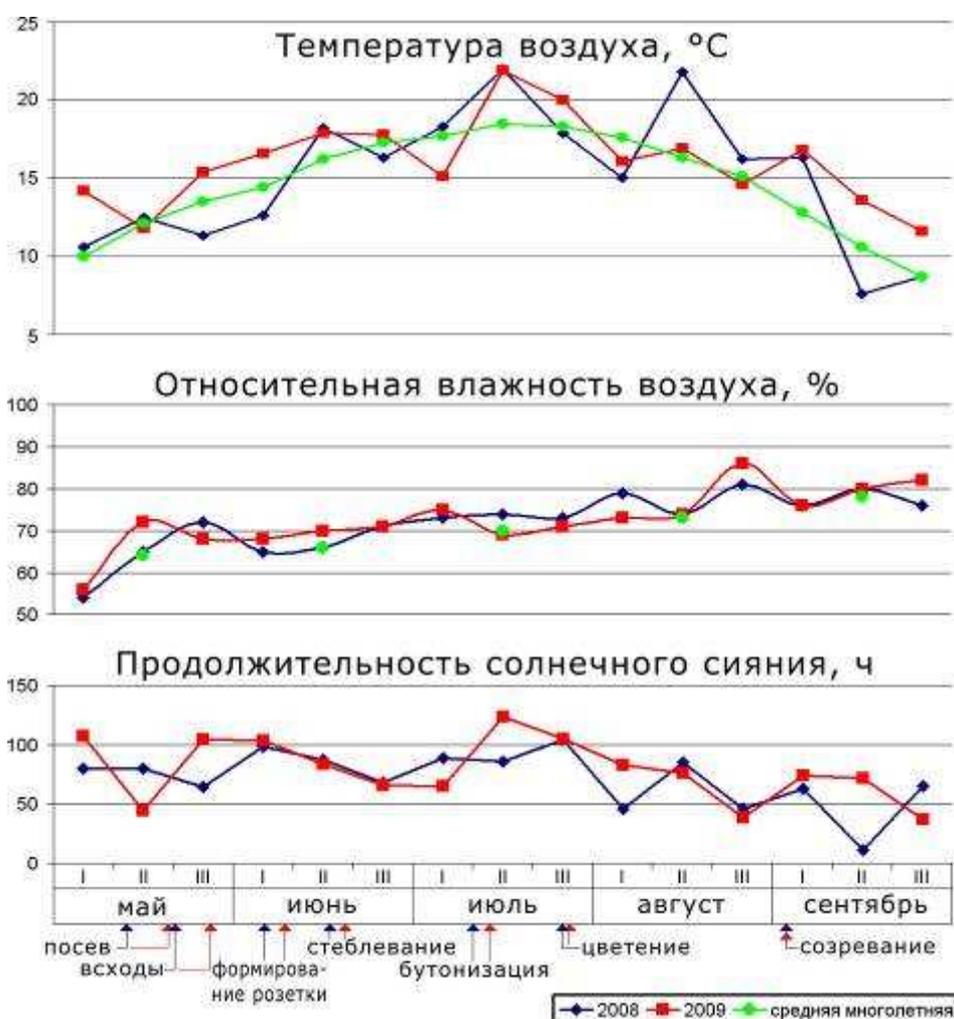


Рис. 5. График метеорологических условий вегетационного периода

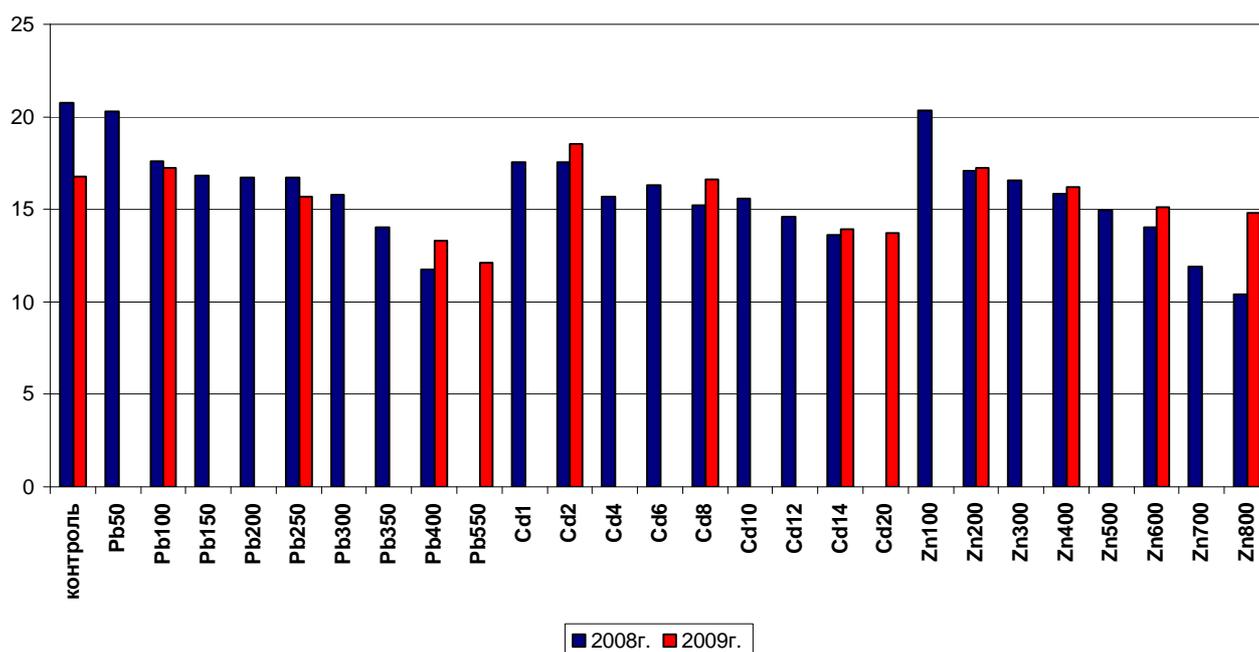
## ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### ***3.1. Продуктивность рапса и структура урожая***

При определении вегетативной массы оказалось, что в эксперименте 2008 года уже при минимальных концентрациях ТМ в почве происходило угнетение растений (рис. 6). С увеличением концентрации ТМ значительно уменьшается биомасса побега у растений рапса. Подобная динамика наблюдалась в экспериментах с ячменем, горохом и кукурузой [15].

Но в 2009 году Cd оказал большее, а Pb и Zn – меньшее токсическое действие на растения, а при низких дозах ТМ происходила стимуляция ростовых процессов.

Надземная масса растений, г/сосуд



НСР <sub>05</sub>	Год эксперимента	
	2008	2009
Pb	0,31	0,29
Cd	0,48	0,52
Zn	0,76	0,69

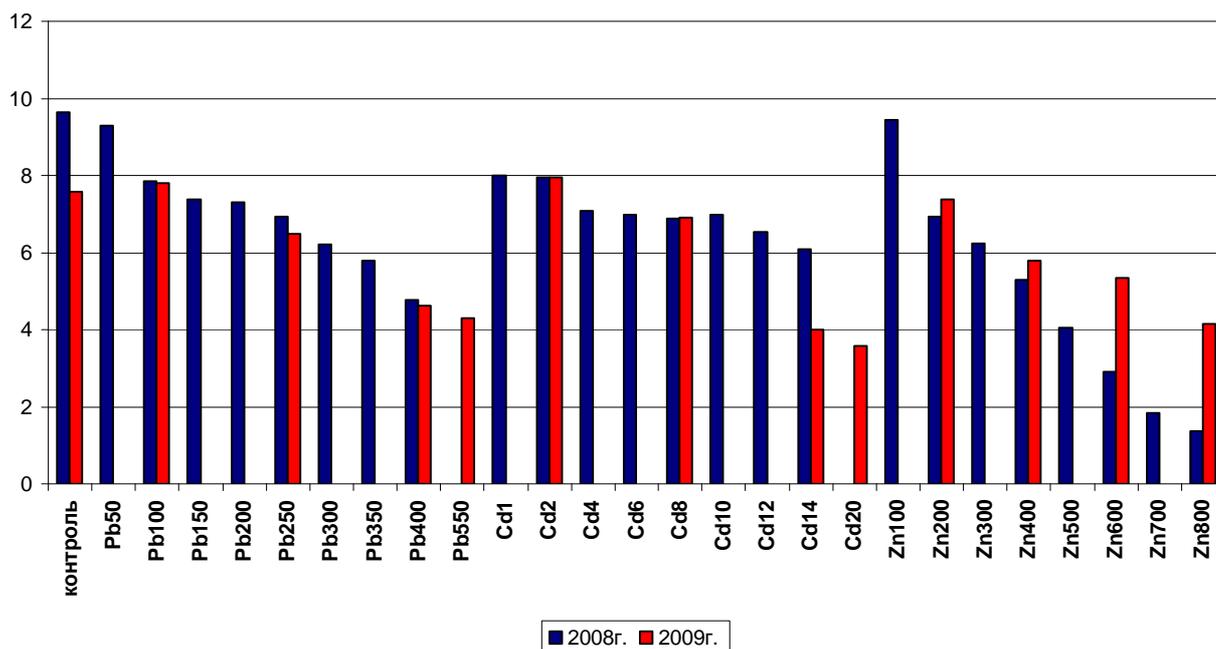
Рис. 6. Изменение надземной массы растений

Небольшое стимулирующее действие невысоких концентраций ТМ отмечено многими авторами, хотя гипотез, объясняющих подобное действие, несколько.

Угнетение растений в опыте 2008 года при невысоких концентрациях металлов можно объяснить маскированием стимулирующего действия неблагоприятными условиями, а также небольшими методическими расхождениями при проведении экспериментов.

Изменение массы семян в целом имеет ту же тенденцию что и изменение вегетативной массы, как по годам исследования, так и в условиях одного года (рис. 7).

Масса семян, г/сосуд



HCP <sub>05</sub>	Год эксперимента	
	2008	2009
Pb	0,42	0,34
Cd	0,36	0,39
Zn	0,43	0,38

Рис. 7. Изменение массы семян

Снижение семенной продуктивности на 50% и более наблюдалось при дозе Pb 400, Zn 500 мг/кг, а максимальная доза Cd снижала этот показатель на 37%. Как было отмечено, 2009 год был более благоприятным, и снижение семенной продуктивности на 50% наблюдалось только в варианте Cd20. Максимальная доза Zn и Pb снизила этот показатель на 45 и 43% соответственно. Таким образом, токсичное действие ТМ определяется не только дозой, но и взаимодействием генотип – среда.

В опытах с пшеницей и конскими бобами наблюдалось значительное понижение урожая семян в присутствии повышенных концентраций кадмия, свинца и цинка [9].

По токсичности для рапса исследуемые элементы выстроились в такой последовательности: Cd > Pb > Zn. Так, Cd в дозе 14 мг/кг снизил семенную продуктивность на 37% (2008 г) и 47% (2009 г), а Pb в большей концентрации (100 мг/кг) снизил на 17% (2008 г), а в 2009 году – увеличил на 3% этот показатель. При

равных дозах (400 мг/кг) Pb снизил массу семян с растения на 47% (2008 г) и 39% (2009 г), а Zn – на 45% и 23% соответственно.

Для сопоставления семенной продуктивности с накопленной надземной биомассой используется коэффициент хозяйственной эффективности – это отношение полученного урожая ко всей надземной биомассе.

В 2008 году Кхоз при увеличении содержания Pb и Zn в семенах имел тенденцию к снижению, а действие Cd практически не менял этот показатель (рис. 8).

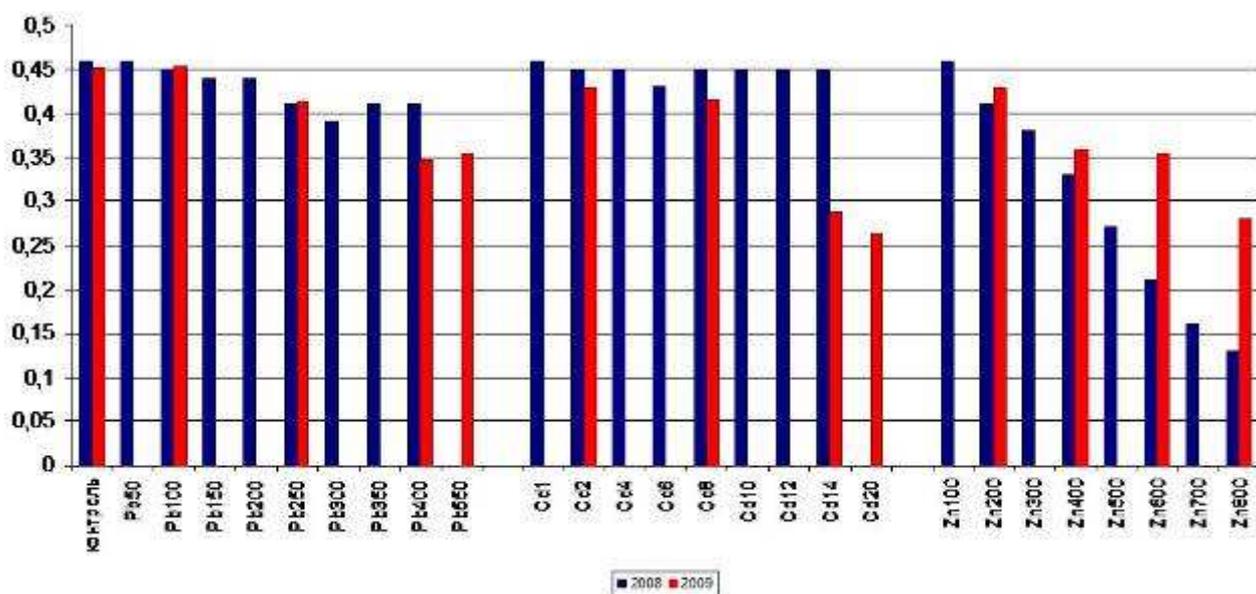


Рис. 8. Кхоз

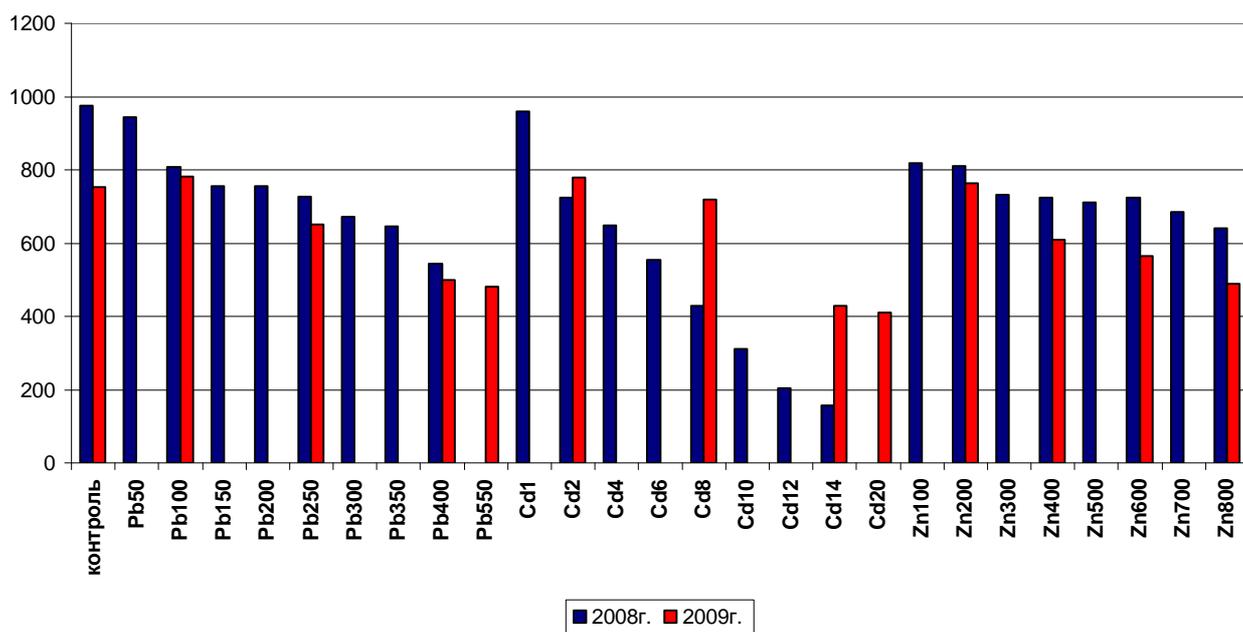
В 2009 году тенденция изменения Кхоз при действии Pb была аналогична, высокие дозы Cd снижали Кхоз, а Zn изменял этот показатель в меньшей степени, т.е. отток ассимилятов из листьев в семена был значительнее.

Но не смотря на стимулирующее действие низких концентраций ТМ в 2009 году, увеличение Кхоз не происходило.

Таким образом, низкие дозы ТМ прежде всего стимулировали рост вегетативной биомассы.

Наибольшее число семян с растения характерно для контроля, а увеличение дозы ТМ в почве снижает этот показатель. Это особенно заметно при действии Pb и Cd, а действие Zn значительно уменьшает число семян только при высоких дозах (рис. 9).

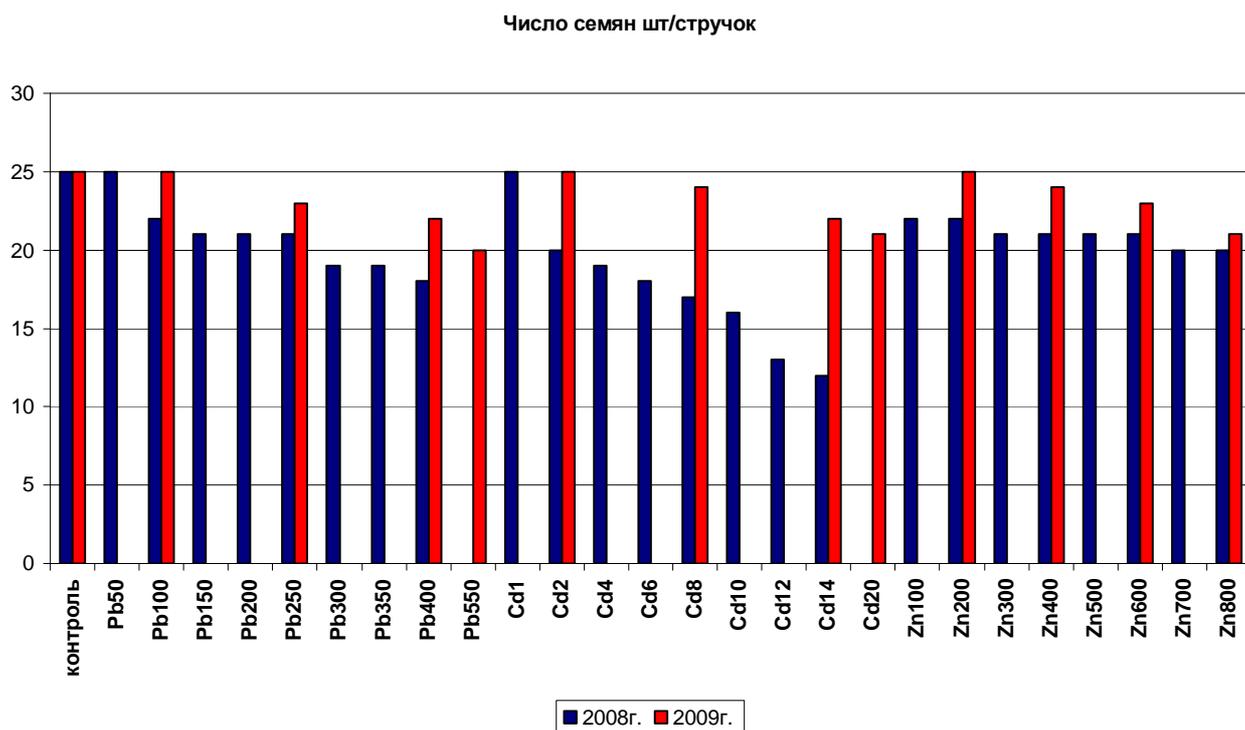
Число семян, шт/раст



НСР <sub>05</sub>	Год эксперимента	
	2008	2009
Pb	41,32	44,68
Cd	34,59	30,12
Zn	38,51	39,81

Рис. 9. Число семян

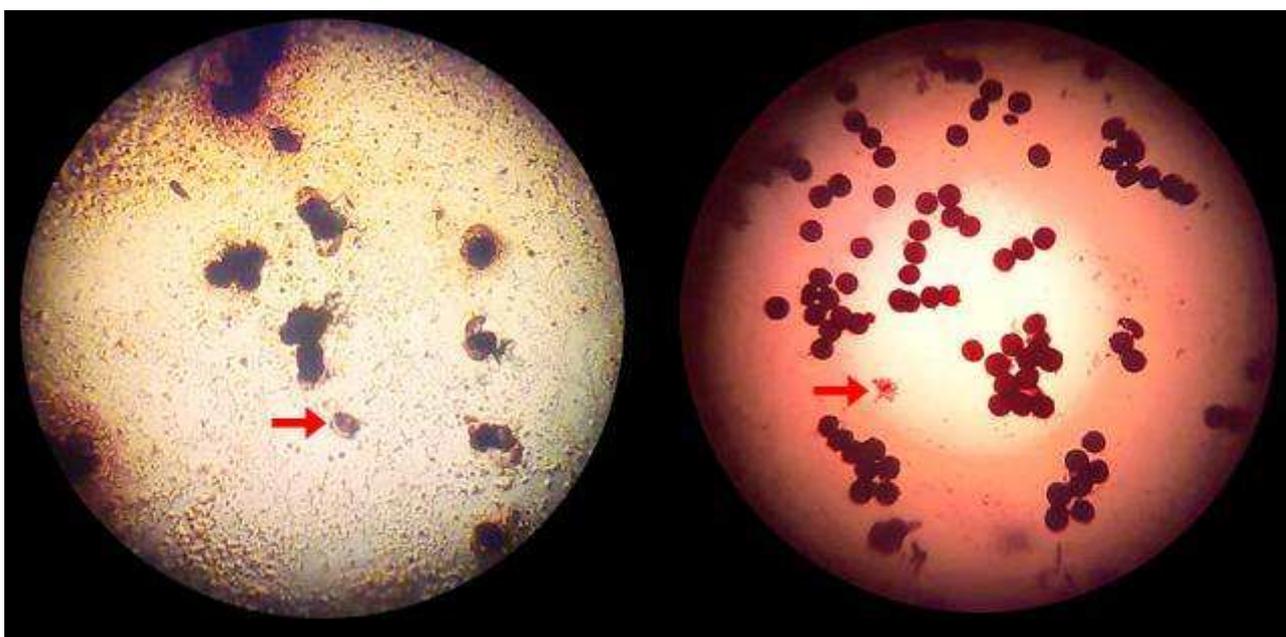
Число семяпочек в завязи определяет число семян на стручок. Последний показатель сильно коррелирует с числом стручков и семян на растении (рис. 10).



НСР <sub>05</sub>	Год эксперимента	
	2008	2009
Pb	0,74	0,67
Cd	0,56	0,51
Zn	0,53	0,47

**Рис. 10.** Число семян со стручка

Однако даже при максимальных концентрациях ТМ снижение фертильности пыльцы не наблюдалось. Были отмечены единичные стерильные пыльцевые зерна (рис. 11).

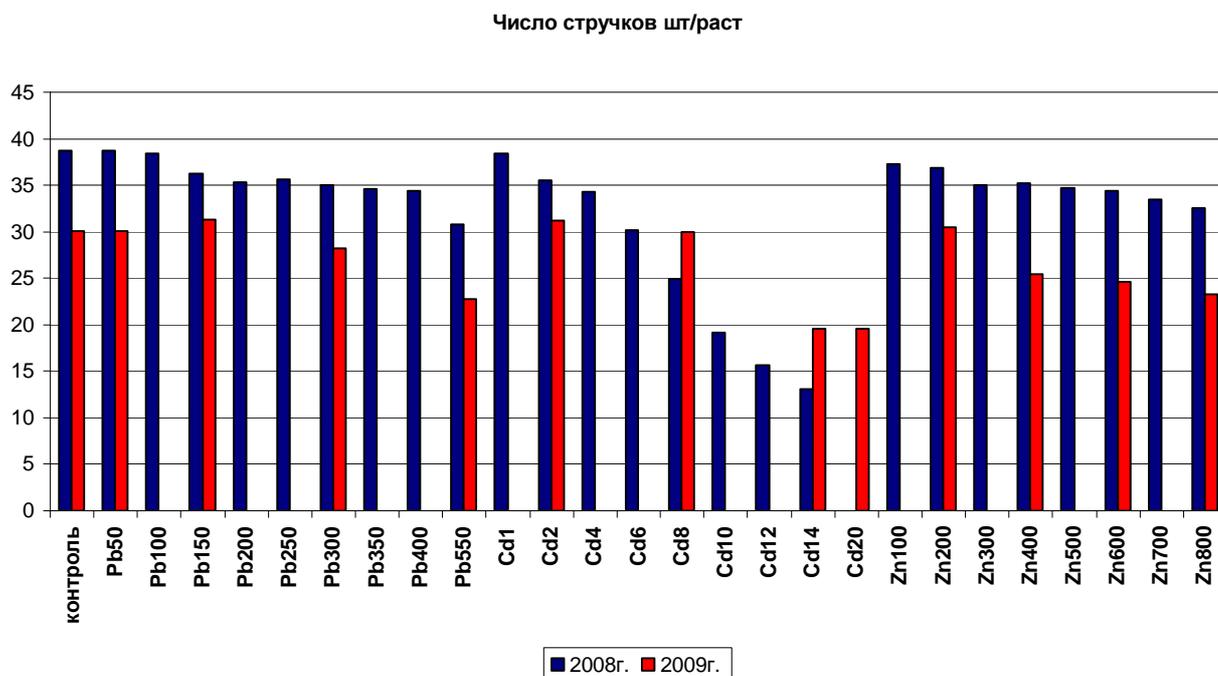


**Рис. 11.** Фертильные и отдельные стерильные (отмечены стрелкой) пыльцевые зерна

Однако высокие концентрации Pb и Cd могут привести к снижению фертильности пыльцы более чем на 10% [6]. Но в любом случае рапс формирует большое число цветков, и в течение онтогенеза даже при оптимальных условиях большая часть завязей опадает. Таким образом, уменьшение числа семян с растения происходит в основном из-за снижения числа завязей и семяпочек.

Аналогичная закономерность наблюдалась в опытах с озимым и яровым ячменем [11].

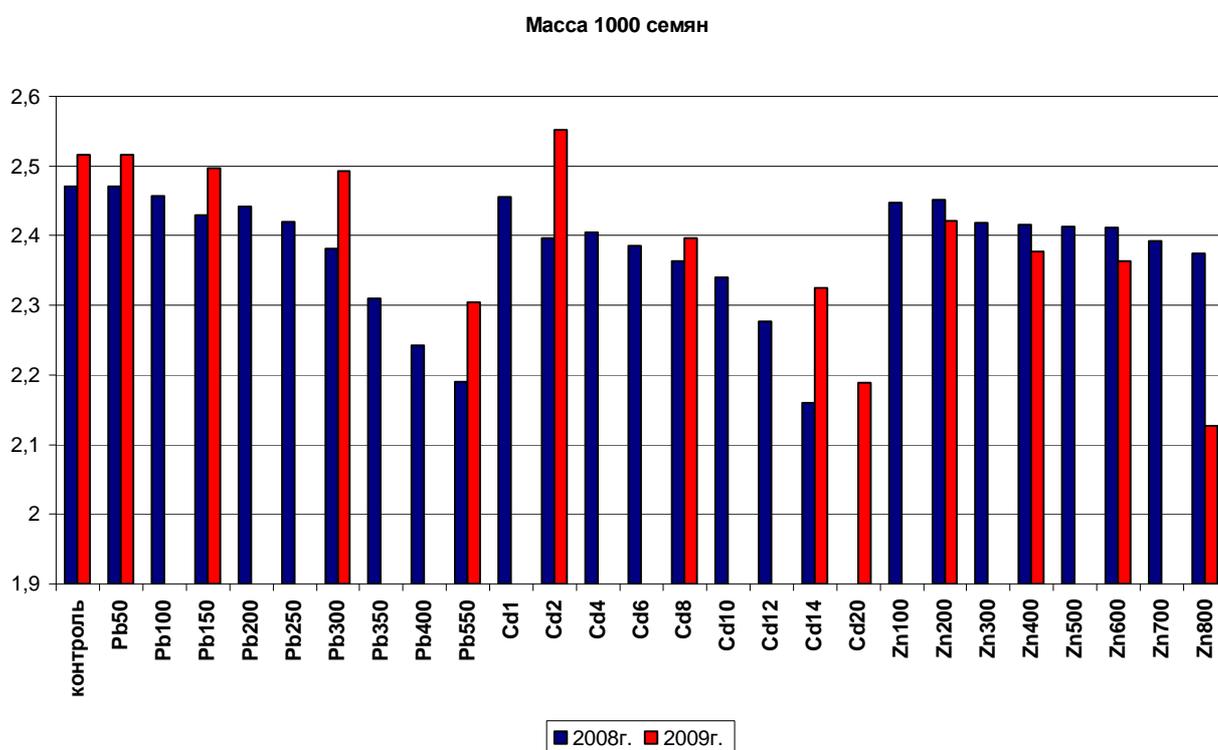
Число завязей определяет число стручков на растении. Действительно, действие ТМ приводит к снижению этого показателя, но в опыте 2009 года при невысоких концентрациях их сохранилось на растении больше, чем на контроле. Число стручков на растении – менее вариабельный показатель, чем число семян в стручке. Таким образом, в 2008 году ТМ оказали большее влияние на развитие семяпочек, чем на количество завязей на растении (рис.12).



НСР <sub>05</sub>	Год эксперимента	
	2008	2009
Pb	0,48	0,54
Cd	0,68	0,61
Zn	0,83	0,78

**Рис. 12.** Число стручков с растения

Наибольшая масса 1000 семян характерна для контроля, а увеличение дозы ТМ в почве снижает этот показатель. Это снижение особенно заметно при действии Pb и Cd а действие Zn значительно уменьшает массу 1000 семян только при высоких дозах (рис. 13).



НСР <sub>05</sub>	Год эксперимента	
	2008	2009
Pb	0,23	0,19
Cd	0,21	0,24
Zn	0,18	0,26

**Рис. 13.** Масса 1000 семян

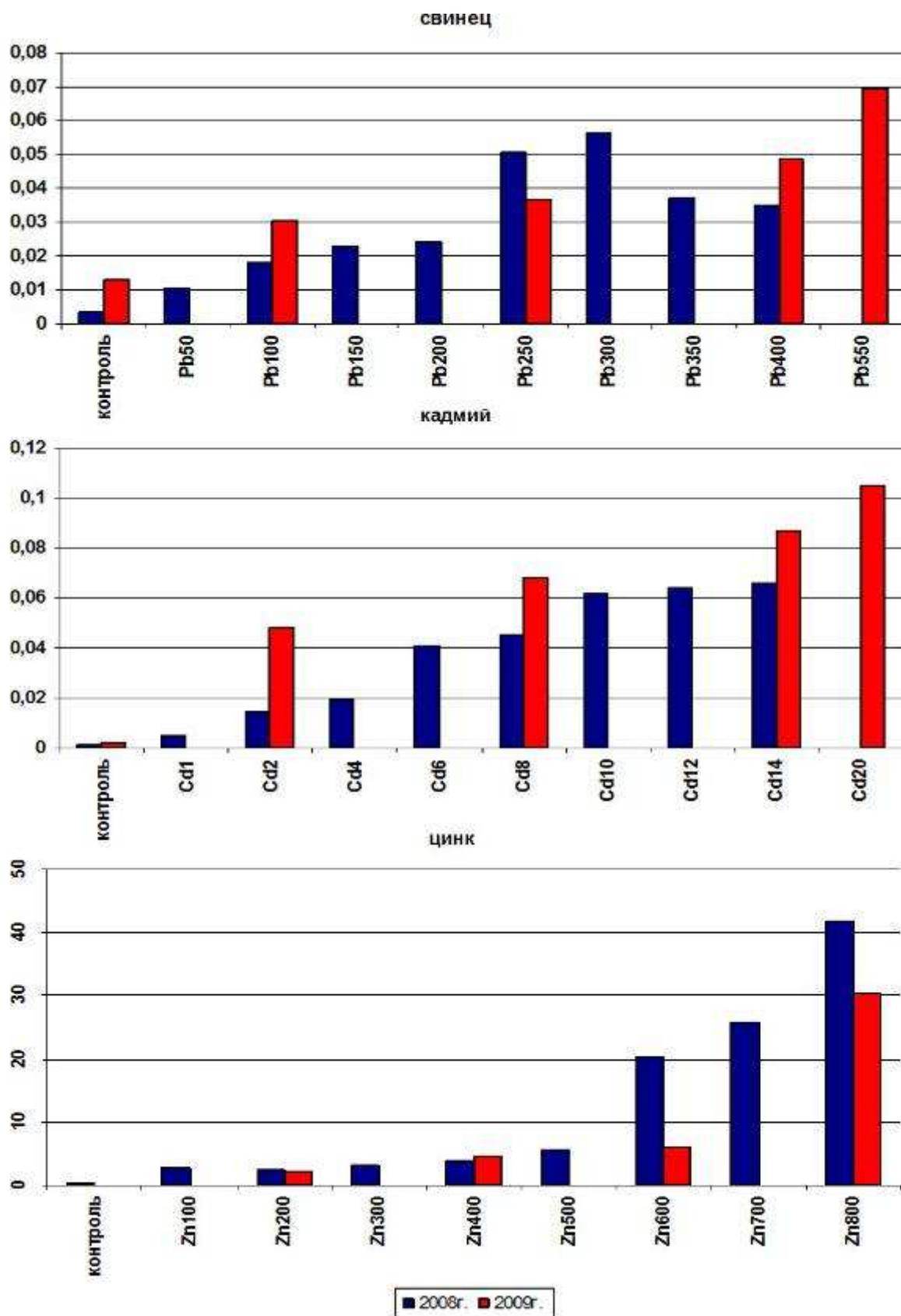
Если пересчитать элементы структуры урожая в процентах по отношению к контролю, то выяснится, что масса 1000 семян являлась более стабильным показателем, чем число семян с растения. Вместе с тем число стручков на растении – менее вариабельный показатель, чем число семян в стручке.

В 2009 году масса 1000 семян также оказалась более стабильным показателем, чем число семян с растения. Известно, что масса 1000 семян во многом определяет их жизнеспособность, и можно сделать вывод о том, что при ограниченных ресурсах пластических веществ, растению рапса выгоднее уменьшение числа семян при сохранении их высокой жизнеспособности.

Число стручков на растении в 2009 году, наоборот, менялось сильнее, чем число семян в стручке. Это говорит о том, что при регулировании семенной продуктивности растения рапса прибегали к обоим этим механизмам.

### ***3.2. Вынос ТМ надземными органами***

Вынос ТМ надземной биомассой и семенами – интегральный показатель, учитывающий как их концентрацию, так и массу соответствующих органов. Вынос исследуемых элементов с надземной биомассой сильно коррелировал с их концентрацией в побеге (рис. 14).



HCP <sub>05</sub>	Год эксперимента	
	2008	2009
Pb	0,017	0,019
Cd	0,015	0,021
Zn	1,438	1,463

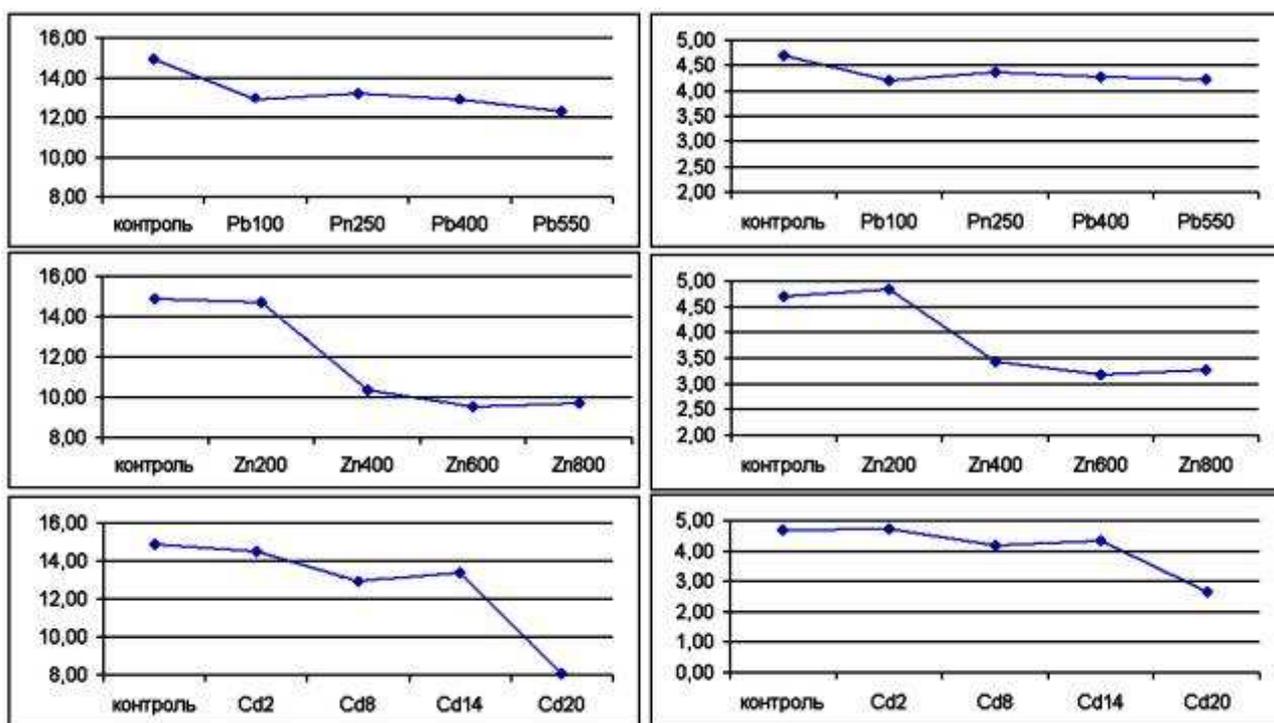
Рис. 14. Вынос свинца, кадмия и цинка надземными органами, мг/растение

Вынос элементов сильно коррелировал и с дозой металла. Однако в опыте 2008 года накопление свинца с надземной массой максимален в варианте Рb300, а при больших концентрациях он падает из-за опережающего снижения накопления биомассы. Таким образом, точка перегиба при данных концентрациях была достигнута только в одном из опытов на Рb, что свидетельствует о высокой устойчивости рапса к исследуемым металлам.

При подсчете эффективности выноса ТМ из почвы, учитывающей их содержание в почве и вынос надземной биомассой, выяснилось, что эффективность выноса Cd и Рb при возрастающих дозах падает, а Zn – наоборот, увеличивается. Это хорошо видно из данных 2009 года, а в 2008 году картина эффективности выноса Рb и Cd размыта. Уменьшение эффективности выноса Рb и Cd объясняется тем, что дополнительные дозы этих металлов не приводят к аналогичному увеличению их содержания в надземной биомассе, т.е. их поступлению в нее сдерживается корнем. Поступлению цинка корень не оказывает значительного сопротивления, и рапс в этом случае ведет себя как аккумулятор этого элемента.

### **3.3. Содержание хлорофилла**

При определении содержания хлорофилла в 3 листе в фазе цветения выяснилось, что Рb незначительно, а Cd и Zn – сильно подавлял биосинтез хлорофилла, о чем можно судить по варьированию его содержания в листе (рис. 15). Однако одним лишь снижением содержания хлорофилла снижение продуктивности объяснить нельзя. Как было отмечено, тяжелые металлы снижают Кхоз, т.е. уменьшают отток ассимилятов в семена.



НСР <sub>05</sub>	a	b
Pb	0,32	0,24
Cd	0,43	0,36
Zn	0,58	0,41

**Рис. 15.** Содержание хлорофиллов *a* (слева) и *b* (справа), мг/100 мг сырой массы листьев

Соотношение хлорофилл *a* / хлорофилл *b* отличалось высокой стабильностью при всех дозах ТМ, и варьировало в пределах 8%. Постоянство данного отношения указывает на неизменность стехиометрического соотношения между комплексами реакционных центров фотосистем и светособирающего комплекса ФС II [15].

## ВЫВОДЫ

1. В условиях загрязнения изучаемыми ТМ почвы установлено снижение накопления биомассы и семенной продуктивности. Масса 1000 семян оказалась более стабильным показателем, чем число семян с растения.
2. Выявлена высокая линейная корреляция между степенью загрязнения почвы ТМ и их выносом с надземными органами растений рапса. Максимальный вынос ТМ наблюдался при их высоких концентрациях в почве.
3. Был установлен высокий потенциал рапса при извлечении из почвы цинка – до 4,5% от его содержания. Ожидаемый период очистки почвы на 50% составляет 16 лет.
4. Выявлено снижение  $K_{\text{хоз}}$  при увеличении дозы ТМ, в оба года эксперимента, не смотря на стимулирующее действие низких концентраций, наблюдавшееся в 2009 году.
5. Снижение фертильности пыльцы не наблюдалось даже при максимальных концентрациях ТМ. Были отмечены единичные стерильные пыльцевые зерна.

## ОХРАНА ТРУДА

### *Меры безопасности при работе в лаборатории*

К работе в лаборатории допускаются лица, прошедшие инструктаж по технике безопасности.

К работе в лаборатории допускаются лица не моложе 18 лет, прошедшие медицинский осмотр, вводный инструктаж по технике безопасности, производственной санитарии и пожарной безопасности, первичный инструктаж по технике безопасности на рабочем месте.

К самостоятельной работе допуск производится после двух недельной стажировки под руководством лица, назначенного распоряжением по лаборатории.

Повторный инструктаж на рабочем месте производится не реже одного раза в три месяца. При введении в действие новых правил, инструкций по охране труда, замене оборудования, при нарушении требований безопасности труда, при несчастных случаях, по требованию органов надзора, работник должен пройти внеплановый инструктаж, при допуске к производству опасных или ранее невыполняемых им работ – целевой инструктаж.

Работа в лаборатории сопряжена со следующими видами опасности:

- электрический ток; источники: электронагревательные, электроизмерительные и электроосветительные приборы;
- наличие вредных веществ и агрессивных жидкостей;
- наличие легковоспламеняющихся жидкостей;
- работа со стеклянными посудой и приборами.

Работа в лаборатории сопряжена с нормами бесплатной выдачи спецодежды и защитных средств персоналу:

- халат х/б – на 12 месяцев;
- перчатки резиновые – по мере использования;
- дезинфицирующие средства – на 12 месяцев.

Во время рабочего дня сотрудники лаборатории обязаны выполнять правила внутреннего трудового распорядка, требования инструкций по технике безопасности, распоряжения и указания непосредственного руководителя,

руководителя отдела и зам. руководителя отдела, направленные на безопасное выполнение работ.

При работе необходимо пользоваться защитной спецодеждой: халат х/б.

При выполнении работ, требующих защиты кожного покрова, и органов зрения следует использовать соответствующие средства индивидуальной защиты: резиновые перчатки, защитные очки, прорезиненный фартук.

При обнаружении неисправностей оборудования, приборов, приспособлений, которые могут привести к несчастному случаю, прекратить пользование ими и сообщить руководителю.

В случае производственного травматизма каждый работник лаборатории обязан:

- в зависимости от характера травмы уметь оказать пострадавшему доврачебную помощь;
- при необходимости вызвать машину скорой медицинской помощи;
- сообщить о случившемся руководителю отдела или его заместителю;
- если возможно, принять меры к устранению причин, вызвавших получение травмы;
- при расследовании причин несчастного случая сообщить все известные обстоятельства происшедшего.

В течение рабочего дня сотрудники лаборатории обязаны соблюдать правила личной гигиены, в том числе:

- при работе со стерильными объектами пользоваться резиновыми перчатками;
- используемую спецодежду (халат) и полотенце регулярно подвергать обработке дезинфицирующими средствами или кипячению;
- не принимать пищу в производственных помещениях лаборатории и в рабочих халатах;
- не использовать производственные холодильники для хранения пищевых продуктов;
- не выходить в спецодежде за пределы территории предприятия.

Не допускать присутствия на своем рабочем месте лиц, не имеющих отношения к выполняемой работе.

Не выполнять распоряжения и задания, противоречащие правилам техники безопасности.

Поддерживать надлежащее санитарное состояние на рабочем месте.

Сотрудники отдела, не выполняющие требований настоящей инструкции, привлекаются к ответственности согласно действующему законодательству.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агроэкологическая характеристика пахотных почв Российской Федерации по содержанию тяжелых металлов, мышьяка и фтора (по состоянию на 01.01.2000 г.). Агроконсалт. Москва 2002. - 50 с.
2. Барабой В.А. Петрина Л.Г. Металлотиионеины: структура и механизмы действия. Укр. биохим. журн. 2003, Т.75. С.28-36.
3. Важенина Е.А. Химические и минералогические исследования почв в окрестностях металлургических предприятий. Бюл. Почв. ин-та им. В.В.Докучаева. 1983, Вып.35. С.32-36.
4. Виноградов А.П. Среднее содержание химических элементов в главных типах изверженных горных пород земной коры. Геохимия, 1962, №7. С.555-571.
5. Евсеева Т., Юранева И., Храмова Е. Механизмы поступления, распределения и детоксикации тяжелых металлов у растений. 2003, Физиология растений, Т. 133, С. 218-229.
6. Егоркина Г.И., Бабич Т.В. Реакция мужского гаметофита культурных растений на загрязнение почвы тяжелыми металлами // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. Барнаул, 2008. №5. С. 23-26
7. Жолик Г.А. Особенности формирования урожая семян ярового и озимого рапса в зависимости от элементов технологии и факторов среды. – Горки: БГСХА, 2006. 188 с.
8. Ильин В.Б. Тяжелые металлы в системе почва – растение. – Новосибирск: Изд. Наука, 1991. – 150 с.

9. Ильин В.Б., Гармаш Г.А., Гармаш Н.Ю. Влияние тяжелых металлов на рост, развитие и урожайность сельскохозяйственных культур // Агрехимия. 1985. №6. С.90-100
10. Кабата-Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях. М.: Мир, 1989, С.109-120, 158-164.
11. Казнина Н.М., Лайдинен Г.Ф., Венжик Ю.В., Титов А.Ф. Влияние кадмия на некоторые анатомо-морфологические показатели листа и содержание пигментов у ячменя // Вопросы общей ботаники: традиции и перспективы. Казань, 2006. Ч. 1. С. 153-155
12. Карпачев В. В. Рапс яровой, основы селекции. Липецк, 2008, 103-126с.
13. Кошкин Е. И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур. 2010, С. 398 – 400.
14. Серегин И.В. Фитохелатины и их роль в детоксикации кадмия у высших растений. Успехи биологической химии, 2001. Т.41. С.283-300.
15. Титов А. Ф., Таланова В. В., Казнина Н. М., Лайдинен Г. Ф., Устойчивость растений к тяжелым металлам // Институт биологии КарНЦ. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. 172 с
16. Третьяков Н. Н., Кошкин Е. И., Макрушин Н. М. и др., Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений, 2-е изд. – М.: КолосС, 2005. –282с., 656с.
17. Хамчиев Б. Б. Рапс – стратегическая культура //АгроXXI, 2007, №4-6 // ООО «Издательство Агрорус»
18. Хендерсон П. Неорганическая геохимия. М.: Мир, 1985. – 339с.
19. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев //Биохимические методы в физиологии растений. М.: Наука, 1971. С.154-170.
20. Hall J.L. Cellular Mechanisms for Heavy Metal Detoxification and Tolerance. J. Exp. Botany, 2002. V. 53. P. 1–11.
21. Hall J. L., Williams E. Transition metal transporters in plants. J. Exp. Botany, 2003, V. 54, № 393, P. 2601-2613

22. Howden R., Goldsbrough P.B., Andersen C.R., Cobbett C.S. Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiology*, 1995. V.107. P.1059–1066.
23. Paulsen I.T., Saier Jr. M.H. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *Journal of Membrane Biology*, 1997. V. 156 P. 99–103.
24. Rout G.R., Das P. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. *Agronomie*, 2003. V.23, P. 3-11.
25. Capability of *Brassica napus* to Accumulate Cadmium, Zinc and Copper from Soil // G. Rossi, A. Figliolia, S. Socciarelli, B. Pennelli // *Acta Biotechnologica* // Volume 22, Issue 1-2 , Pages 133 – 140
26. Yruela I. Copper in plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, 2005. V.17, P. 145-156
27. Van der Zaal B.J., Neuteboom L.W., Pinas J.E., Chardonnens A.N., Schat H., Verkleij J.A.C., Hooykaas P.J.J. Over-expression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiology*, 1999. V. 119. P.1047–1055.
28. [www.gossort.com](http://www.gossort.com)