



Институт физиологии растений им.К.А.Тимирязева РАН
Лаборатория физиологии корня

Роль низкомолекулярных хелаторов в транспорте и накоплении металлов в растениях



И.В.Серегин
А.Д.Кожевникова

Источники загрязнения среды тяжелыми металлами

1. Сжигание жидкого и твердого топлива
2. Металло-плавильное производство
3. Сбрасывание сточных вод
4. Внесение в почву химикатов, в т.ч. удобрений
5. Горнорудные разработки

Загрязнение почв России тяжелыми металлами





Растения, способные к накоплению металлов, привлекают все большее внимание биологов, геохимиков и экологов.

Изучение этих растений поможет выяснить фундаментальные механизмы поглощения, транспорта, а также молекулярные механизмы детоксикации этих элементов, направленные на поддержание гомеостаза.

Angel Guevara-Garcia et al., 2017

Растения металлофитной флоры: (a) *Polygonum aviculare* (Hg); (b) *Minuartia verna* (Zn); (c) *Viola lutea* ssp *calaminaria* (Zn); (d) *Armeria maritima* spp. *halleri* (Zn); (e) *Noccaea goesingensis* (Ni); (f) *Viola lutea* ssp *westfalica* (Pb); (g) *Cardiminopsis halleri*; (h) *Noccaea caerulescens* (Cd, Zn, Ni); (i) *Silene vulgaris*; (j) *Alyssum wulfenianum*; (k) *Noccaea serpaifolium*; (l) *Viola tricolor* (факультативный металлофит).

Исключатель

Накапливают в подземных органах

Thlaspi arvense

Гипераккумулятор

Накапливают в надземных органах

Nocca caerulescens
(ранее *T. caerulescens*)

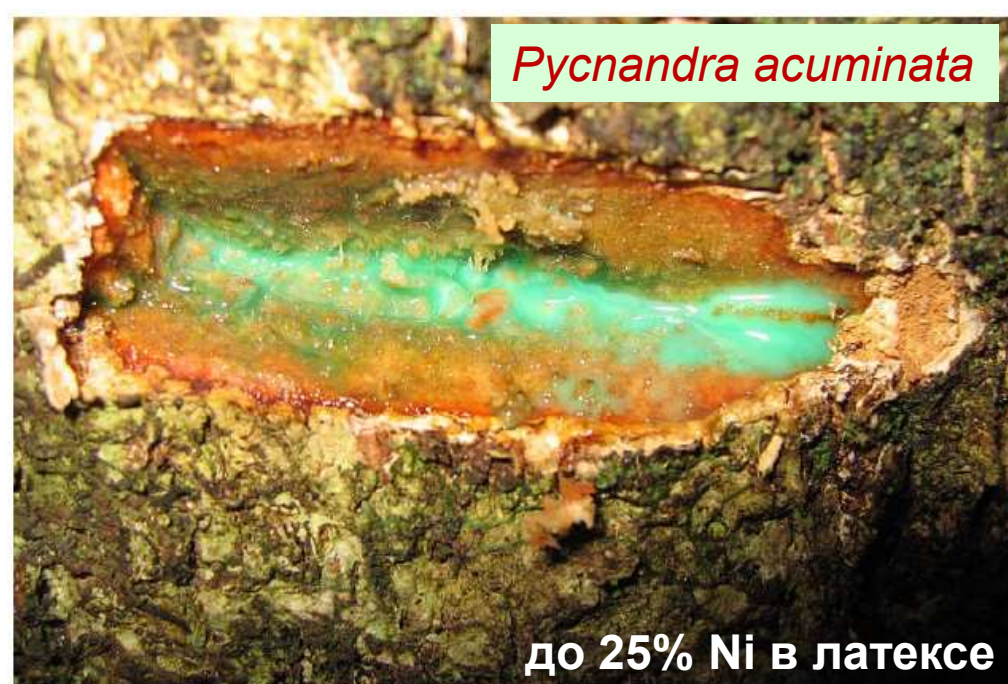


Высокое содержание **цинка** (Zn) было впервые описано еще в 1865 г. у *Nocca caerulescens* (ранее *Thlaspi caerulescens*) [цит. по Kramer, 2010].

Необычно высокое содержание **никеля** (Ni) в растениях было впервые обнаружено в 1948 г. у *Alyssum bertolonii* [Minguzzi, Vegnano, 1948], а затем у *Hybanthus floribundus* [Severne, Brooks, 1972].

Одной из ключевых задач современной экологической физиологии растений является изучение механизмов, определяющих избирательное накопление металлов у двух контрастных групп растений: исключателей, у которых металлы накапливаются главным образом в корневой системе, и аккумуляторов, у которых они накапливаются преимущественно в надземных органах [Brooks *et al.*, 1977].

Руснандра acuminata



до 25% Ni в латексе



Callahan *et al.*, 2006

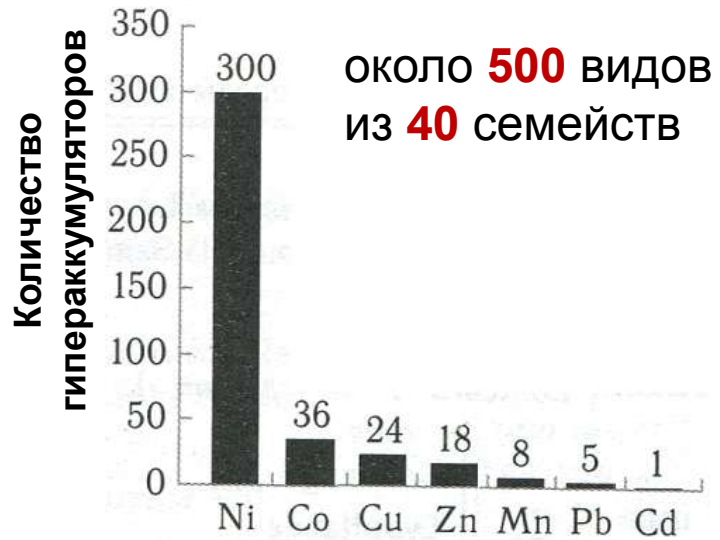
Термин **«гипераккумулятор»** был впервые предложен Т. Jaffré с соавторами в 1976 году для описания растений *Руснандра acuminata*, ранее относившаяся к роду *Sebertia*.

Содержание металла в побегах гипераккумуляторов в % от сухой массы превышает:

Металл	Содержание в побегах
Цинк (Zn)	< 1%
Марганец (Mn)	
Никель (Ni)	< 0.1%
Кобальт (Co)	
Медь (Cu)	
Селен (Se)	
Кадмий (Cd)	< 0.01%
Мышьяк (As)	

Baker, Brooks, 1989; Reeves, Baker, 2000

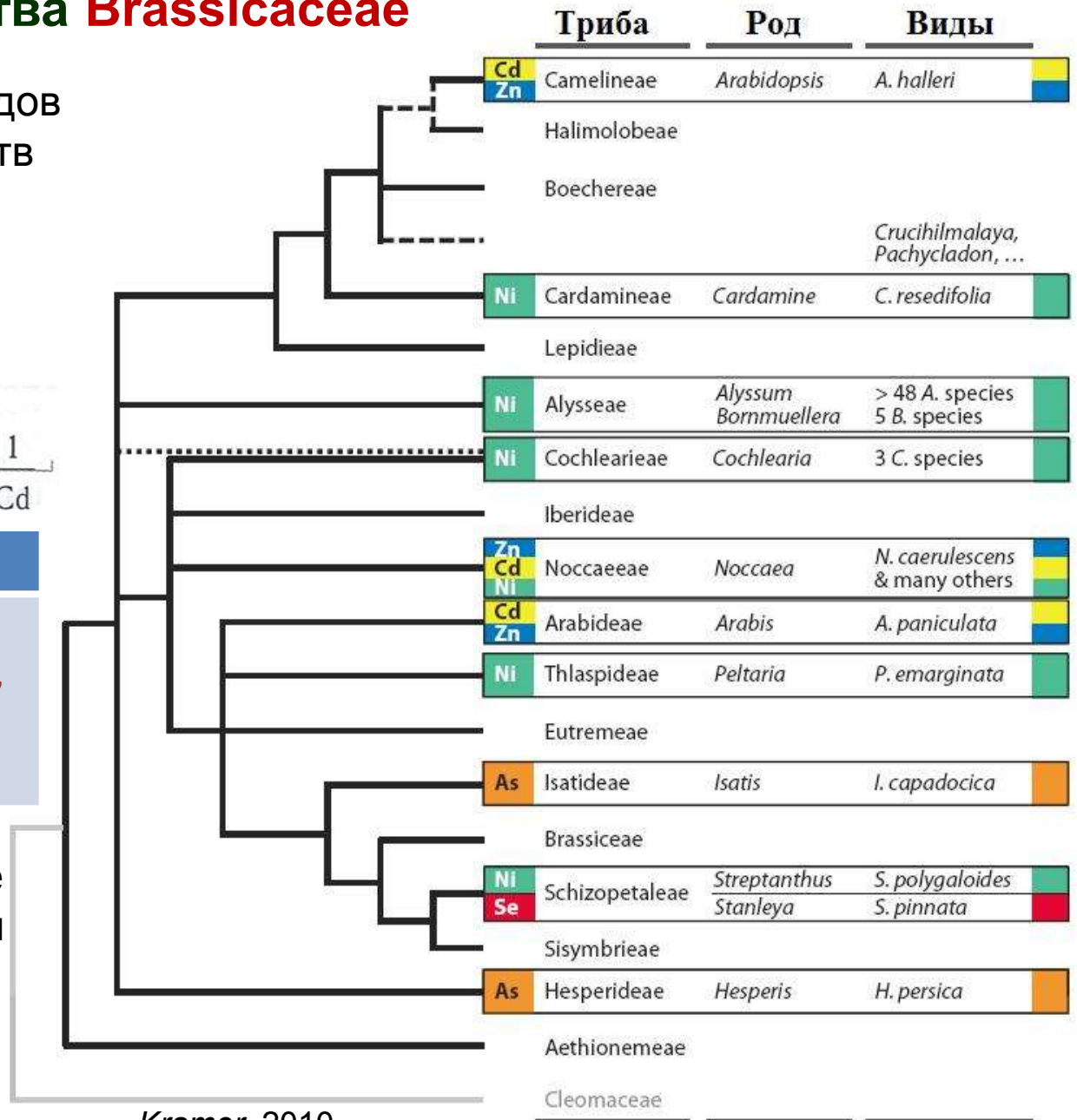
Возникновение способности к гипераккумуляции металлов у растений из семейства **Brassicaceae**



Преобладающие семейства

Brassicaceae, Asteraceae, Cyperaceae, Fabaceae, Poaceae, Caryophyllaceae, Violaceae, Lamiaceae, Euphorbiaceae

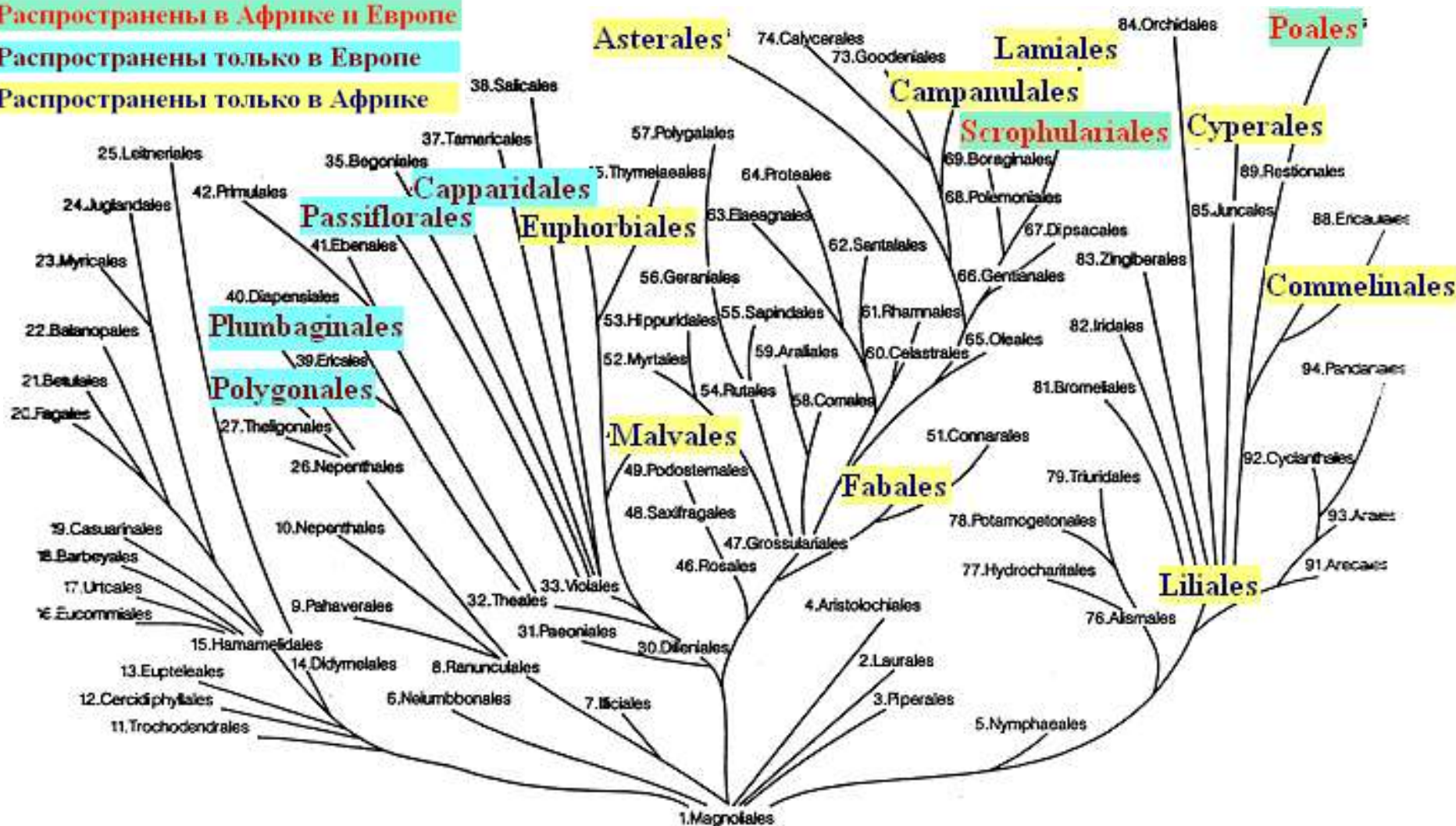
Механизмы, определяющие устойчивость к ТМ, должны были возникнуть раньше в процессе эволюции, чем способность к аккумуляции.





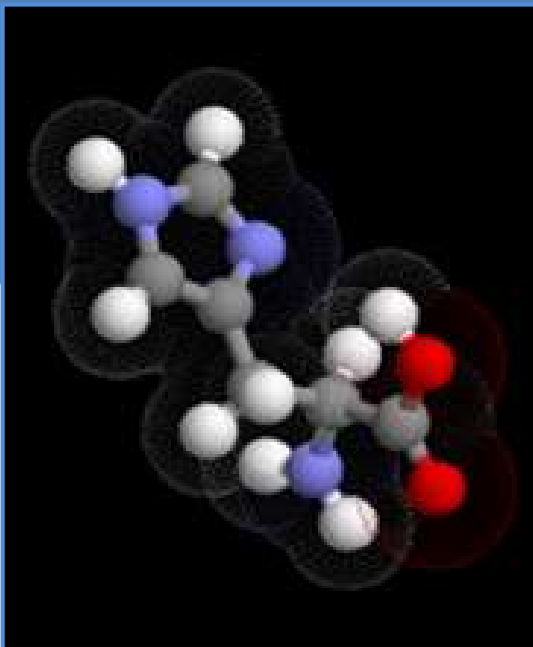
Kramer, 2010

Порядки покрытосеменных растений с наибольшим количеством устойчивых видов аккумуляторов [Ernst, 2000]






- Распространены в Африке и Европе
- Распространены только в Европе
- Распространены только в Африке



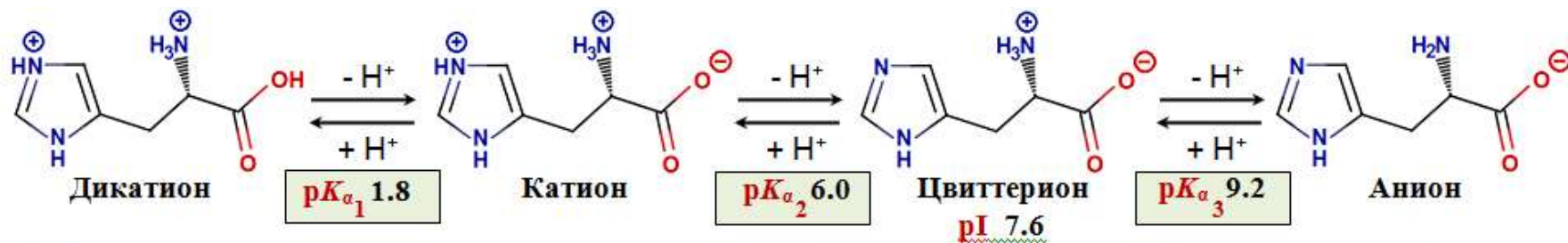
 гены, определяющие способность к гипераккумуляции и устойчивость не являются видоспецифичными, а по-разному экспрессируются у гипераккумуляторов и исключателей.
 устойчивость к металлам и способность к гипераккумуляции находятся под независимым генетическим контролем [Macnair *et al.*, 1999; Verbruggen *et al.*, 2009; Lin, Aarts, 2012]



Гистидин – важнейший внутриклеточный хелатор

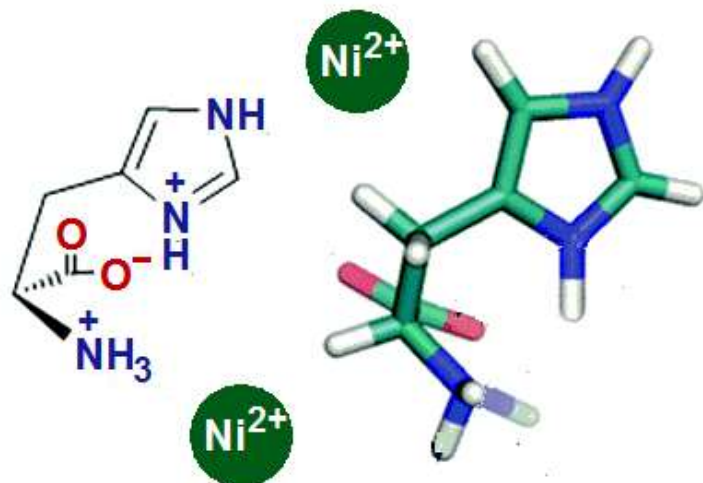
-  **Никотианамин**
-  **Мугеиновая кислота**
-  **Органические кислоты**
-  **Фитохелатины**
-  **Металлотioneины**

Гистидин – внутриклеточный хелатор у растений

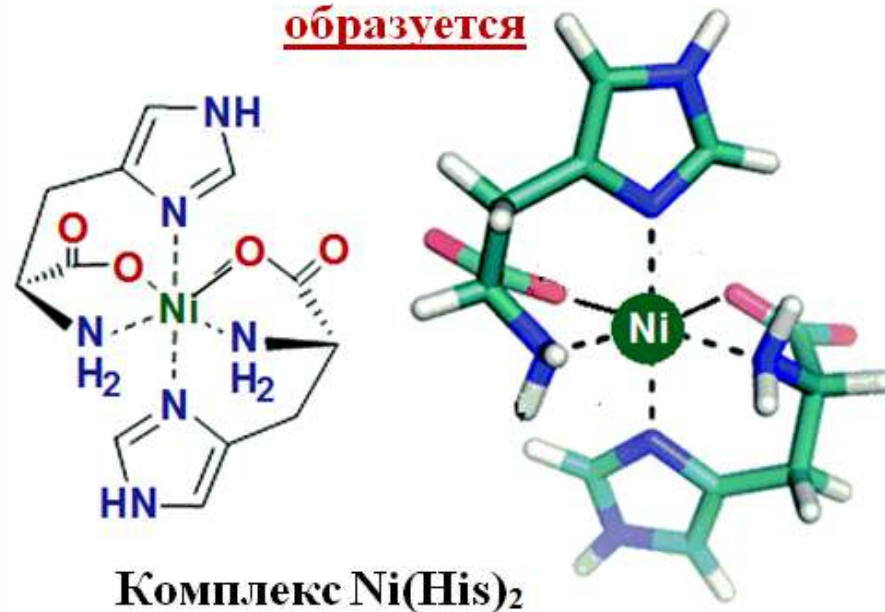


Заряд при pH	+ 2 0 - 1	+1 4 - 5	0 7.6	-1 11-12
		pH киселемного сока 5.5-6.2, pH вакуолярного сока 4.5-6.0	pH цитоплазмы 7.2-7.5	

Стабильный комплекс гистидина с металлом **не образуется**



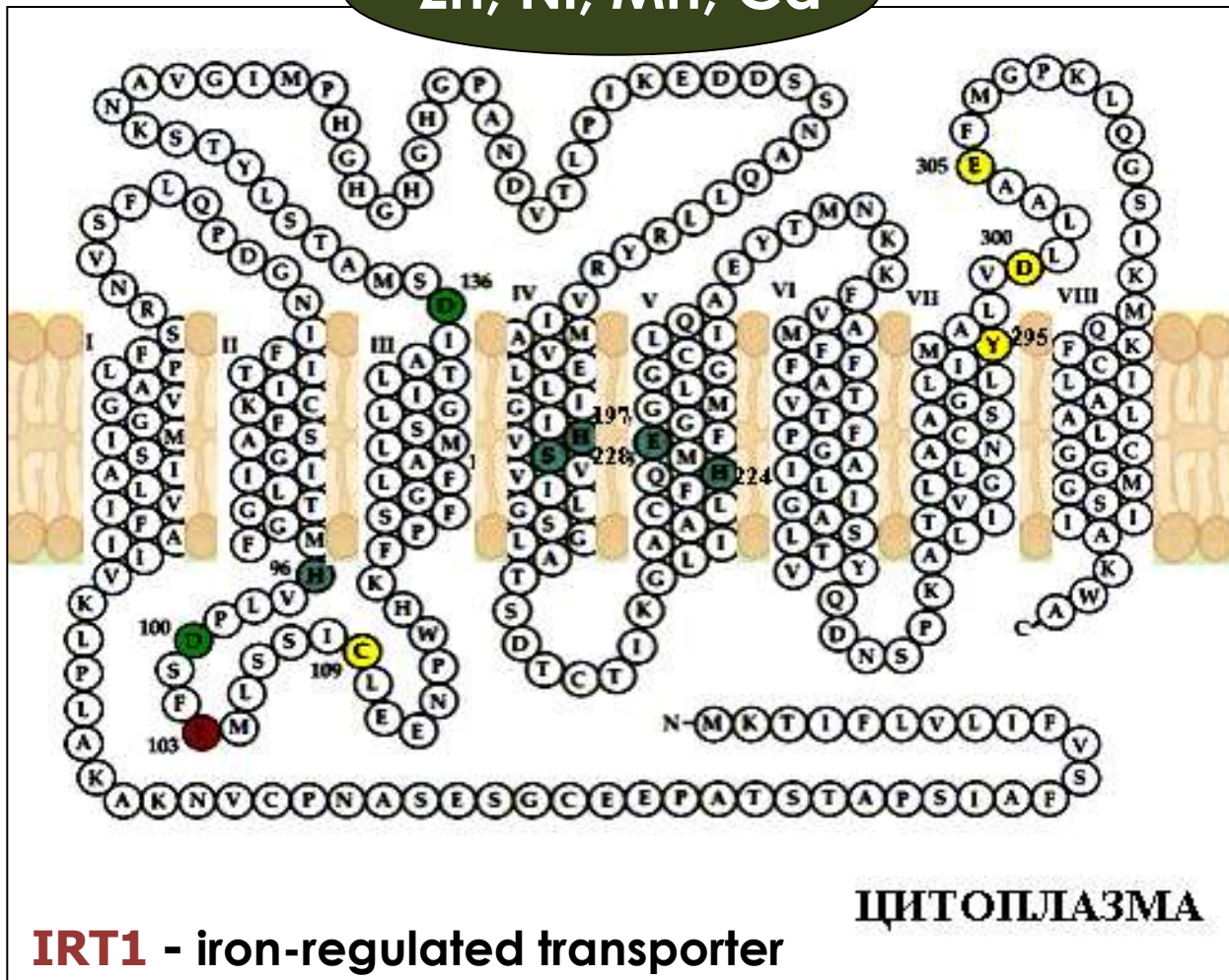
Стабильный комплекс гистидина с металлом **образуется**



Равновесие между протонированными и депротонированными формами L- гистидина. Структура комплексов приведена по Martell, Smith, 1974, значения pH по Salt *et al.*, 1999; Monsanto *et al.*, 2011.

Транспортеры и ферменты с **ГИСТИДИН-**содержащими доменами. Цинковые пальцы

Zn, Ni, Mn, Cd



Семейства транспортеров

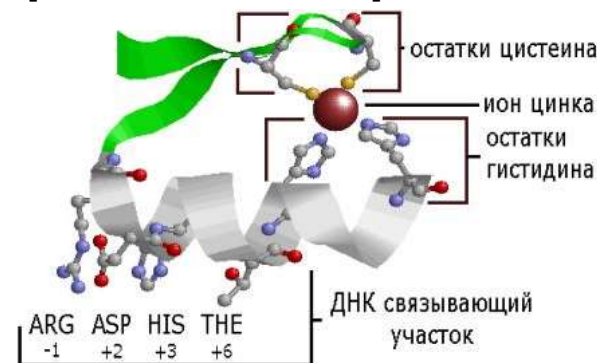
ZIP, Nramp, HMA и CDF

[Hall, Williams, 2003; Hussain *et al.*, 2004; Eren *et al.*, 2006]

Ферменты с гистидин-содержащими доменами

Карбоангидраза
Супероксиддисмутаза
Алкогольдегидрогеназ

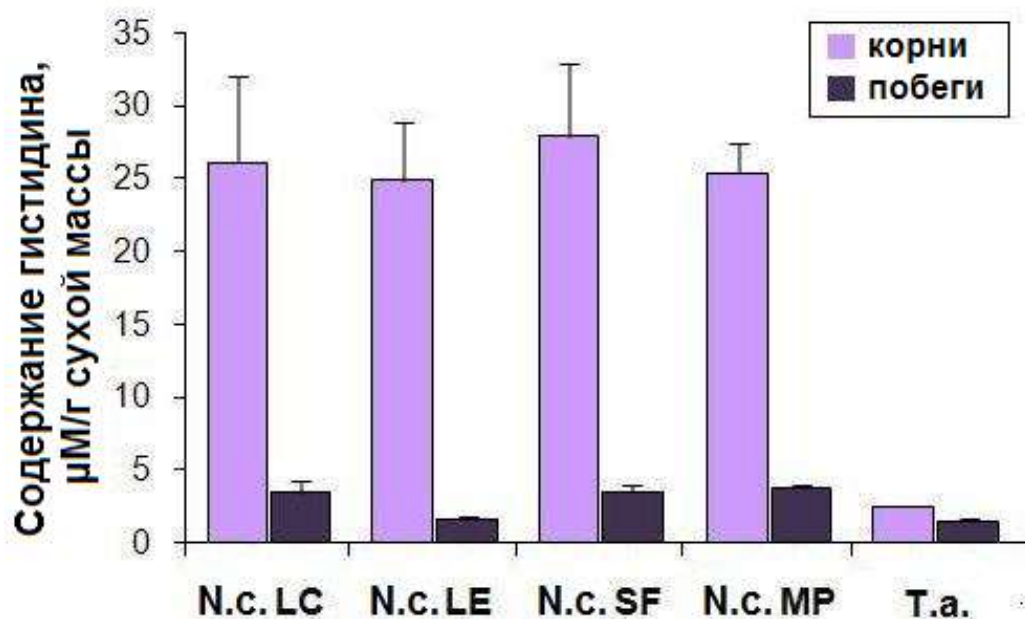
[Monsant *et al.*, 2011]



Цинковые пальцы

IRT1	Zn Ni Mn Cd	Транспорт в цитоплазму	Rogers <i>et al.</i> , 2000; Schaaf <i>et al.</i> , 2006
MTP1	Zn, Ni	Транспорт в вакуоль	Persans <i>et al.</i> , 2001

Содержание свободного гистидина в корнях и побегах растений *Nocca caerulea* (N.c. 4 экотипа) и *Thlaspi arvense* (Т.а.)



Richau *et al.*, 2009

Экотипы гипераккумулятора *N. caerulea*:

LC – La Calamine и **SF** – Saint Félix de Pallières

с каламиновых почв, богатых Zn, Cd, Pb;

LE – Lellingen с неметаллоносных почв;

MP – Monte Prinzera с серпентиновых почв,

богатых Ni

Несмотря на существенные различия в способности накапливать металлы и по устойчивости к ним, разные экотипы *N. caerulea* существенно не различались по эндогенному содержанию гистидина в корнях и побегах.

Высокий уровень гистидина в корнях гипераккумуляторов

Alyssum lesbiacum

Kramer *et al.*, 1996

A. serpyllifolium

Ingle *et al.*, 2005

Nocca caerulea

Richau *et al.*, 2009

Низкий уровень гистидина в корнях исключателей

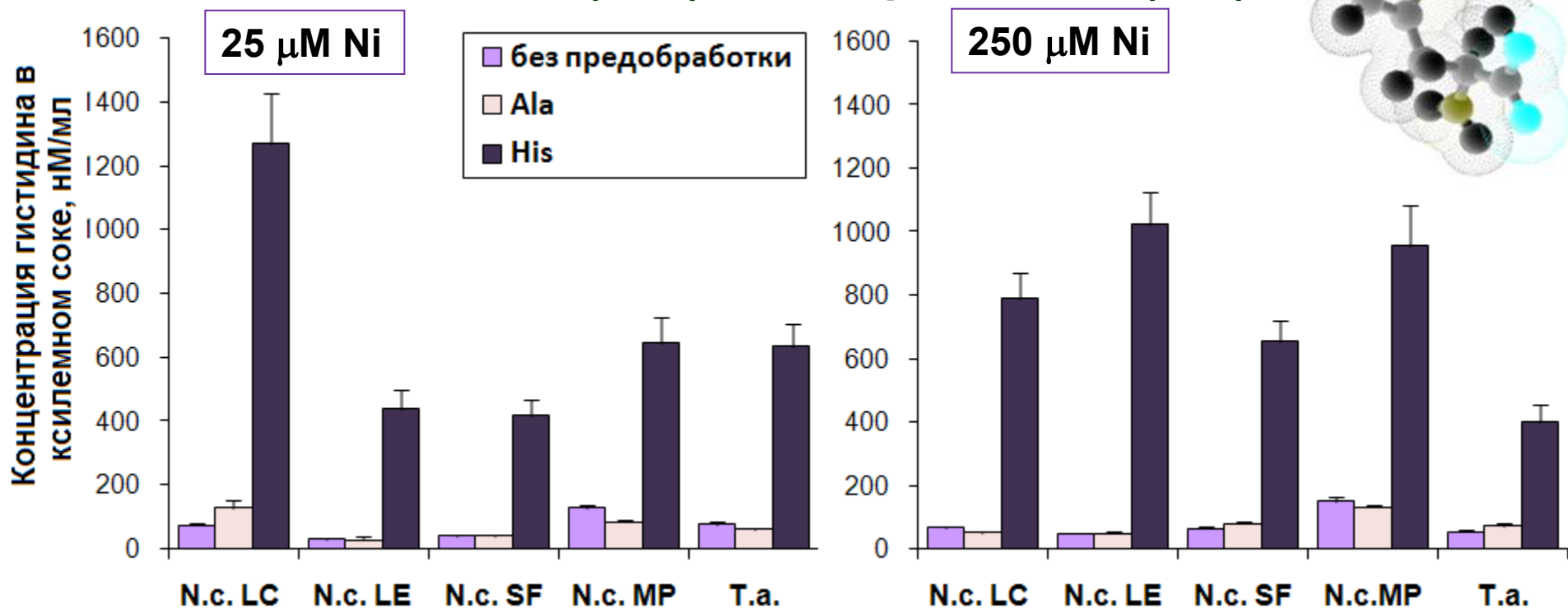
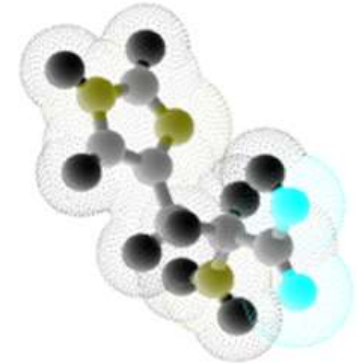
Alyssum montanum

Ingle *et al.*, 2005

Thlaspi arvense


Richau *et al.*, 2009

Содержание гистидина в ксилемном соке растений *Nocca caerulea* (N.c.) и *Thlaspi arvense* (T.a.)

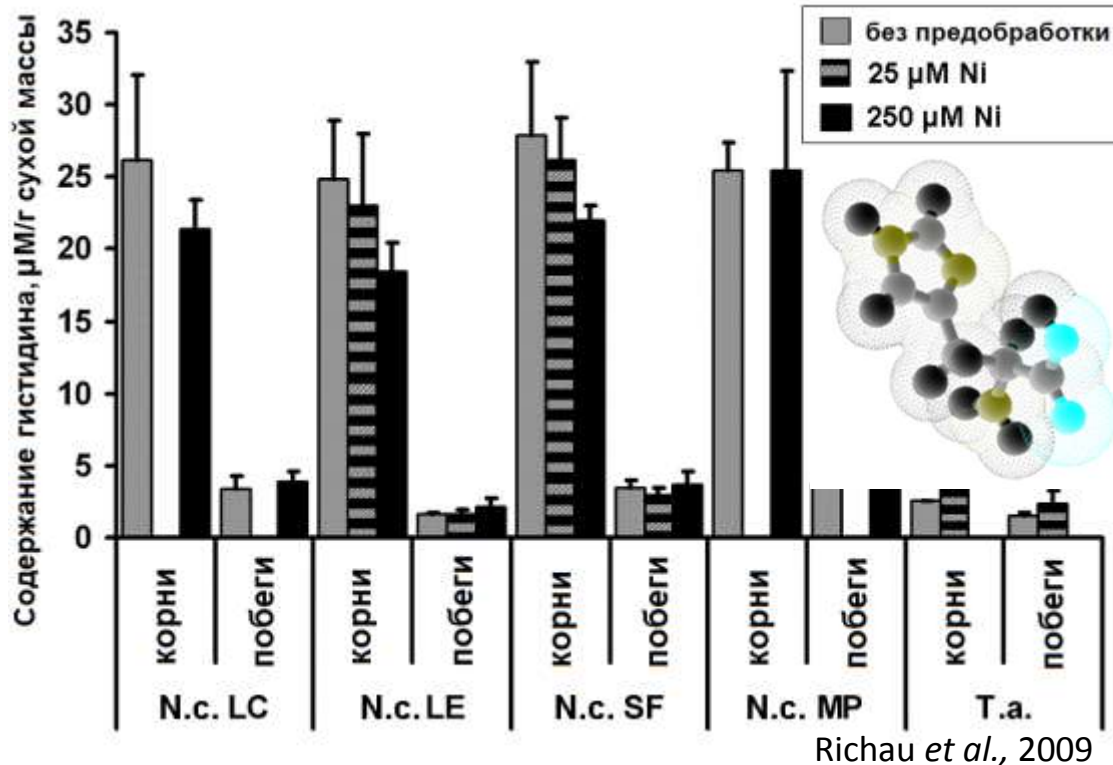


Экотипы *N. caerulea*: **LC** – La Calamine и **SF** – Saint Félix de Pallières с каламиновых почв, богатых Zn, Cd, Pb; **LE** – Lellingen с неметаллоносных почв; **MP** – Monte Prinzera с почв, богатых Ni

Richau *et al.*, 2009

 Гистидин поглощается из питательного раствора корневыми системами как исключателей (*T. arvense*), так и гипераккумуляторов (*N. caerulea*) [Richau *et al.*, 2009]. В поглощении гистидина клетками ризодермы, возможно, играет важную роль транспортер **LHT1** (Lysine Histidine Transporter 1) [Chen, Bush, 1997; Hivner *et al.*, 2006].

Влияние Ni на содержание свободного гистидина у растений

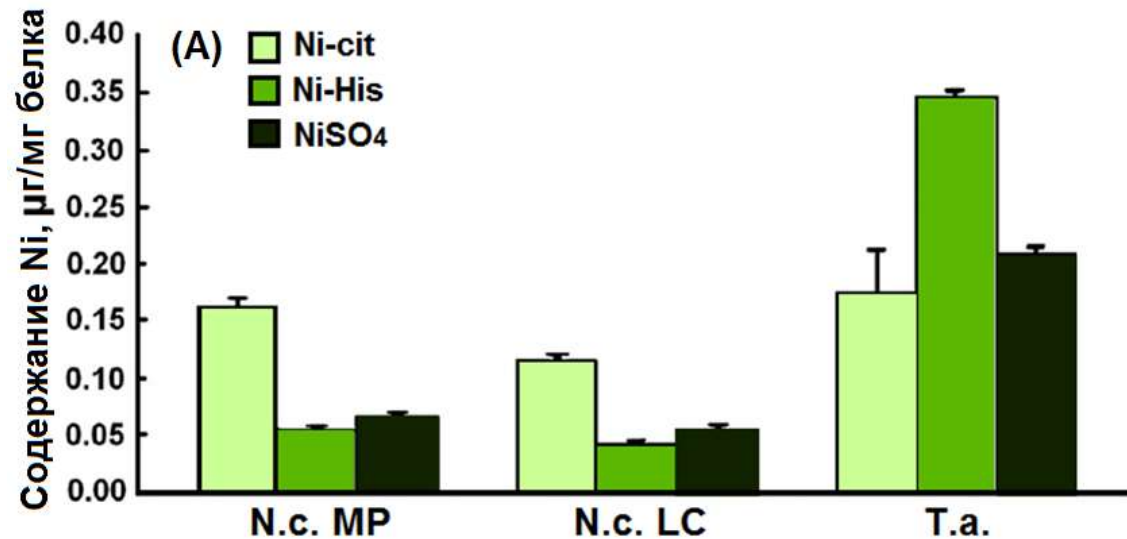


Разная скорость образования и количество образующихся комплексов у разных видов может отчасти объяснить наблюдаемые различия во влиянии Ni на количество свободного гистидина.

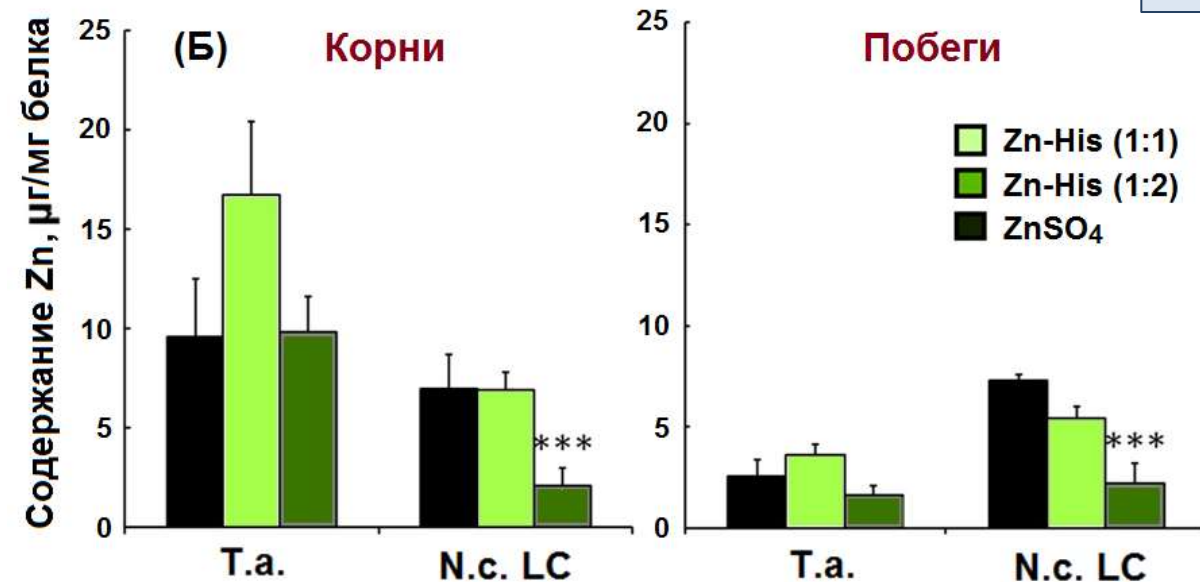
Экотипы *N. caerulea*: **LC** – La Calamine и **SF** – Saint Félix de Pallières с каламиновых почв, богатых Zn, Cd, Pb; **LE** – Lellingen с неметаллоносных почв; **MP** – Monte Prinzera с почв, богатых Ni

Вид растения	Концентрация Ni, μM	Изменение содержания свободного гистидина		Источник
		Побеги	Корни	
<i>Alyssum lesbiacum</i>	300	↑	0	Kerkeb, Kramer, 2003
<i>Noccaea caerulea</i>	25, 250	0	0	Richau et al., 2009
<i>Noccaea goesingense</i>	50	0	↓	Persans et al., 1999
<i>Alyssum montanum</i>	3	0	0	Kramer et al., 1996
<i>Thlaspi arvense</i>	25	0	0	Richau et al., 2009

Содержание Ni (А) и Zn (Б) в тонопластных везикулах *Thlaspi arvense* (Т.а.) и *Nocca caerulescens* (N.c., экотип LC) после 100 с инкубации в присутствии 100 μ M цитрата Ni, Ni-His (1:1), NiSO₄ (А) или Zn-His (1:1), Zn-His (1:2), ZnSO₄ (Б)



Связывание металлов с гистидином ограничивает поступление металлов в вакуоли клеток коры корня, облегчая их поступление в ксилему у гипераккумуляторов, тогда как у исключателей Ni и Zn накапливаются в клетках коры



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 Phytologist*, 2009, vol. 183, pp. 106–116.

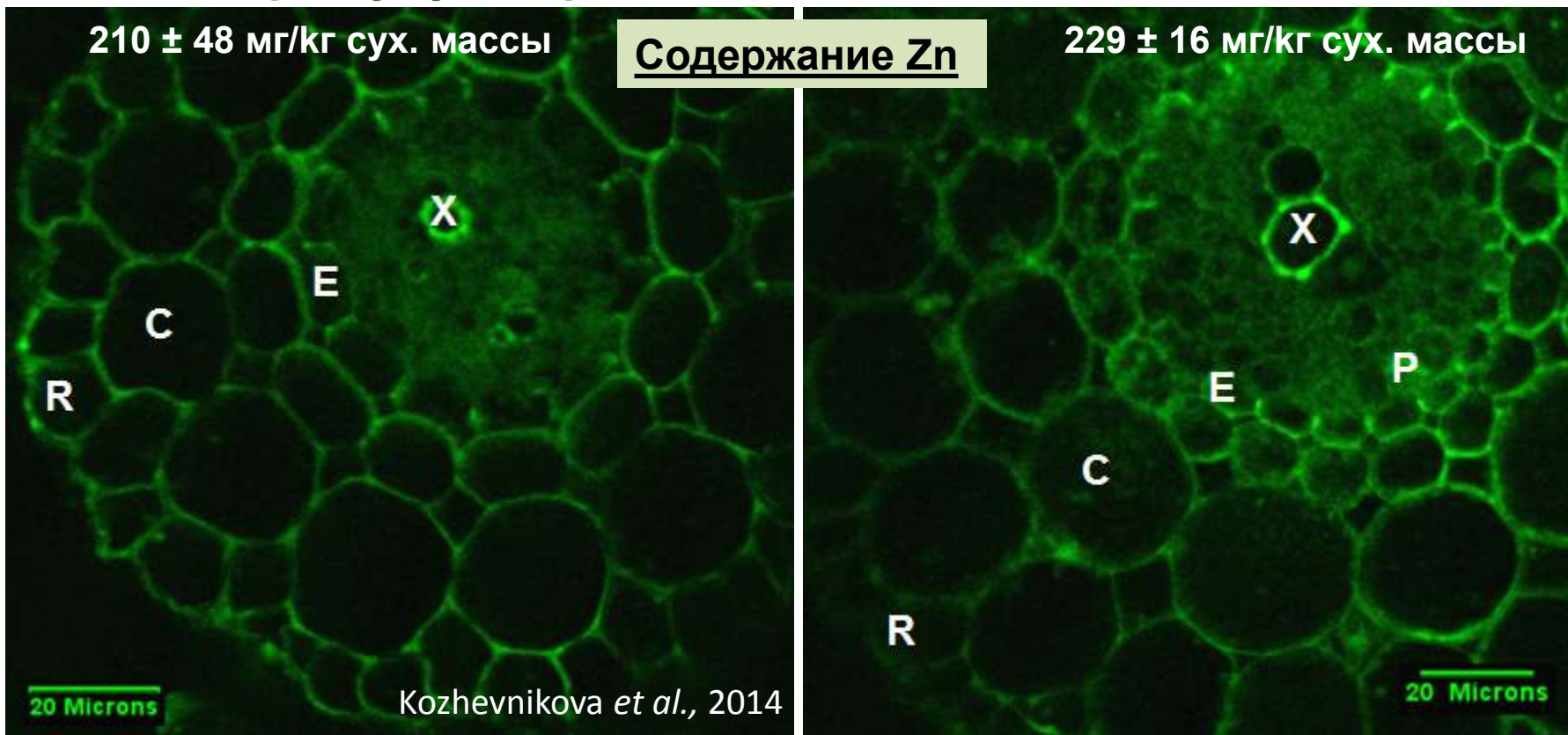
Kozhevnikova A.D., Seregin I.V., Erlikh N.T., Shevyreva T.A., Andreev I.M., Verweij R., Schat H. Histidine-mediated xylem loading of zinc is a species-wide character in *Nocca caerulescens*. *New Phytologist*, 2014, vol. 203, pp. 508-519.

*** - достоверно отличаются от ZnSO₄ при P < 0.001

Распределение **Zn** по тканям корня

Nocca caerulea,
гипераккумулятор

Thlaspi arvense,
исключатель



С – кора, **Е** – эндодерма, **Р** – перицикл, **R** – ризодерма, **Х** – ксилема

Содержание Zn в вакуолях клеток [Lasat et al., 1998]

Низкое

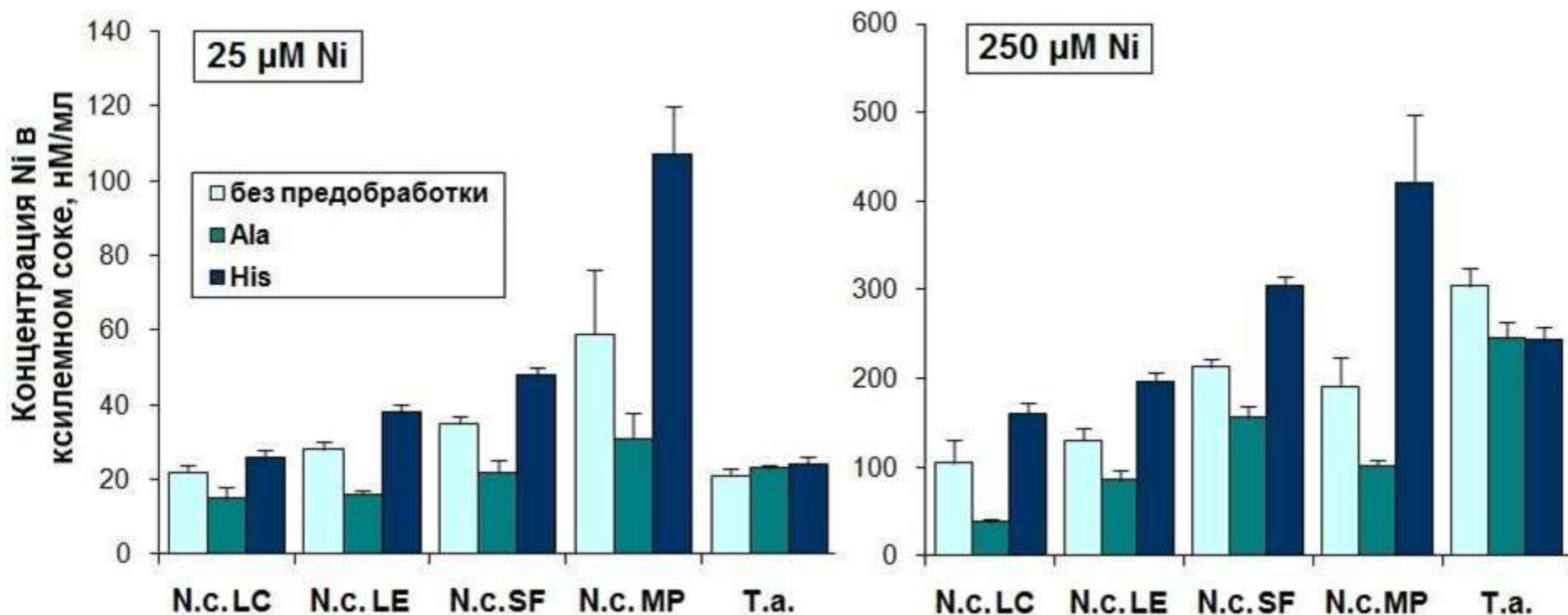
Высокое (в 2.4 раза выше)

Скорость транспорта Zn из вакуолей клеток [Lasat et al., 1998]

Высокая (в 2 раза выше)

Низкая

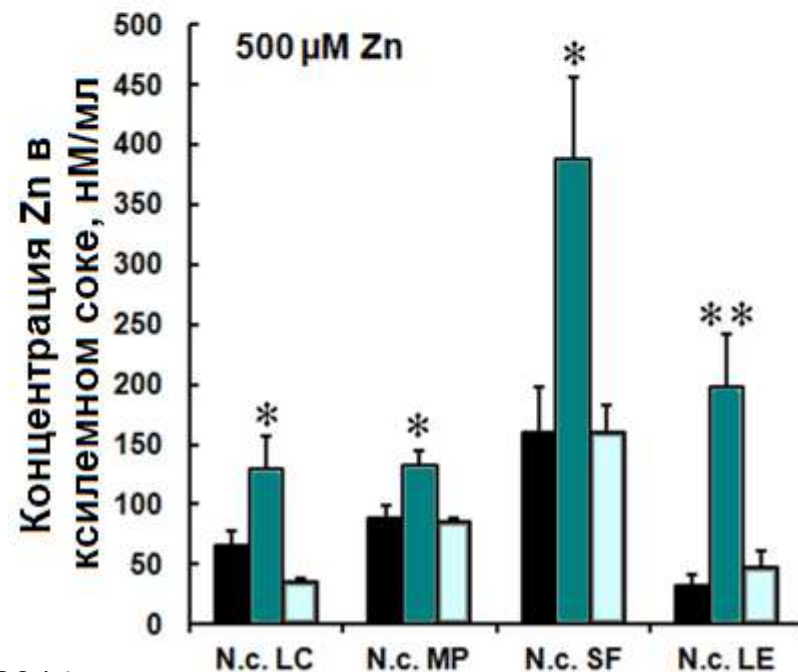
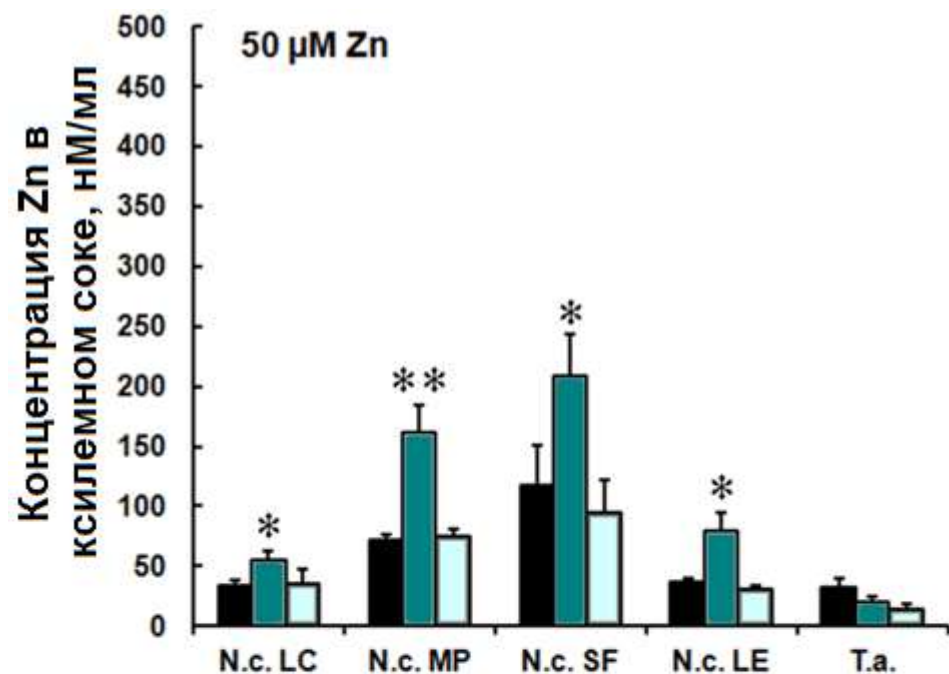
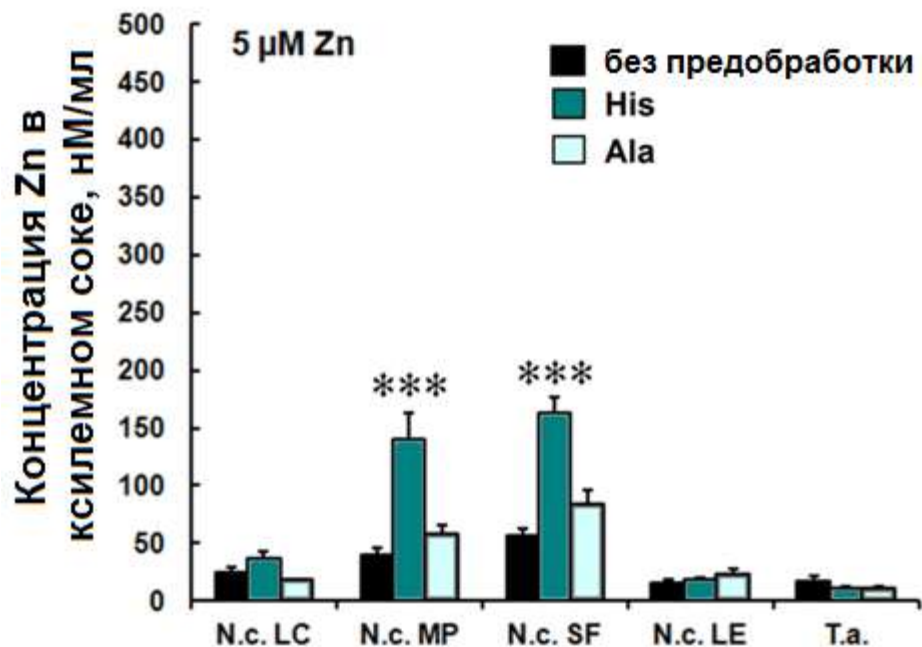
Влияние предобработки гистидином на концентрацию Ni в ксилемном соке *Nocca caerulea* (N.c., 4 экотипа) и *Thlaspi arvense* (T.a.)



Richau *et al.*, 2009

Вид растения	Содержание Ni в ксилемном соке после предобработки гистидином	Источник
<i>Alyssum montanum</i>	Увеличивается	Kramer <i>et al.</i> , 1996
<i>Brassica juncea</i>	Увеличивается	Kerkeb, Kramer, 2003
<i>Thlaspi arvense</i>	Не изменяется	Richau <i>et al.</i> , 2009

Влияние предобработки гистидином на концентрацию Zn в ксилемном соке *Nocca caerulea* (N.c., 4 экотипа) и *Thlaspi arvense* (T.a.)



Экотипы гипераккумулятора *N. caerulea*:

LC – La Calamine и **SF** – Saint Félix de Pallières

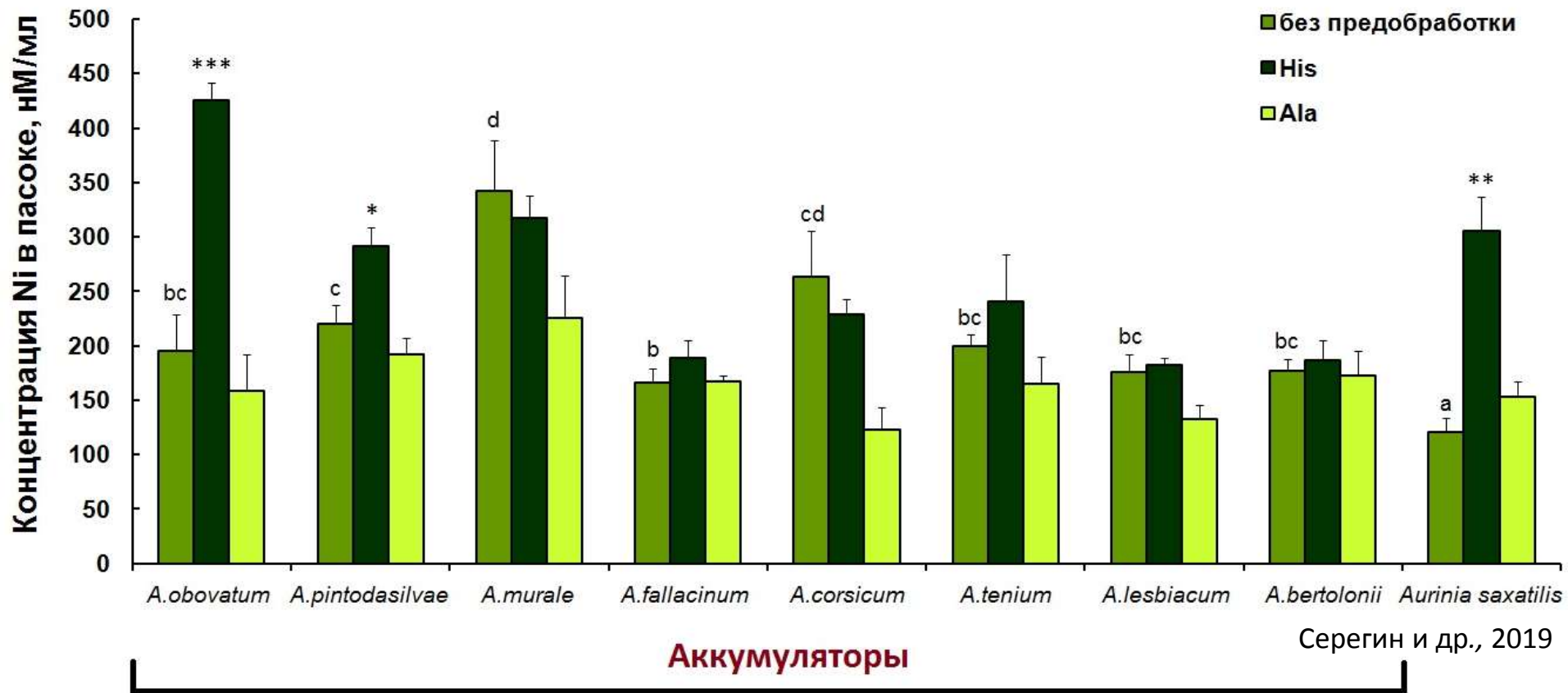
с каламиновых почв, богатых Zn, Cd, Pb;

LE – Lellingen с неметаллоносных почв;

MP – Monte Prinzera с почв, богатых Ni

*/**/*** - достоверно отличаются от контроля без предобработки при $P < 0.05$, $P < 0.01$ и $P < 0.001$, соответственно

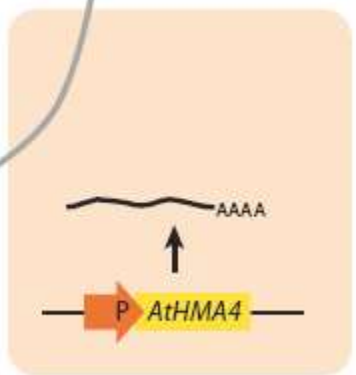
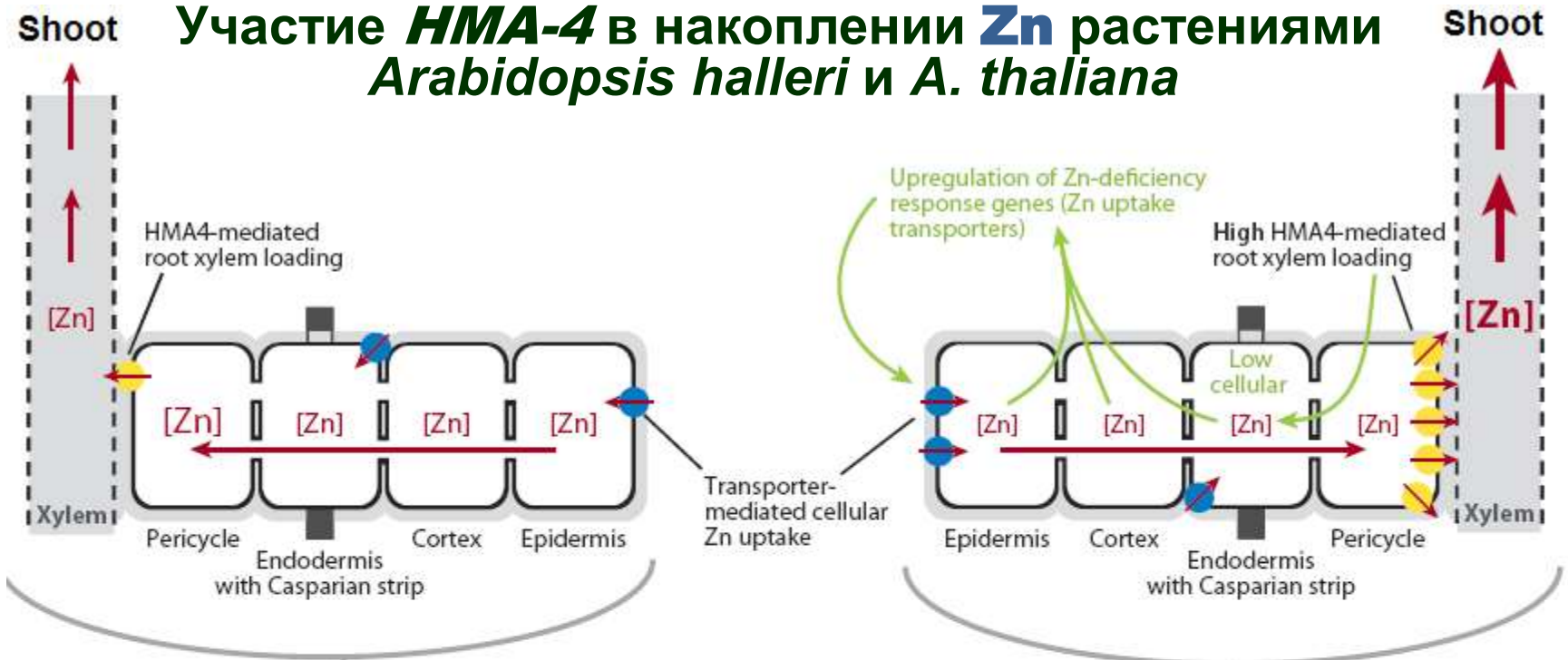
Влияние предобработки гистидином на концентрацию Ni в ксилемном соке гипераккумуляторов рода *Alyssum* и исключателя *Aurinia saxatilis* (ранее *Alyssum saxatile*)



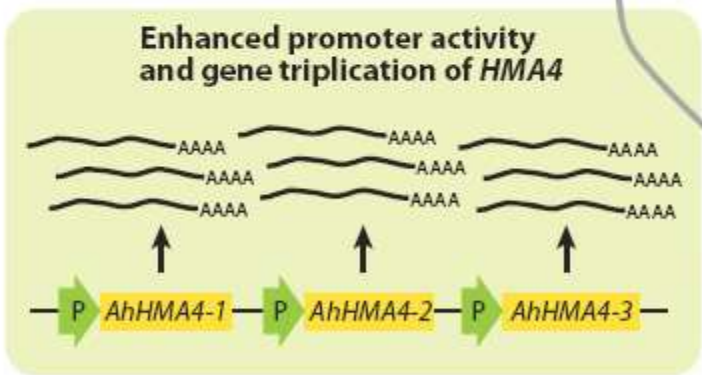
*/**/*** - достоверно отличаются от контроля без предобработки при $P < 0.05$, $P < 0.01$ и $P < 0.001$, соответственно
Буквами показана достоверность отличий в концентрации Ni в ксилемном соке растений без предобработки

Вклад гистидина в избирательное накопление Ni в побегах может существенно различаться даже у близкородственных видов, принадлежащих к одному роду, что может быть связано с различным эндогенным уровнем гистидина в корнях

Участие *HMA4* в накоплении **Zn** растениями *Arabidopsis halleri* и *A. thaliana*



Arabidopsis thaliana
Non-accumulator

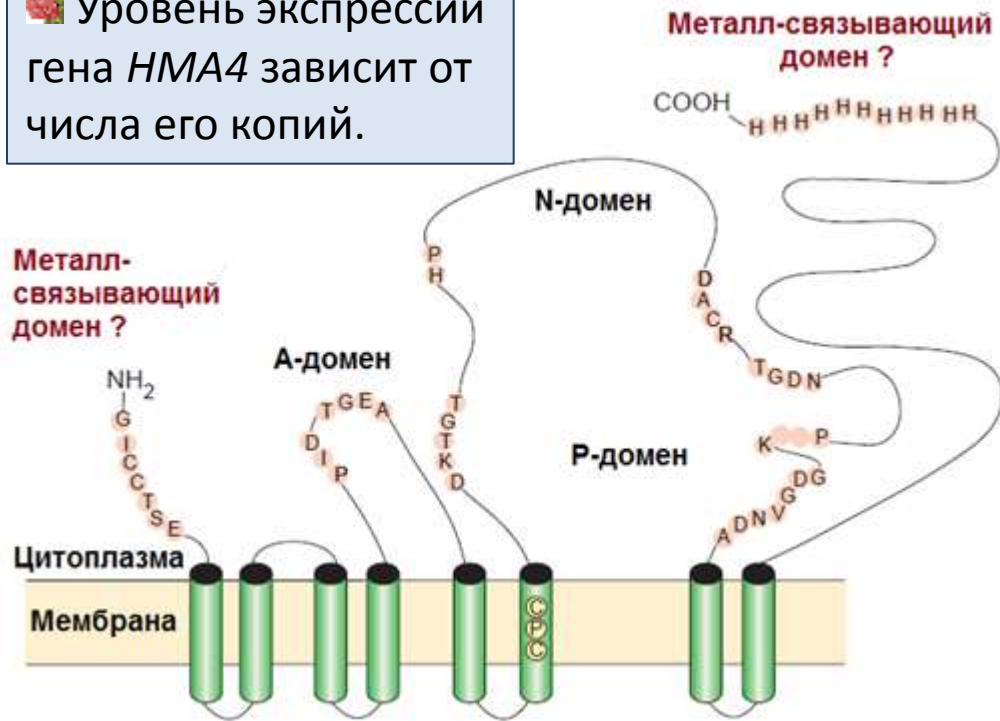


Arabidopsis halleri
Hyperaccumulator

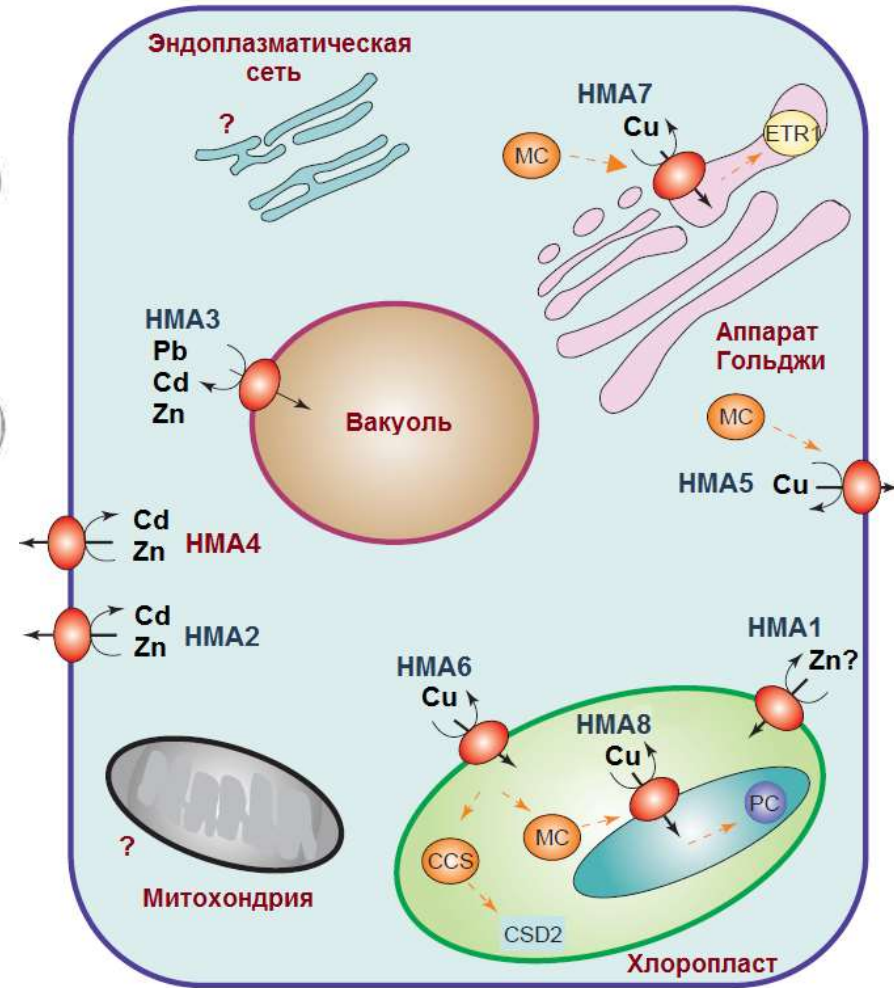
~ 5 million years ago:
Common *Arabidopsis* ancestor

АТФаза P_{1B}-типа HMA4 участвует в загрузке Zn и Cd в ксилему

Уровень экспрессии гена *HMA4* зависит от числа его копий.



Williams, Mills, 2005



Экотип	Число копий гена
<i>Noccaea caerulescens</i>	<i>NcHMA4</i>
St Laurent le Minier	4
Saint Félix de Pallières	4
Prayon	3
Puente Basadre	2

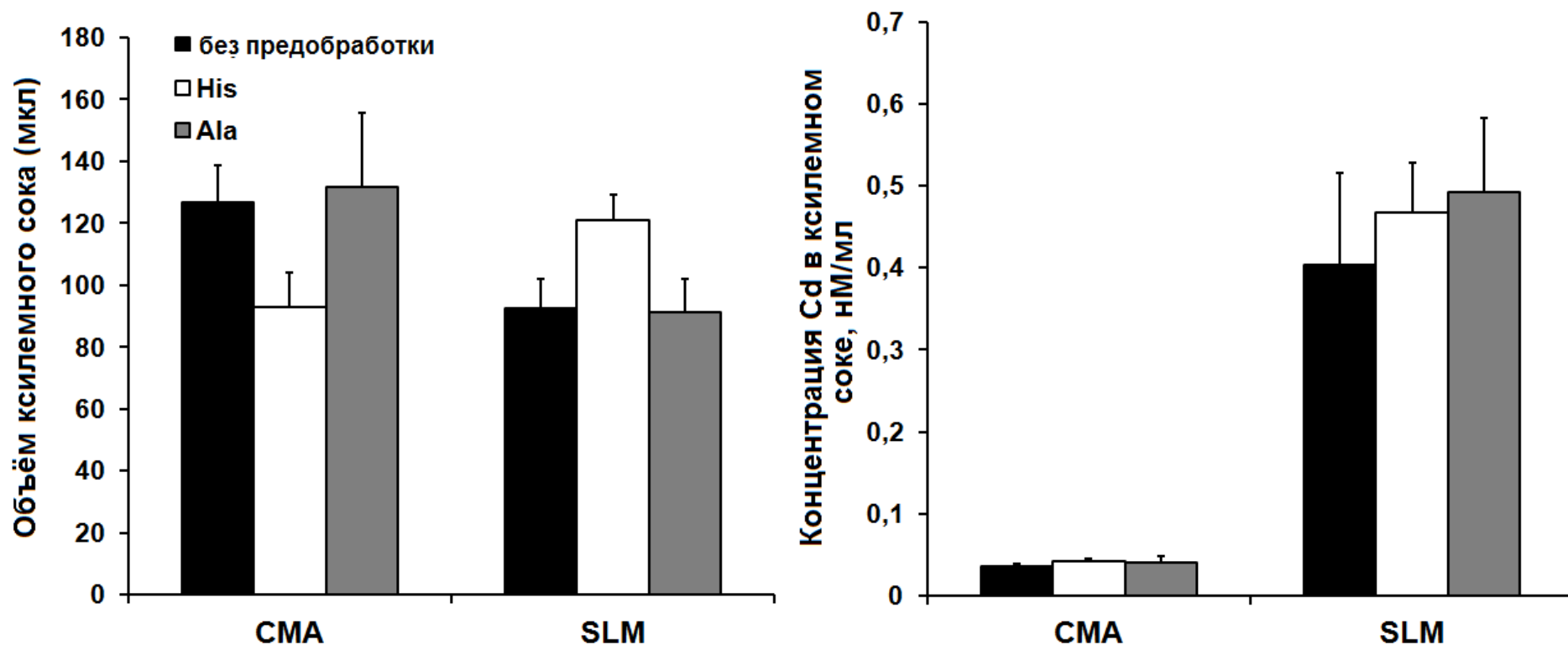
Craciun et al., 2012

При сходном уровне экспрессии гена *HMA4* способность к накоплению Zn и Cd экотипами *N. caerulescens* может различаться. Высокий уровень экспрессии гена *HMA4* не является единственной причиной гипераккумуляции.

Histidine promotes the loading of nickel and zinc, but not of cadmium, into the xylem in *Nocca caerulea*

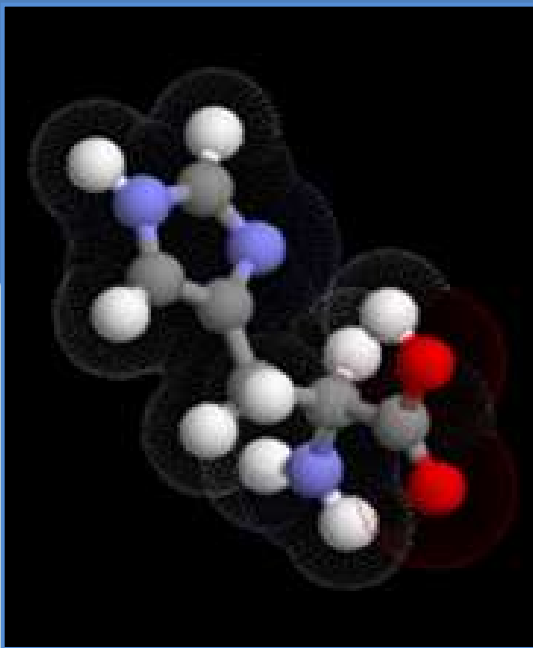
Kozhevnikova *et al.*, 2014b

Влияние предобработки гистидином на концентрацию Cd в ксилемном соке *Nocca caerulea*






Экотипы *N. caerulea*: **CMA** – Col du Mas de l'Aire и **SLM** – Saint Laurent le Minier

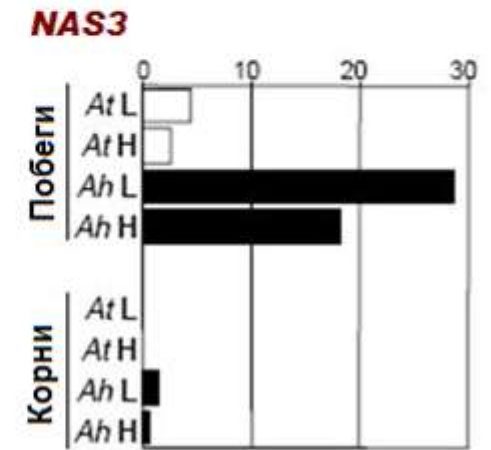
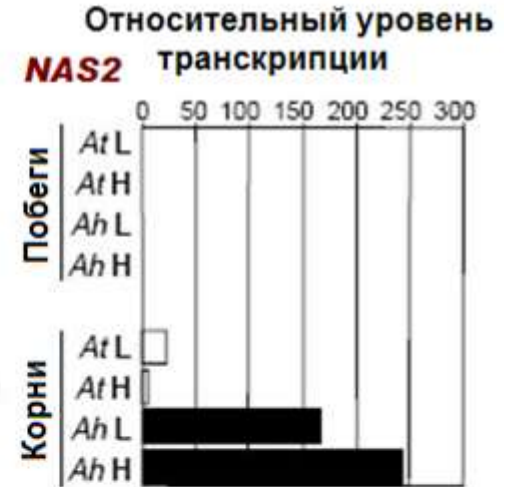
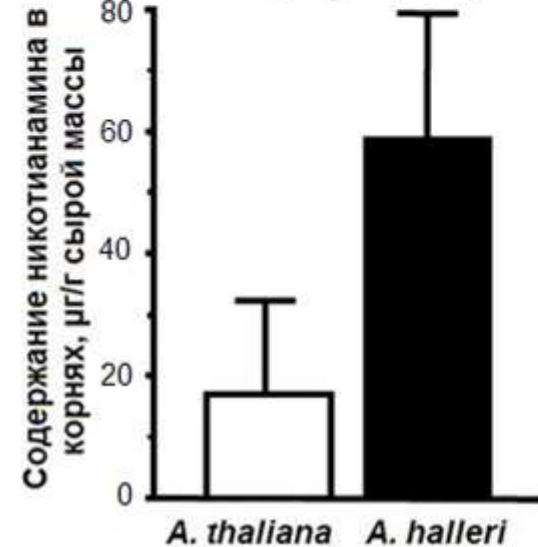
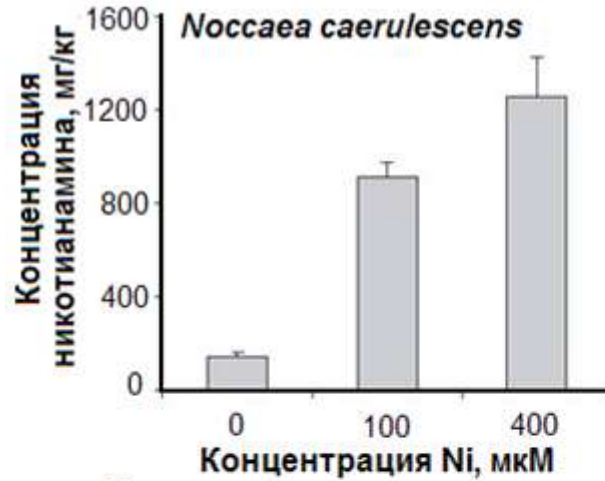
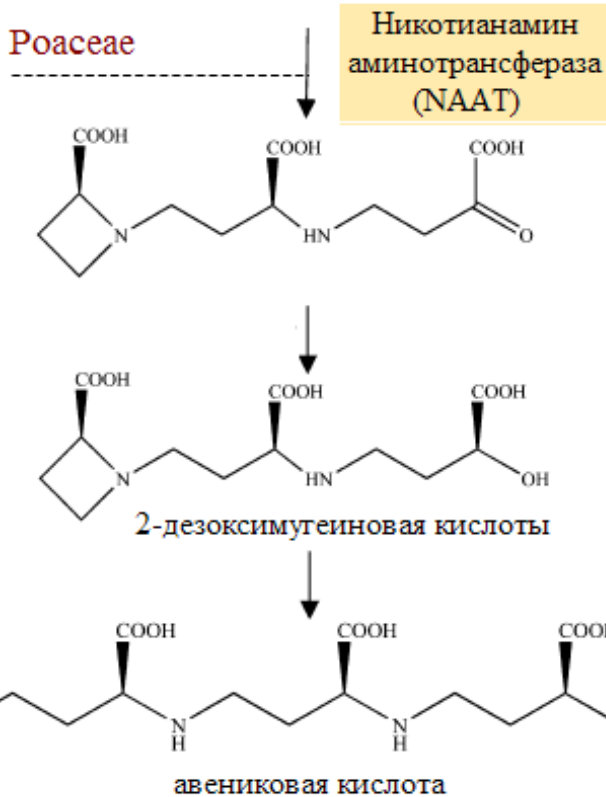
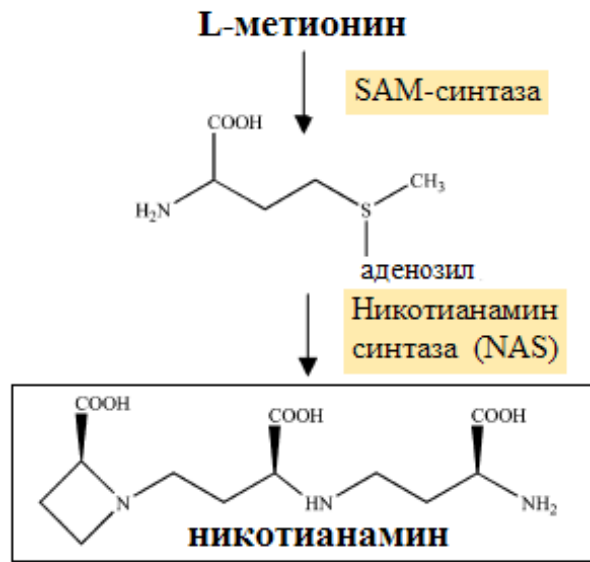
Предобработка гистидином не приводила к увеличению содержания Cd в ксилемном соке исключателя *T. arvensis* и гипераккумулятора *N. caerulea*, что является отражением низкого сродства гистидина к ионам Cd



Другие низкомолекулярные хелаторы, участвующие в транспорте металлов

-  Никотианамин
-  Мугеиновая кислота
-  Органические кислоты

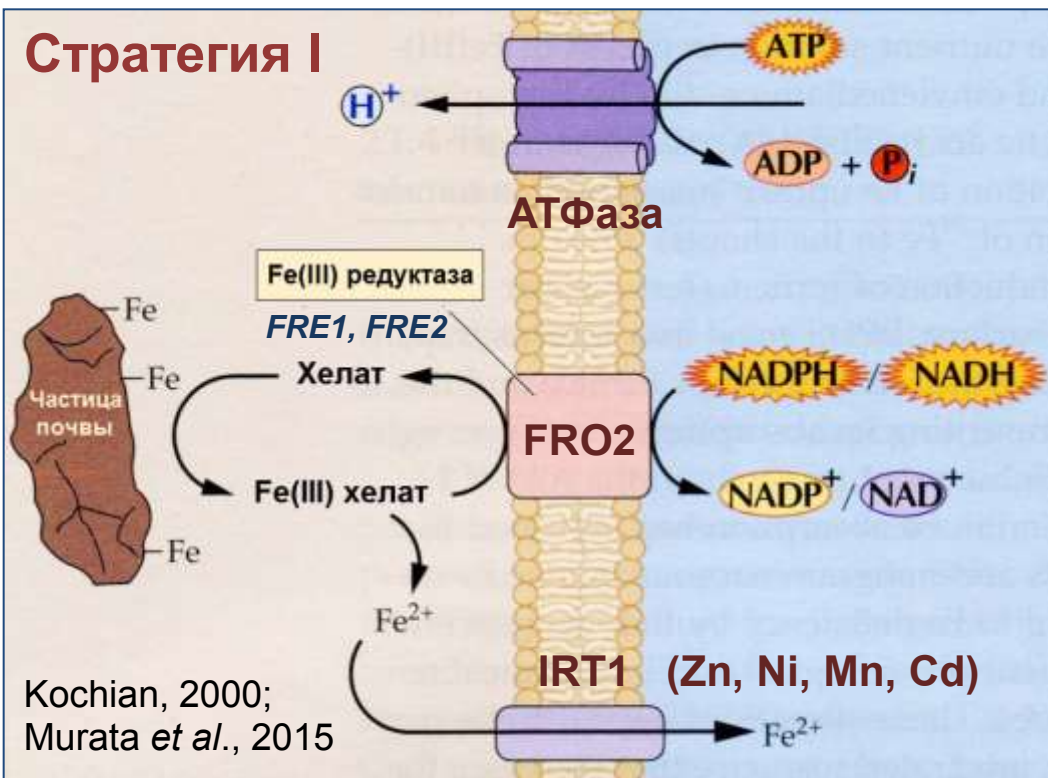
Роль никотианамина в передвижении и накоплении тяжелых металлов



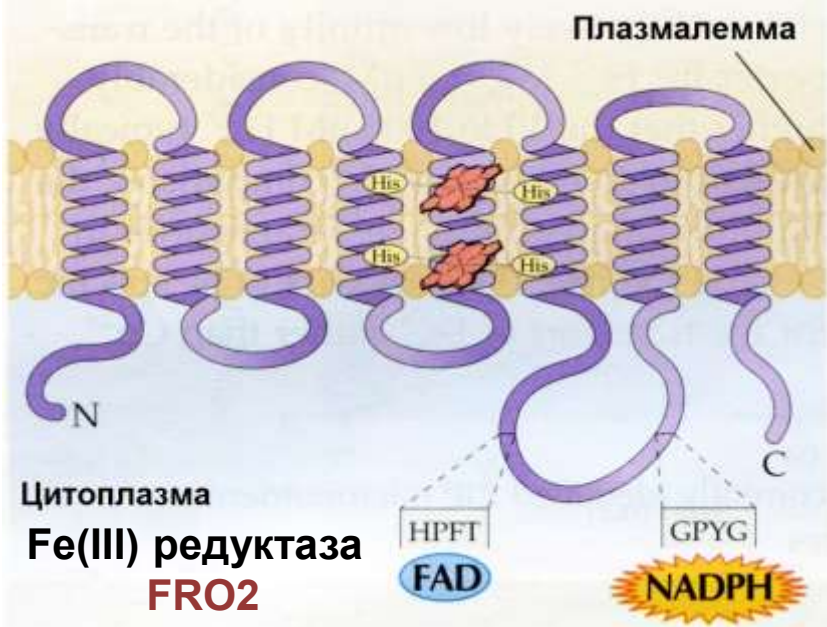
Callahan et al., 2007

↓ Zn, Cu, Fe	↑ NAS	Wintz et al., 2003;
↑ Ni	↓ YSL3, 7 корни	Gendre et al., 2006
↑ Ni	YSL3, 7 побеги	Gendre et al., 2006

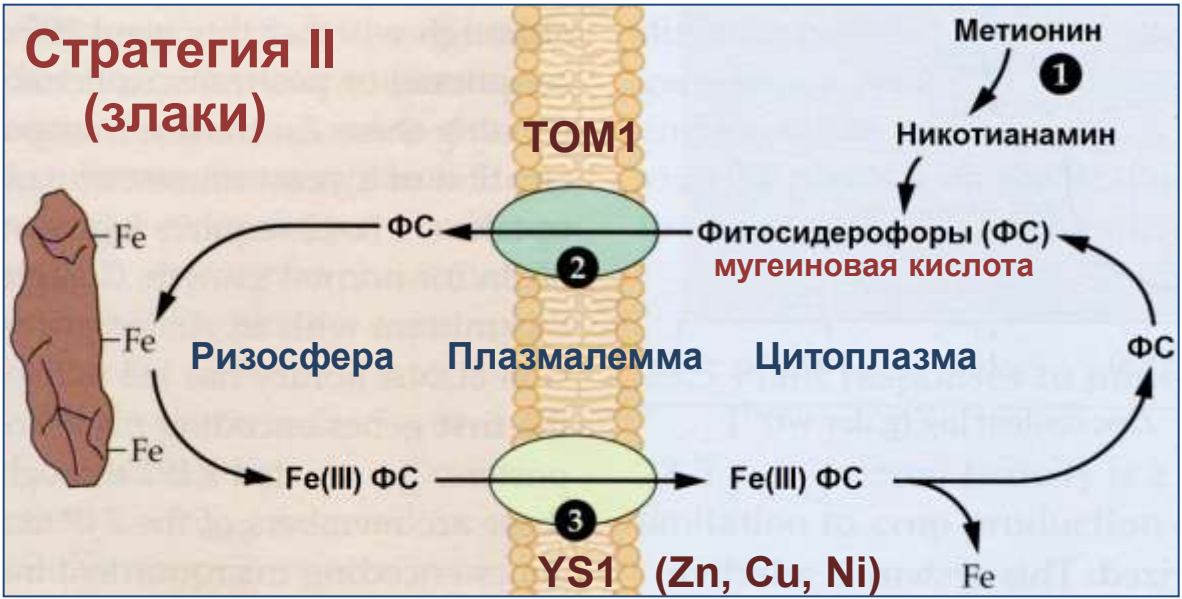
Стратегия I



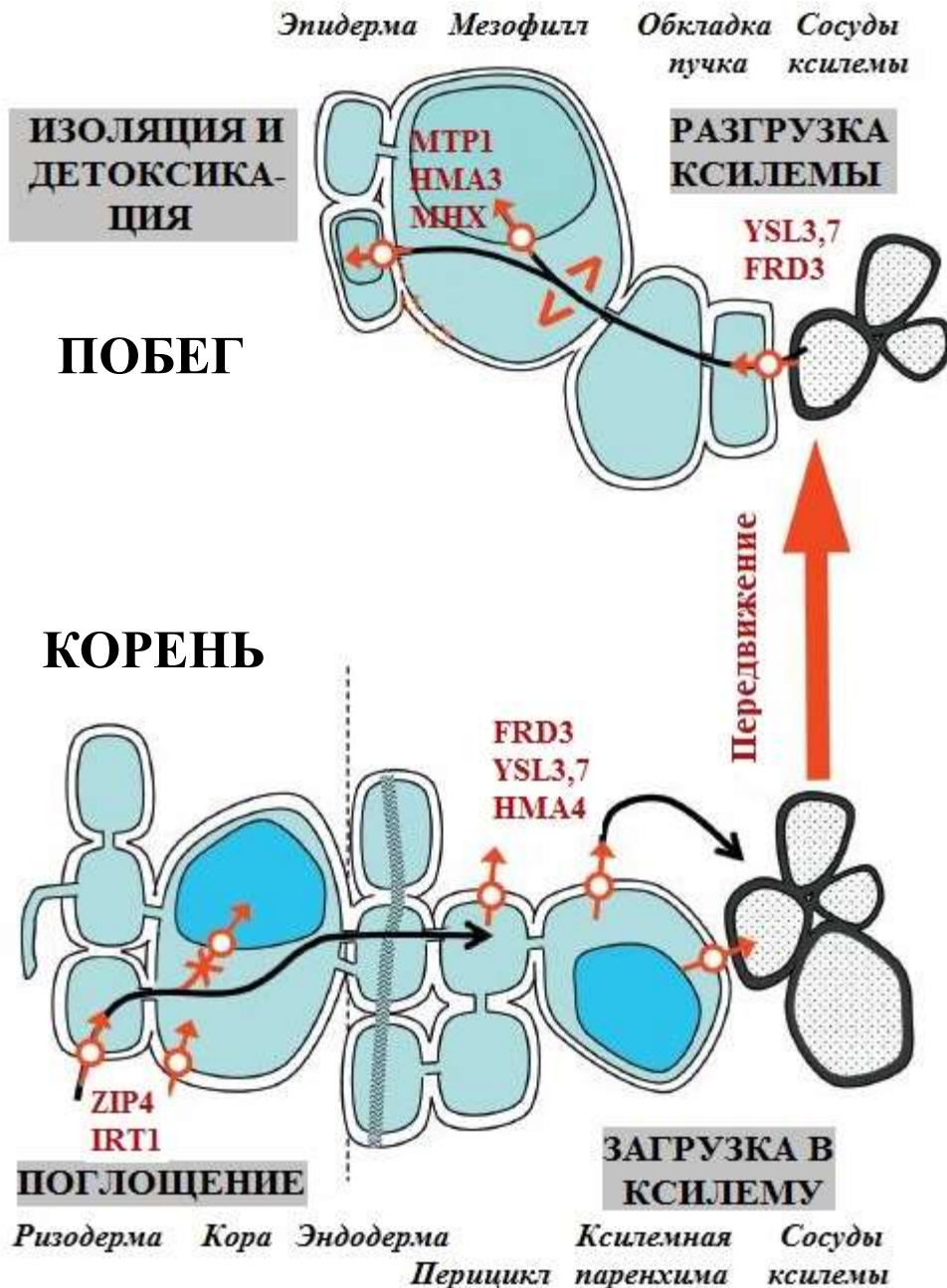
Две стратегии транспорта железа



Стратегия II (злаки)

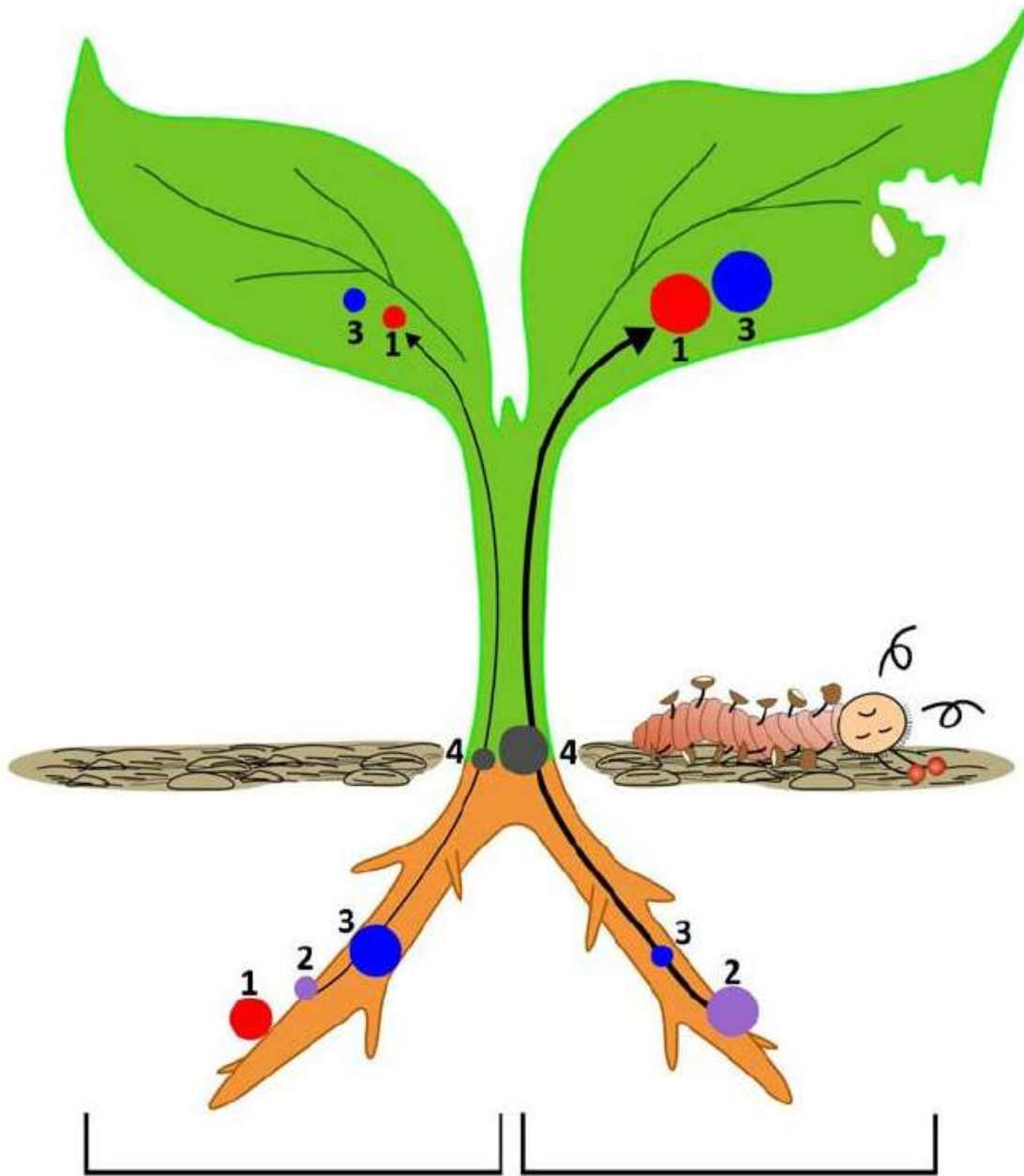


Тканевая локализация транспортеров Zn



- ZIP4, IRT1** – участвуют в поглощении
- HMA4** – определяет загрузку металлов в ксилему
- FRD3** – участвует в транспорте цитрата в проводящие ткани (цитрат необходим для транспорта Fe и Zn)
- YSL** – участвует в загрузке и разгрузке комплексов никотианамина с металлами
- MTP** – участвует в транспорте металлов из цитоплазмы в органеллы
- MNX** – Zn^{2+}/H^{+} антипортер

Уровень экспрессии этих генов у гипераккумуляторов выше, чем у исключателей



Гипотеза «защиты»

Повышенный уровень содержания металлов в тканях (главным образом покровных) предотвращает проникновение и развитие в растении патогенных микроорганизмов и поедание растения животными.

- 1 – Накопление в клеточных оболочках; выделение в корневую слизь
- 2 – эффективность механизмов поглощения металла
- 3 – связывание и изоляция в вакуолях
- 4 – передвижение из корней в побеги

ИСКЛЮЧАТЕЛЬ

ГИПЕРАККУМУЛЯТОР



Благодарю
за внимание!