

Обмен ионов тяжелых металлов в микоризном корневом окончании системы «*Picea abies* – эктомикоризные грибы»

П.Ю. Колмаков, Д.Д. Жерносеков

В микоризных корневых окончаниях системы «*Picea abies* – эктомикоризные грибы» поступление тяжелых металлов претерпевает изменения, которые связаны с особенностями проникновения грибного компонента в осевой цилиндр и радиального транспорта сахаров к периферии, к мантии грибного компонента. Выяснено, что основной путь поступления ионов металлов в стель осуществляется по симпласту неметаболическим путем. Формирование анатомо-морфологического комплекса «*Picea abies* – эктомикоризные грибы» под действием молекулярно-генетических механизмов регуляции гомеостаза способствует распространению ели обыкновенной на гораздо большей территории, чем можно было бы ожидать на самом деле.

Ключевые слова: *Picea abies*, эктомикоризные грибы, трансцеллюлярный, апопластный, симпластный транспорт, анатомо-морфологический комплекс.

In the mycorrhizal root tip of the «*Picea abies* – ectomycorrhizal fungi» system the intake of heavy metals undergoes changes that are associated with the peculiarities of the penetration of the fungal component into the axial cylinder and the radial transport of sugars to the periphery, to the mantle of the fungal component. It was found out that the main route of metal ions entering the stele is carried out through the symplast in a non-metabolic way. The formation of the «*Picea abies* – ectomycorrhizal fungi» anatomical and morphological complex under the influence of molecular genetic mechanisms of homeostasis regulation leads to the spread of *Picea abies* over a much larger area than one would actually expect.

Keywords: *Picea abies*, ectomycorrhizal fungi, transcellular, apoplastic, symplastic transport, anatomical and morphological complex.

Введение. Соединения тяжелых металлов относятся к наиболее опасным распространенным веществам, загрязняющим биосферу [1]. Настоящее время требует изучения биологического значения металлов в физиологических и биохимических процессах в растительных организмах как живых конгломератах.

Для прогнозирования роли тяжелых металлов в обменных процессах необходимо рассматривать их формы в почвенных горизонтах, подвижность, способность преодоления биологических барьеров, значимость геохимических процессов. Для таких исследований лучше всего использовать «модельные системы» с объектами, обладающими определенным набором биологических характеристик, для объяснения протекающих физиологических явлений. Такой модельной системой в наших исследованиях является система «*Picea abies* – эктомикоризные грибы – тяжелые металлы».

Свинец – распространенный в природе тяжелый металл с широким диапазоном содержания в почвах [2]. Слабая подвижность и накопление этого металла в почвенном профиле коррелирует со значениями pH в почвенных горизонтах [3]. Наиболее распространенной в природе является двухвалентная форма [4]. Значение pH является одним из основных условий, определяющих состав и форму свинца [5]. Так, например, при pH 3 концентрация свободного иона Pb^{2+} составляет около 70 % [6]. Поглощение свинца осуществляется по нескольким механизмам в зависимости от pH среды и концентрации элемента [7].

Picea abies – одна из основных лесообразующих древесных пород на территории Беларуси с зональными чертами в своем распространении, имеющая большое значение в садоводстве, озеленении и строительной отрасли [8]. В различные геологические эпохи ареал ели европейской претерпевал значительные изменения вплоть до своей дезъюнкции и образования генетически разнородных форм и подвидов. Вероятно, в период горообразования и иссушения климата возникли виды и формы голосеменных, обладающие механизмами гомеостаза, которые позволили им просуществовать до наших дней.

Материал и методы исследования. Целью нашей работы являлось изучение особенностей обмена тяжелых металлов и роли соединений свинца в формировании и развитии консортивных связей в модельной системе «*Picea abies* – эктомикоризные грибы» в подзоне дубово-темнохвойных подтаежных лесов. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи: на основе предложенной модели выявить основные пути проникновения ионов тяжелых металлов в анатомические структуры микоризного корневого окончания; на примере ионов свинца определить возможные механизмы влияния соединений тяжелых металлов на формирование и функционирование консортивных связей в природе.

Объекты исследований. Модельный комплекс (ассоциация, конгломерат): агариикоидные базидиомицеты из эколого-трофической группы «микоризообразователи» (микобионт, грибной компонент), *Picea abies* (фитобионт, растительный компонент) и тяжелые металлы.

Анализы образцов почвенных горизонтов выполнены по стандартным методикам в химико-экологической лаборатории учреждения образования «Белорусская государственная орденов Октябрьской Революции и Трудового Красного Знамени сельскохозяйственная академия» [9]. Характеристика пробных площадей и измерение биомассы тонких корней представлены в более ранних научных работах [10].

Результаты исследований. Образование хелатных комплексов и трансмембранный потенциал. Из растительного компонента в ризосферу попадают соединения (органические кислоты, аминокислоты, фенолы, пептиды, ферменты (редуктазы), которые связывают ионы тяжелых металлов и осаждают их на поверхности корневых окончаний [11]. На поверхностях мембран происходит хелатирование Pb^{2+} с лигандами. Образующиеся хелатные комплексы могут быть различными в зависимости от соотношения заряда лиганда (белковых молекул) и иона металла. Таким образом, происходит регуляция электростатического напряжения и последующего открытия или закрытия ионных каналов, образованных трансмембранными белковыми молекулами.

В пользу формирования на поверхности микоризных корневых окончаний хелатных комплексов различных групп свидетельствуют следующие факты: высокая устойчивость комплексов к различной кислотности среды; в свободном состоянии металлам не свойственна биологическая активность; меньшая токсичность по сравнению с другими формами соединений; хорошая биодоступность как для растительного, так и для грибного компонентов.

В кислой почвенной среде образование соединений с ионами металлов на поверхности корневых окончаний становится наиболее вероятным событием. Таким образом, увеличивается электростатическое напряжение на мембране, стимулируется ионный обмен (активный транспорт) и происходит формирование различных типов связи через кислород, углерод в присутствии органического вещества с образованием комплексов с фенольными радикалами в области суберинизации в корневом окончании.

Результаты химического анализа почвенных горизонтов из пробных площадей приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты химического анализа почвенных горизонтов

Пробная площадка	Почв. гориз.	Результаты химических анализов							
		pH	органич. в-во %	медь мг/кг	цинк мг/кг	железо мг/кг	марганец мг/кг	кадмий мг/кг	свинец мг/кг
фоновая ПП1	Ad	4,01	81,53	4,4822	62,8086	176,0690	7230,460	0,2149	10,7807
фоновая ПП1	A1	7,09	5,12	10,0219	25,2167	12036,61	2754,091	0,0777	11,8242
фоновая ПП1	A2B	3,47	4,59	0,7761	1,4278	11406,66	17,1649	–	6,9349
импактн. ПП2	A1	3,50	33,73	1,8829	11,1475	5285,907	1879,991	–	12,2706
импактн. ПП2	A2B	6,74	8,14	15,2814	39,1961	11096,40	3189,522	0,0664	14,5419

В почвенных горизонтах с наибольшей средней биомассой тонких корней pH стремится к стабильному значению 3 и к содержанию ионов свинца, примерно, 11 мг/кг. Из таблицы 1 видно, что подобной закономерности с ионами других тяжелых металлов не наблюдается. Данный факт предполагает наличие молекулярного механизма обмена ионов свинца в модельной системе «*Picea abies* – эктомикоризные грибы».

Метаболический (активный) транспорт тяжелых металлов. В метаболическом транспорте ионов металлов через мембраны в клетках растений принимают участие большое количество специфических белков-переносчиков, относящихся к различным семействам. Наиболее изученные семейства: ZIP (zinc-iron-regulated transporter), ABC (ATP-binding cassette), OPT (oligopeptide transporters), P1B-АТФ-азы, CDF (cation diffusion facilitator); NRAMP (natural resistance associated macrophage protein); CTR (copper transporter family) и CAХ (cation exchanger) [12].

На мембранах с нейтральными и кислыми фосфатазами, в коре микоризного корневого окончания, возникает АТФ-азная активность, которая инициируется экспрессией генов микоризинов при микоризации [13]. Под действием катионов металлов АТФ-азы меняют конформацию своих активных центров, что сопровождается гидролизом АТФ. В этом процессе важную роль играют кислые фосфатазы (активны при рН ниже 7), а высвободившийся фосфат-ион фиксируется при помощи аденилаткиназы на субстрате (белке-переносчике) мембранного комплекса пелотона [14]. В результате высвобождается энергия, которая затрачивается на транспорт ионов тяжелых металлов.

Фосфатная группа молекулы АТФ имеет хорошее сродство к ионам металла и обладает хелатирующими способностями, в то время как пуриновому азотистому основанию присущи амфотерные свойства. Разность потенциалов, скорее всего, создается при помощи потенциал-чувствительных каналов с пуриновыми рецепторами (АТФ-активируемые). Хелатирующая фосфатная группа обладает высоким сродством к ионам двухвалентных металлов, что влияет на взаимодействие АТФ с белками-переносчиками и на сродство с доменом аденилаткиназы.

Сама АТФ-азная активность связана с работой белков-переносчиков как трансмембранных транспортеров через катионные каналы (АТФ-активируемые), из семейства P_{1B} – АТФ-аз подсемейства НМА (*heavy metal ATPase*) [15]. Консервативный мотив гена AtНМА4 (подкласс Zn/Co/Cd/Pb НМА) контролирует механизм для поддержания постоянной концентрации ионов металлов в физиологических пределах в растительном компоненте. Работа фермента АТФ-азы подсемейства НМА (*heavy metal ATPase*) способствует поддержанию гомеостаза в растительном компоненте и кодируется мотивом AtНМА4 (подкласс Zn/Co/Cd/Pb НМА), максимальная экспрессия которого наблюдается в корневых окончаниях [16].

Активация мотива AtНМА4 (подкласс Zn/Co/Cd/Pb НМА) стимулируется повышенным уровнем концентрации Zn²⁺ и Mn²⁺ [16]. В пользу данного утверждения свидетельствуют результаты анализов почвенных профилей в таблице 1 в позициях с наибольшим содержанием органических веществ (т.е. микоризных корневых окончаний).

Метаболический активный транспорт влияет на степень суберинизации первичной коры микоризных корневых окончаний. Экспрессия мотива AtНМА4 осуществляется под действием возрастающей концентрации Zn²⁺ и Mn²⁺ на внутренней стороне мембран. На фоне этого процесса происходит образование субериновых пластинок между плазматической мембраной и первичной клеточной стенкой. Это не влияет на апопластный транспорт, который блокируется лигнифицированными поясками Каспари в эндодерме [17]. Механизм поддержания постоянной концентрации ионов металлов в физиологических пределах в растительном компоненте контролирует суберинизацию первичной коры на константном уровне.

Нарушение активного трансцеллюлярного транспорта ведет к изменению степени суберинизации первичной коры микоризного корневого окончания при возникновении дефицита Zn²⁺ и Mn²⁺.

Возможный механизм поддержания обмена суберина на определенном уровне представлен на рисунке 1.

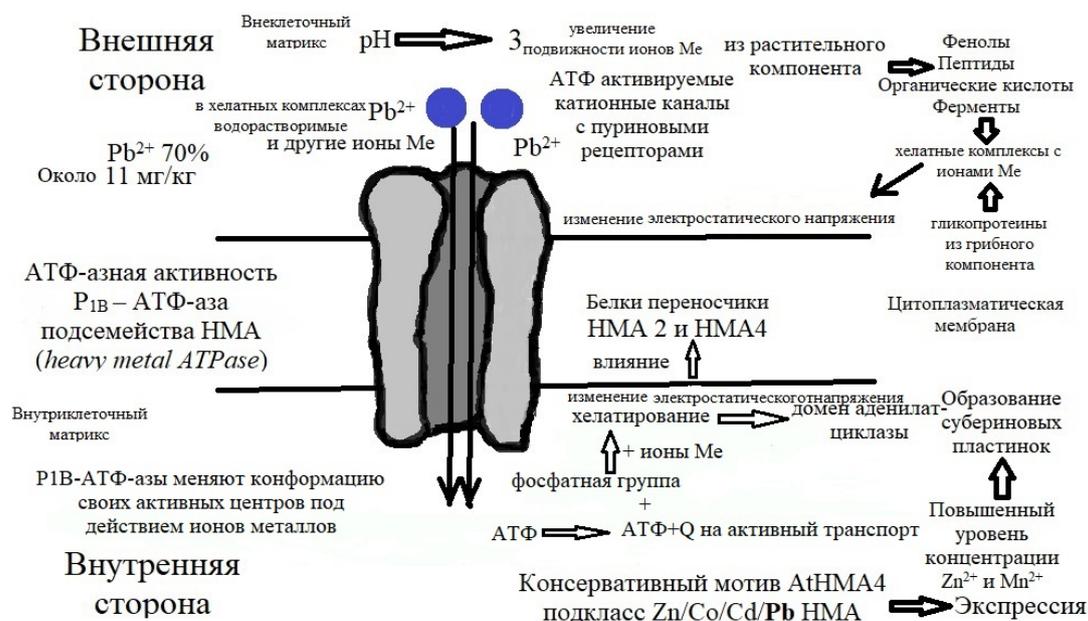


Рисунок 1 – Метаболический (активный) транспорт тяжелых металлов в микоризных корневых окончаниях

Неметаболический (пассивный) транспорт тяжелых металлов. В микоризных корневых окончаниях поступление соединений тяжелых металлов претерпевает изменения, которые связаны с особенностями проникновения грибного компонента в осевой цилиндр и радиального транспорта сахаров к периферии, к мантии (чехлу) грибного компонента. Радиальный реверсный поток углеводов из осевого цилиндра к периферии грибного компонента делает классический апопластный транспорт в стель невозможным в микоризном корневом окончании.

Радиальный транспорт сахаров из осевого цилиндра микоризного корневого окончания к периферии, к мантии, выделение сахаров и гликопротеина гифами в ризосферу усиливает эффект внешнего хелатирования тяжелых металлов, обеспечивая механизм металлоустойчивости. Результатом описанных процессов является структурное разнообразие органоминеральных чехлов на поверхности корневых окончаний [18].

Включение механизма суберинизации клеток первичной коры микоризного корневого окончания происходит под действием N-ацетилглюкозамина (мономера хитина грибного компонента) и накопления Zn^{2+} и Mn^{2+} внутри мембранного комплекса пелотонов. Симпластный путь проникновения ионов металлов в стель в ксилемный ток становится всё еще доступным даже при формировании в эндодерме лигнифицированных поясков Каспари [17], наряду с реверсом сахаров по апопластному пути. Проникновение ионов тяжелых металлов в условиях увеличивающейся суберинизации в стель возможно только симпластным путем.

В связанном трансцеллюлярном транспорте тяжелых металлов через плазмалемму клеток участвуют белки переносчики HMA 2 и HMA4 [19], [20]. Метаболический транспорт зависит от заложения субериновых пластинок в виде вторичных клеточных стенок вокруг энтодермальных клеток, образуя диффузионный барьер [21]. Нужно отметить, что специфических транспортеров тяжелых металлов для растительного компонента не выявлено [12].

На рисунках 2 и 3 показаны функциональные мессенджеры консортивных взаимоотношений (пелотоны в фоновой и импактной зонах). Виды радиального транспорта в микоризных корневых окончаниях ели обыкновенной представлены на рисунках 4 и 5.

Реверсный апопластный транспорт сахаров из осевого цилиндра растительного компонента грибным компонентом не только влияет на степень суберинизации клеток коры, но и способствует накоплению гликопротеинов в грибных чехлах, формируя их структурное морфологическое разнообразие. Выделяемый грибным компонентом гликопротеин связывает частички почвенного грунта и гифы в единое целое – чехлы микоризных корневых окончаний.

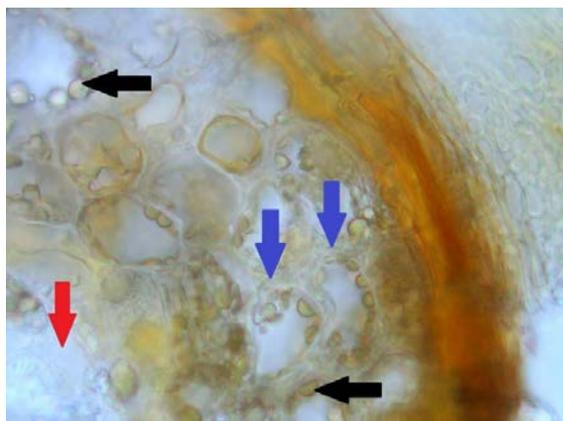


Рисунок 2 – Поперечный срез микоризного корневого окончания *Picea abies* (L.) Karst. Образец № 20-29-06-2016 /Simple 1/ фоновая зона
Примечание: черная стрелка – функциональный мессенджер пелотон; красная стрелка – пропускная клетка в эндодерме; синяя стрелка – апопластный реверс сахаров к мантии.

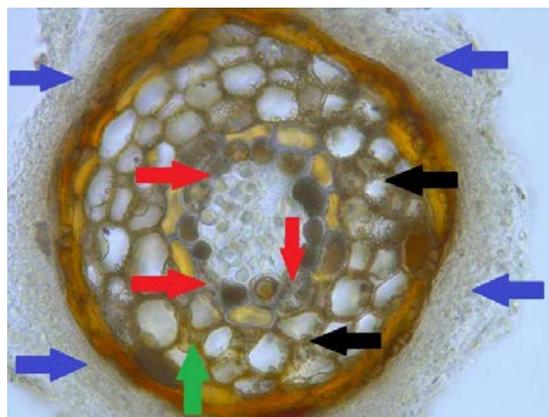


Рисунок 3 – Поперечный срез микоризного корневого окончания *Picea abies* (L.) Karst. Образец № 41-01-09-2016 /Simple 3/ импактная зона
Примечание: черная стрелка – скопление функциональных мессенджеров; красная стрелка – пропускная клетка в эндодерме; синяя стрелка – процесс формирования многослойной мантии под действием апопластного реверса; зеленая стрелка – формирование тотальной суберинизации под действием N-ацетилглюкозамина.

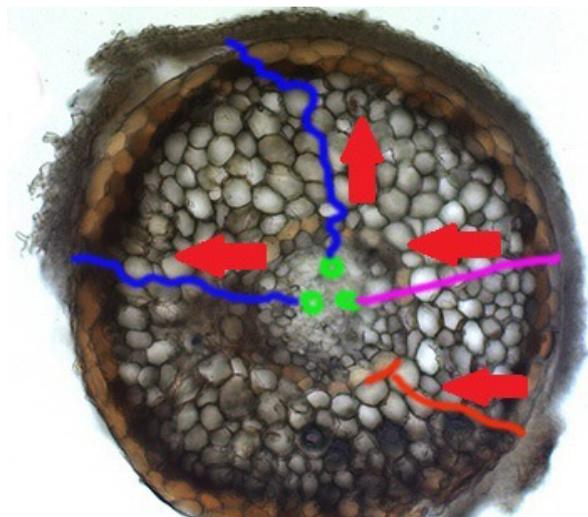


Рисунок 4 – Микроскопия светлого поля. Образец № 11-07-10-2016 /Simple 2/ фоновая зона
Поперечный срез микоризного корневого окончания *Picea abies* (L.) Karst.

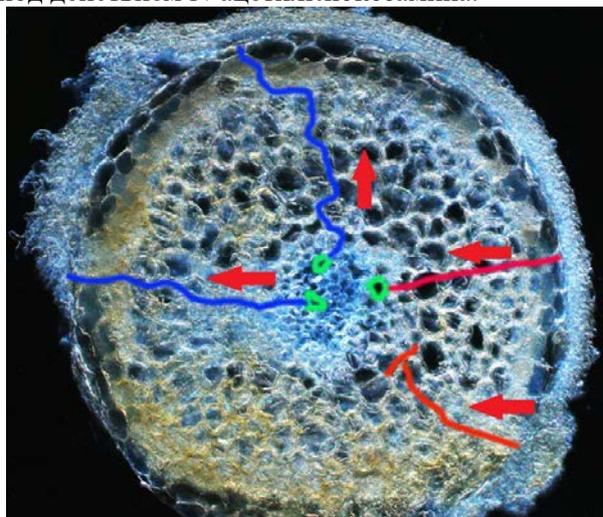


Рисунок 5 – Микроскопия темного поля. Образец № 11-07-10-2016 /Simple 2/ фоновая зона
Поперечный срез микоризного корневого окончания *Picea abies* (L.) Karst.

Примечание: красная стрелка – направление транспорта веществ; синяя линия – апопластный реверс сахаров к мантии; лиловая линия – симпластный транспорт веществ; красная линия – метаболический активный транспорт.

Реверсный ток сахаров к мантии ведет к накоплению полиуроновых кислот, что является вкладом в формирование внешних структур анатомического строения функциональной микоризной единицы наряду с выделяемым гликопротеином гифами грибного компонента. Полиуроновые кислоты как биополимеры влияют наравне с гликопротеином на структуру мантии, препятствуя иссушению функциональной микоризной единицы в период длительных засух из-за стабилизации воды в почвенном профиле в области наибольшей концентрации микоризных корневых окончаний.

Авторы научных статей указывают на факт накопления ионов тяжелых металлов в корневых системах и связь этого процесса с уменьшением биомассы, размеров корневых окончаний, исчезновением волосков, уменьшением размеров стели [22], [23]. В основном свинец

аккумулируется клеточными стенками клеток микоризных корневых окончаний, где связывается с полиуроновыми кислотами полисахаридов, глюканами, хитином и хитозаном с образованием хелатных комплексов [24].

Заключение. Нами показано, что обмен тяжелых металлов, радиальный транспорт в микоризных корневых окончаниях системы «*Picea abies* – эктомикоризные грибы» претерпевают изменения.

Выяснено, что основной путь поступления ионов металлов в стель осуществляется по симпласту неметаболическим путем, поскольку плазмодесмы не претерпевают существенной дифференциации в суберинизированных микоризных окончаниях ели обыкновенной.

На представленных в работе анатомических срезах микоризных корневых окончаний обнаружено, что апопластный путь поступления ионов металлов тормозится радиальным током сахаров от центрального цилиндра к мантии, что вызывает эффект «пищевого» стресса, влияющего на степень суберинизации близлежащих клеток мезодермы растительного компонента. Реверс сахаров осуществляется грибным компонентом из флоэмы осевого цилиндра через пропускные клетки эндодермы в мантию.

Трансцеллюлярное (метаболическое) поступление ионов тяжелых металлов во внутриклеточное пространство первичной коры микоризного корневого окончания осуществляется через функциональные единицы – пелотоны. Этот процесс контролируется экспрессией специфических генов, АТФ-азной активностью, накоплением хелатных комплексов на поверхности мембранных мессенджеров через изменения изоэлектрической составляющей ионных каналов. Формирование субериновых ламелей тормозит трансцеллюлярный транспорт, что может быть блокировано создаваемым дефицитом Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} внутри клеток первичной коры в определенных секторах микоризного корневого окончания через формирование и работу хелатных комплексов по разные стороны мембранных комплексов пелотона.

Формирование анатомо-морфологического комплекса «*Picea abies* – эктомикоризные грибы» под действием молекулярно-генетических механизмов регуляции гомеостаза способствует распространению ели обыкновенной на гораздо большей территории, чем можно было бы ожидать на самом деле.

Литература

1. Гончарук, В. В. Физико-химические аспекты проблемы загрязнения почв и гидросферы тяжелыми металлами / В. В. Гончарук, Н. М. Соболева, А. А. Носонович // Химия в интересах устойчивого развития. – 2003. – Т. 11, № 6. – С. 795–809.
2. Путилина, В. С. Сорбционные процессы при загрязнении подземных вод тяжелыми металлами / В. С. Путилина, И.В. Галицкая, Т.И. Юганова. – Новосибирск : ГПНТБ СО РАН, 2016. – 123 с.
3. Ильин, В. Б. Тяжелые металлы в системе почва–растение / В. Б. Ильин // Почвоведение. – 2007. – № 9. – С. 1112–1119.
4. Путилина, В. С. Влияние органического вещества на миграцию тяжелых металлов на участках складирования твердых бытовых отходов : аналит. обзор / В. С. Путилина, И. В. Галицкая, Т. И. Юганова ; ГПНТБ СО РАН; ИГЭ РАН. – Новосибирск, 2005. – С. 91–98.
5. Водяницкий, Ю. Н. Биогеохимия тяжелых металлов в загрязненных переувлажненных почвах (аналитический обзор) / Ю. Н. Водяницкий, И. О. Плеханова // Почвоведение. – 2014. – № 3. – С. 273–282.
6. Rey-Castro, C. Effective affinity distribution for the binding of metal ions to a generic fulvic acid in natural waters / C. Rey-Castro, S. Mongin, C. Huidobro, C. David, J. Salvador, J. L. Garcés, J. Galceran, F. Mas, J. Puy // Environ. Sci. & Technol. – 2009. – Vol. 43, № 19. – P. 7184–7191.
7. Dillard, J. G. X-ray photoelectron spectroscopic (XPS) surface characterization of cobalt on the surface of kaolinite / J. G. Dillard, M. H. Koppelman // J. of Colloid & Interface Sci. – 1982. – Vol. 87, № 1. – P. 46–55.
8. Ермохин, М. В. Современная динамика южной границы сплошного распространения ели (*Picea abies* Karst.) в Беларуси / М. В. Ермохин, А. В. Пугачевский // Весці Нацыянальнай акадэмі Беларусі. – 2009. – № 1. – С. 51–55.
9. Алексеев, Ю. В. Тяжелые металлы в почвах и растениях / Ю. В. Алексеев. – М., 1987. – 140 с.
10. Колмаков, П. Ю. Разнообразие и распределение тонких корней *Picea abies* (L.) Karst. по почвенному профилю в природных и антропогенных экосистемах Белорусского Поозерья / П. Ю. Колмаков, А. С. Кисова // Веснік ВДУ. – 2018. – № 2 (99). – С. 41–49.

11. Орлов, Д. С. Микроэлементы в почвах и животных организмах / Д. С. Орлов // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 1. – С. 61–68.
12. Титов, А. Ф. Тяжелые металлы и растения / А. Ф. Титов, Н. М. Казнина, В. В. Таланова. – Петрозаводск : Карельский научный центр РАН, 2014. – 194 с.
13. Sakamoto, K. Transcriptome analysis of soybean (*Glycine max*) root genes differentially expressed in rhizobial, arbuscular mycorrhizal, and dual symbiosis / K. Sakamoto, N. Ogiwara, T. Kaji [et al.] // *Journal of Plant Research*. – 2019. – V. 132. – P. 541–568.
14. Peterson, R. L. Exploring structural definitions of mycorrhizas, with emphasis on nutrient-exchange interfaces / R. L. Peterson, H. B. Massicotte // *Can J. Bot.* – 2004. – Vol. 82. – P. 1074–1088.
15. Казнина, Н. М. Физиолого-биохимические и молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений семейства *Poaceae* к тяжелым металлам : дис. ... д-ра биол. наук : 03.01.05 / Н. М. Казнина. – Петрозаводск, 2016. – 358 с.
16. Mills, R. F. Functional expression of AtHMA4, a P-1B-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass / R. F. Mills, G. C. Krijger, P. J. Baccarini, J. L. Hall, L. E. Williams // *The Plant Journal*. – 2003. – V. 35 (2). – P. 164–176.
17. Barberon, M. Adaptation of root function by nutrient-induced plasticity of endodermal differentiation / M. Barberon, J. E. M. Vermeer, D. De Bellis [et al.] // *Sell*. – 2016. – № 164. – P. 447–459.
18. Колмаков, П. Ю. Анатомические взаимодействия разнородных организмов при развитии консорциев / П. Ю. Колмаков, Е. В. Антонова // Наука – образованию, производству, экономике : материалы 74-й Региональной научно-практической конференции преподавателей, научных сотрудников и аспирантов, Витебск, 18 февраля 2022 г. – Витебск : ВГУ им. П.М. Машерова, 2022. – С. 67–69.
19. Hussain, D. ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis* / D. Hussain, M. J. Haydon, Y. Wang [et al.] // *Plant Cell*. – 2004. – V. 16. – P. 1327–1339.
20. Verret, F. Overexpression of AtHMA4 enhanced root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant tolerance / F. Verret, A. Gravot, P. Auroy [et al.] // *FEBS Lett*. – 2004. – V. 576. – P. 306–312.
21. Shukla, V. Suberin plasticity to developmental and exogenous cues is regulated by a set of MYB transcription factors / V. Shukla, H. Jian-Pu, C. Fabienne [et al.] // *Plant Biology*. – 2021. – Vol. 118, № 39. P. 1–11.
22. Liu, H. Influence of iron plaque on uptake and accumulation of Cd by rice (*Oryza sativa* L.) seedlings grown in soil / H. Liu, J. Zhang, P. Christie, F. Zhang // *Science of The Total Environment*. – 2008. – V. 394. – P. 361–368.
23. Колмаков, П. Ю. Проникновение грибного компонента в корневые окончания *Picea abies* (L.) Karst. / П. Ю. Колмаков, Е. В. Антонова // *Вестник ВДУ*. – 2017. – № 4 (97). – С. 40–47.
24. Sharp, R. G. A review of the applications of chitin and its derivatives in agriculture to modify plant-microbial interactions and improve crop yields / R. G. Sharp // *Agronomy*. – 2013. – № 3. – P. 757–793.