

УДК 581.142

doi: 10.17223/19988591/23/11

А.А. Ермошин, М.Н. Цибизова, И.С. Киселёва

*Институт естественных наук Уральского федерального университета
имени первого Президента России Б.Н. Ельцина (г. Екатеринбург)*

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕДИ И АЛЮМИНИЯ НА РАЗВИТИЕ ПРОРОСТКОВ *Trifolium repens* L.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашения № 14.В37.21.2078 и 14.А18.21.0203), а также молодых ученых УрФУ в рамках реализации программы развития УрФУ.

Проведено изучение влияния высоких доз ионов меди и алюминия на развитие проростков клевера ползучего. Определены всхожесть семян, линейные размеры корешка и гипокотыля, содержание фотосинтетических пигментов. В качестве стрессоров в работе использовали растворы сульфата меди и сульфата алюминия в концентрациях 50, 100, 200 и 1000 мкМ по металлу. Было показано, что более чувствительным к поллютантам является рост корешка, менее чувствительным – рост гипокотыля. Ионы меди были более токсичны для проростков клевера, чем ионы алюминия. Ионы меди в концентрации 100–200 мкМ вызывали двукратное уменьшение всех изученных показателей, в то время как алюминий в дозе 200 и 1 000 мкМ снижал их не более чем на треть. Также были использованы концентрации 10 и 5 000 мкМ. Первая из них не оказала существенного влияния на развитие проростков, вторая оказалась летальной.

Ключевые слова: *Trifolium repens* L.; ионы алюминия; медь; рост растений; стресс.

Введение

Ухудшение экологической обстановки, вызванное антропогенной нагрузкой, негативно сказывается на жизнедеятельности организмов, в том числе растений. Сильным токсическим действием обладают ионы тяжелых металлов, в частности меди. Исследование действия ионов меди на живые организмы представляет интерес в связи с тем, что этот элемент – весьма распространенный антропогенный поллютант, так как металлическая медь является одним из самых востребованных конструкционных металлов. Вместе с тем медь – важный микроэлемент, ионы которого участвуют в переносе электронов в ЭТЦ митохондрий и хлоропластов, синтезе пигментов и активации многих ферментов.

Для большинства высших растений граница толерантности к ионам меди в растворе составляет 10^{-6} моль/л. При действии избытка меди снижается уровень биосинтеза хлорофилла, изменяется белковый состав хлоропластов,

ингибируется транспорт электронов по фотосинтетической цепи [1]. Опыты с хрустальной травкой выявили прямую зависимость между разными концентрациями ионов меди в среде и скоростью ингибирования процессов накопления биомассы и появления некротических образований на листьях [2].

Алюминий в высоких концентрациях также является токсичным элементом для растений. Он – один из самых распространенных элементов в земной коре. В связи со своей легкостью, высокой тепло- и электропроводностью широко применяется в качестве конструкционного материала.

Несмотря на то что алюминий не относится к тяжелым металлам, его ионы достаточно токсичны для растений, особенно на кислых почвах. Токсичность ионов алюминия во многом связана с его антагонизмом по отношению к кальцию и магнию [3]. Это обуславливает интерес к созданию форм растений, устойчивых к нему, и изучению механизмов его токсичности и детоксикации.

Действие металлов-токсикантов удобно изучать на видах, растущих в местах, подвергающихся их воздействию. Клевер ползучий является одним из широко распространенных видов травянистых растений со смешанной экологической стратегией с выраженной склонностью к рудеральности. Он имеет широкий ареал, произрастает в различных экологических условиях, применяется человеком в качестве кормового и медоносного растения. Используется, как и все бобовые, в качестве сидератного удобрения, может быть перспективным в качестве газонного растения и для целей фиторемедиации и рекультивации нарушенных земель [4].

Цель работы – изучение влияния ионов меди и алюминия на процессы прорастания и развития проростков клевера ползучего.

Материалы и методики исследования

Семена клевера проращивали в пластиковых чашках Петри на двух слоях фильтровальной бумаги, на которые наносили 10 мл дистиллированной воды (контроль), или раствор CuSO_4 , или $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ в концентрации 10, 50, 100, 200, 1 000 и 5 000 мкМ по металлу. В каждую чашку помещали по 100 семян. Чашки выдерживали при температуре 26°C и фотопериоде 16/8 ч. На 3-и сут определяли всхожесть семян, на 5-е – линейные размеры растений. Из пятидневных проростков экстрагировали фотосинтетические пигменты. Для определения содержания пигментов по 30 проростков помещали в пробирку Эппендорфа, добавляли 1 мл 96%-ного этанола, выдерживали в темноте в течение суток при комнатной температуре, после чего экстракт сливали, растительный материал промывали этанолом дважды до обесцвечивания проростков. Этанольные экстракты объединяли, оптическую плотность раствора оценивали при 440, 649 и 665 нм на спектрофотометре Apel UV-303 (Япония). Содержание пигментов определяли по формулам для этанольных экстрактов [5].

Опыт повторяли трижды, для определения пигментов в каждом опыте брали три биологические повторности. За биологическую повторность при-

нимали усредненную пробу из 30 проростков. Для определения линейных размеров проростков выборка составляла 50 растений в каждом из экспериментов.

Статистическую обработку данных проводили в приложениях MS Excel 2003 и StatSoft STATISTICA for Windows 6.0. Статистическую значимость отличий в содержании пигментов определяли с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни ($p < 0,05$). Для оценки всхожести использовали угловое преобразование Фишера, линейных размеров – критерий Стьюдента после проверки выборки на нормальность распределения. Результаты представлены в виде среднего значения с ошибкой.

Результаты исследования и обсуждение

В качестве токсикантов использовали растворы сульфата меди и сульфата алюминия в концентрации 10, 50, 100, 200, 1 000 и 5 000 мкМ по металлу. Концентрация 10 мкМ не оказывала заметного влияния на изучаемые ростовые показатели, а 5 000 мкМ была летальной для проростков. Поэтому на рисунках данные представлены только для концентраций в диапазоне от 50 до 1 000 мкМ.

Была определена всхожесть семян при действии ионов меди и алюминия (рис. 1). Этот показатель интегрально характеризует жизнеспособность растений. В отношении всхожести семян ионы меди оказались более токсичны, чем ионы алюминия. Низкая концентрация ионов меди (50 мкМ) не оказывала влияния на всхожесть семян. Ионы меди в концентрации 100 мкМ вызывали 50%-ное ингибирование всхожести семян. Линейной зависимости между дозой токсиканта и всхожестью семян для концентраций ионов 100 и 200 мкМ не показано: повышение дозы токсиканта в 2 раза вызывает уменьшение всхожести на одну треть. Максимальная из использованных концентраций сульфата меди (1000 мкМ) понижает всхожесть семян до 12%.

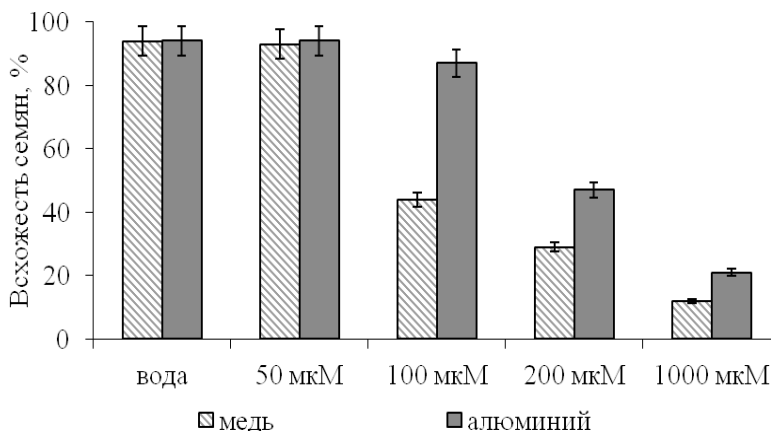


Рис. 1. Всхожесть семян клевера лугового при действии ионов меди и алюминия

Ионы алюминия оказывали существенно меньшее влияние на всхожесть семян: в концентрации 200 мкМ они вызывали 50%-ное ингибирование. Максимальная концентрация ионов алюминия (1 000 мкМ) приводила к снижению всхожести примерно до 25% от всхожести в контроле. Концентрации 50 и 100 мкМ не оказывали влияния на всхожесть семян.

Были определены показатели линейных размеров проростков. Изменение длины корешка при обработке растений ионами тяжелых металлов были выражены сильнее, чем длины гипокотыля (рис. 2). При концентрации 50 мкМ Cu^{2+} наблюдали достоверное уменьшение длины корешка. С ростом концентрации происходило практически линейное уменьшение его длины. Ионы меди в концентрации 200 мкМ вызывали 50%-ное ингибирование роста корешка; при содержании меди в среде 1 000 мкМ корешок достигал четверти своей длины. Изменение длины гипокотыля было значительно менее чувствительно к действию тяжелых металлов – только при содержании меди в среде 200 мкМ происходило незначительное уменьшение длины гипокотыля. Влияние самой высокой из использованных концентраций выразилось в подавлении его роста на 50%.

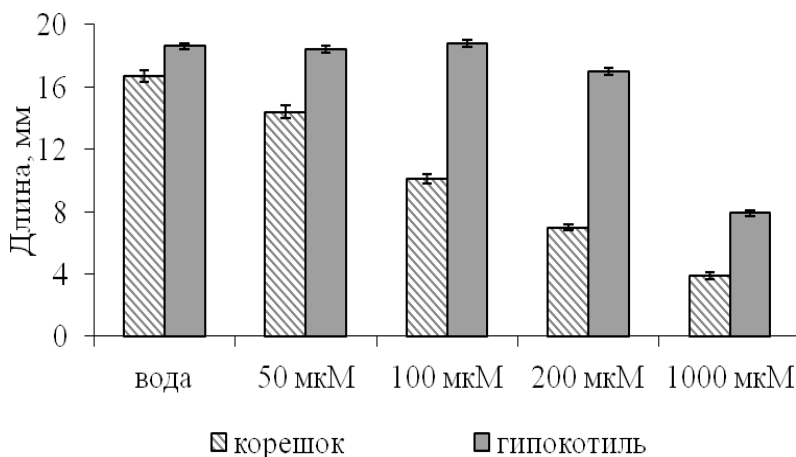


Рис. 2. Влияние ионов меди на длину корешка и гипокотыля клевера ползучего

Алюминий не относится к тяжелым металлам, поэтому мы предположили, что он будет менее токсичен для растений, чем медь. Рис. 3 демонстрирует, что самая высокая из использованных нами концентраций (1 000 мкМ) вызывала достоверное уменьшение роста органов проростков клевера. Длина гипокотыля при этом уменьшалась на треть, а размеры корешка составляли около 50% от контроля.

Известно, что при действии избытка металлов происходит угнетение интенсивности фотосинтеза [6, 7]. В значительной степени это связано с деградацией фотосинтетических пигментов. Изменение содержания суммы

хлорофиллов было использовано как маркер стресса (рис. 4). Достоверное снижение содержания суммы хлорофиллов вызывала обработка проростков раствором 100 мкМ ионов меди. 200 мкМ CuSO_4 вызывал уменьшение их содержания в два раза, а 1 000 мкМ раствор – в три раза по сравнению с контролем. Алюминий оказался менее токсичен, чем медь, и в отношении деградации хлорофиллов. Концентрация 200 мкМ сульфата алюминия не вызывала деградации пигментов, 1 000 мкМ раствор вызывал снижение содержания пигментов на треть.

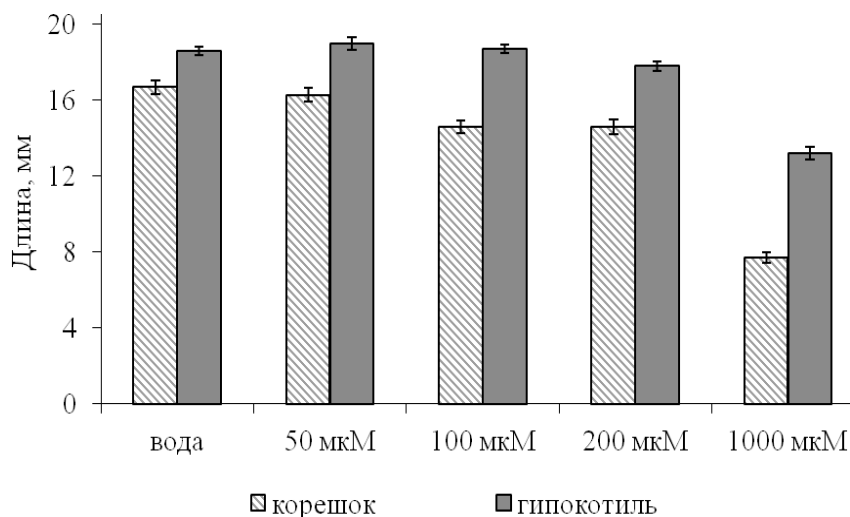


Рис. 3. Влияние ионов алюминия на длину корешка и гипокотили клевера ползучего

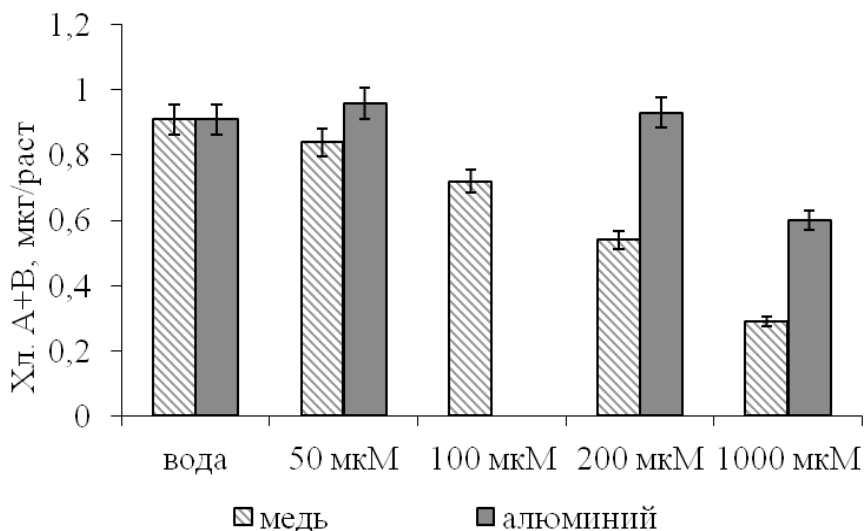


Рис. 4. Содержание суммы хлорофиллов в проростках клевера ползучего при действии ионов алюминия и меди

Заключение

Определен интервал чувствительности проростков клевера ползучего к действию ионов меди и алюминия. Концентрация 10 мкМ не оказывала существенного влияния на ростовые и физиологические особенности растений, тогда как концентрация 5 000 мкМ оказалась летальной. Воздействие 50 мкМ CuSO_4 угнетающе действовало на развитие растений, 200 мкМ вызывало двукратное снижение содержания хлорофиллов в проростках и уменьшение длины корешка, подавляло рост hypocotyle и более чем в два раза уменьшало всхожесть семян.

Таким образом, содержание в среде 200 мкМ меди оказывало сильное, но не летальное токсичное воздействие на растения клевера. Ионы алюминия, в сравнении с медью, оказались менее токсичными для проростков клевера. Самая высокая из использованных концентраций (1 000 мкМ) не вызывала столь заметных изменений, как 100–200 мкМ ионов меди. Результаты исследования могут быть полезны для дальнейшей селекции этой культуры на устойчивость к металлам.

Литература

1. Полюнов В.А. Действие низких концентраций меди на фотоингибирование фотосистемы II у *Chlorella vulgaris* // Физиология растений. 1993. № 5. С. 754–757.
2. Холодова В.П., Волков К.С., Кузнецов Вл.В. Адаптация к высоким концентрациям солей меди и цинка хрустальной травки и возможность их использования в целях фитореимедации // Физиология растений. 2005. № 6. С. 848–858.
3. Kinraide T.B., Parker D.R., Zobel R.W. Organic acid secretion as a mechanism of aluminium resistance: a model incorporating the root cortex, epidermis, and the external unstirred layer // Journal of Experimental Botany. 2005. № 417. P. 1853–1865.
4. Бояркин Д.В., Губанов Л.Н., Федоровский Д.Н. Обезвреживание осадков городских сточных вод с использованием бобовых культур // Вода и экология: проблемы и решения. 2003. № 4. С. 55–58.
5. Практикум по физиологии растений / под ред. В.Б. Иванова. М.: Академия, 2001. 144 с.
6. Караваев В.А., Баулин А.М., Гордиенко Т.В. Изменения фотосинтетического аппарата листьев бобов в зависимости от содержания тяжелых металлов в среде выращивания // Физиология растений. 2001. № 1. С. 47–54.
7. Маркина Ж.В., Айздайчер Н.А. Содержание фотосинтетических пигментов, рост и размер клеток микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum* при загрязнении среды медью // Физиология растений. 2006. № 3. С. 343–347.

Поступила в редакцию 16.04.2013 г.

Alexander A. Ermoshin, Marianna N. Tsybizova, Irina S. Kiselyova

Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia

THE INFLUENCE OF COPPER AND ALUMINUM ON THE DEVELOPMENT OF *Trifolium repens* L. SEEDLINGS

The study was supported by the Ministry of education and science of the Russian Federation, projects 14.A18.21.0203, 14.B37.21.2078 and Program for development of Ural Federal University, financial support for young scientists

Environmental degradation caused by anthropogenic impact affects the living activity of organisms, including plants. Especially a lot of stresses are caused by heavy metal ions, p.e. copper. Investigation of the effects of copper ions on living organisms is important because this element is a very common pollutant, as metallic copper is one of the most wide-spread constructing materials. However, copper is an important trace element involved in the transfer of electrons in the ETC in mitochondria and chloroplasts, pigment synthesis and activation of many enzymes. The excess of copper in the environment lowers the level of chlorophyll biosynthesis, changes the protein composition of the chloroplast and inhibits photosynthetic electron transport. Aluminum at high concentrations is also a toxic element for plants. It is one of the most abundant elements in the lithosphere. Due to its light weight, high thermal and electrical conductivity, it is widely used as a structural material. Despite the fact that aluminum is not a heavy metal, it is quite toxic to plants, especially in acidic soils. Aluminum toxicity is significantly caused by its antagonism to calcium and magnesium. All these facts cause the interest to creating forms of plants tolerable to these ions and to the study of the mechanisms of their toxicity and detoxification. The aim of our study was to investigate the influence of copper and aluminum ions on germination and seedling growth in white clover.

Seed germination, root and hypocotyls sizes as well as the content of photosynthetic pigments were studied under the influence of copper sulphate and aluminum sulphate solutions at 50, 100, 200 and 1 000 μM on metal. Seeds were germinated in Petri dishes on filter paper moistened with test solutions. The germination of seeds was tested on the third day after sowing, on the fifth day the linear size of seedlings and concentration of photosynthetic pigment were determined after ethanol extraction spectrophotometrically. It was shown that the most sensitive indicator of copper and aluminum stress is the root growth compared to hypocotyl growth. Copper ions were significantly more toxic to clover sprouts than aluminum ones. 50 μM copper sulfate caused a depression in the development of plants, and aluminum ions at the same concentration had no effect on plant development. 100–200 μM CuSO_4 caused a two-fold reduction in all the studied parameters while the $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ at 200 and 1 000 μM reduced them to no more than one third. Maximum concentration of aluminum ions (1 mM) had less effect on plant development than copper ions at concentration of 100 and 200 μM . The obtained data could be used for clover breeding to get more heavy-metal resistant forms.

Key words: *Trifolium repens* L.; aluminum ions; copper; plant growth; stress.

Received April 16, 2013