

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 581.1
doi: 10.17223/19988591/21/8

Ю.В. Иванов¹, Ю.В. Савочкин¹, Е.В. Шумейко², Вл.В. Кузнецов¹

¹Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (г. Москва)

²Российский университет дружбы народов (г. Москва)

РЕАЛИЗАЦИЯ РАННЕГО ЭТАПА ОНТОГЕНЕЗА СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ НА ФОНЕ ТОКСИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ИОНОВ МЕДИ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 12-04-01715-а) и Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № 14.132.21.1309).

Исследовали воздействие ионов меди (0–50 мкМ) на посевные качества семян сосны обыкновенной, рост и развитие сеянцев на ювенильном этапе онтогенеза, а также на содержание основных фотосинтетических пигментов в ассимилирующих органах. Установлено, что прорастание семян сосны обыкновенной не может являться достоверным критерием оценки токсичности ионов меди из-за высокой устойчивости к тяжелым металлам процесса прорастания. Показано, что даже при минимальной концентрации ионов меди в питательной среде (15,6 нМ) сеянцы сосны способны их интенсивно поглощать и аккумулировать в надземных органах, что позволяет удовлетворить физиологическую потребность в данном элементе. Обнаружена высокая корреляция содержания ионов меди как в корневой системе, так и надземных органах с испытанными концентрациями CuSO_4 , что позволяет отнести сосну обыкновенную к типичным индикаторам данного металла. Ингибирующее воздействие ионов меди на рост и развитие сеянцев наблюдалось во всем диапазоне испытанных концентраций и проявлялось в значительном снижении массы и средних размеров органов сеянцев. При воздействии 5 мкМ Cu^{2+} регистрировалось 40%-ное ингибирование роста главного корня, а при 10 мкМ – 80%. Доказано, что значительное (10%) снижение содержания воды в органах сеянцев может служить достоверным индикатором их гибели, несмотря на отсутствие визуально различимых признаков обезвоживания. Показано, что концентрации 20 мкМ CuSO_4 и выше являются летальными для сеянцев сосны обыкновенной. Хроническое воздействие ионов меди сопровождается развитием хлороза в хвое, но не в семядолях сеянцев, о чем свидетельствуют результаты исследования содержания основных фотосинтетических пигментов.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris*; тяжелые металлы; посевные качества; сеянцы; морфометрические параметры; фотосинтетические пигменты.

Введение

Интенсивная разработка месторождений полезных ископаемых сопряжена с выносом из мест естественного залегания и перераспределением в окружающей среде колоссального количества тяжелых металлов [1]. Увеличение

их содержания в почвах характерно как для территорий, непосредственно примыкающих к местам добычи и переработки [2, 3], так и для сельскохозяйственных угодий из-за применения удобрений, ядохимикатов [4], осадков сточных вод [1] и нарушения технологии ирригации [5, 6]. С учетом высокой экологической опасности, которую представляют тяжелые металлы для всех компонентов биосферы [7], изучение последствий их воздействия на фитоценозы приобретает особую важность [8].

Практически все тяжелые металлы токсичны для растений [9] вследствие их высокого сродства к физиологически важным органическим соединениям [5]. В ряду устойчивости металл-лигандных комплексов (ряд Ирвинга – Уильямса) комплексы с Cu^{2+} занимают первое место [10], что характеризует ионы меди высшим уровнем токсичности [11]. С учетом высоких объемов мировой добычи (16,1 млн т за 2011 г.) и тенденции к их росту (13,7 млн т – в 2001 г.) [12] медь становится самым опасным загрязнителем биоты.

В малых количествах медь является незаменимым микроэлементом для растений, являясь каталитическим кофактором в процессах дыхания, фотосинтеза, фиксации азота и транспорта железа [13]. В то же время при концентрациях, лишь незначительно превышающих оптимальные, она становится токсичной для растений. Ее токсическое действие связано с активизацией процессов свободнорадикального окисления, вследствие которых нарушаются структура и проницаемость биологических мембран клетки, функционирование электрон-транспортных цепей дыхания и фотосинтеза, а также ферментов, участвующих в синтезе белка и метаболизме углеводов [4, 13].

В почве медь присутствует в виде органически связанных форм, что обуславливает ее удержание в верхних горизонтах и слабую подвижность в почвенном профиле [6]. Повышение кислотности почв, связанное с режимом увлажнения и особенностями состава произрастающей растительности, сопровождается усилением биодоступности меди [1]. В условиях беспрецедентного увеличения количества доступного металла в почве немногие виды растений способны выживать, поскольку повреждающее действие солей меди превышает их адаптационный потенциал. Это крайне опасно для древесных видов растений, особенно хвойных, имеющих длительный репродуктивный цикл, из-за которого селекция металл-устойчивых экотипов становится практически невозможной [8]. Естественное возобновление древесной растительности на загрязненных тяжелыми металлами почвах также может быть затруднено в связи с более низкой, по сравнению со взрослыми растениями, толерантностью сеянцев к неблагоприятным воздействиям [1].

Многие виды хвойных древесных растений, особенно представители рода *Pinus*, зачастую заселяют непригодные для других видов почвы. Благодаря особенностям строения корневой системы, которые проявляются в доминировании главного корня и быстром его развитии, сеянцы преодолевают поверхностные горизонты почвы, достигая обеспеченных водой и элемента-

ми минерального питания горизонтов. Однако ионы меди задерживают развитие корневой системы, ингибируя рост клеток в длину из-за повреждения клеточных мембран и утечки ионов [1]. В связи с этим поддержание высокой скорости роста главного корня и темпов развития корневой системы является необходимым условием выживания сеянцев рода *Pinus* особенно на фоне антропогенного загрязнения [1].

Ранее нами была установлена довольно высокая чувствительность сеянцев сосны обыкновенной (типичный представитель рода *Pinus* к хроническому действию избытка ионов цинка [3], занимающего второе место по токсичности в ряду Ирвинга – Уильямса [10]. В связи с более интенсивными темпами добычи меди и эмиссии в окружающую среду изучение последствий ее воздействия на хвойные виды растений приобретает особое значение.

Целью данной работы являлось изучение воздействия ионов меди на посевные качества семян, определение порога токсических концентраций ионов меди, вызывающих ингибирование роста сеянцев сосны, изучение особенностей развития органов сеянцев, характера аккумуляции ионов меди и содержания основных фотосинтетических пигментов.

Материалы и методики исследования

Семена сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) сбора 2010 г., предоставленные Учебно-опытным лесхозом Брянской государственной инженерно-технологической академии, проращивали в дистиллированной воде (контроль) и в растворах CuSO_4 (концентрации 0,32; 1; 2,5; 5; 10; 20; 25 и 50 мкМ). Энергию прорастания семян оценивали через 7 сут, а их абсолютную всхожесть – через 15 сут с момента замачивания [3].

После сброса семенной кожуры и разворачивания семядолей, сеянцы выращивали в камере фитотрона со световыми периодом 16 ч [14] на питательной среде следующего состава: NH_4^+ – 2,0 мМ; K^+ – 1,5 мМ; Mg^{2+} – 0,5 мМ; Na^+ – 0,21 мМ; Ca^{2+} – 1,0 мМ; B^{3+} – 55 мкМ; Mn^{2+} – 5 мкМ; Zn^{2+} – 1,26 мкМ; Cu^{2+} – 0,32 мкМ; Mo^{6+} – 0,1 мкМ; Co^{2+} – 0,02 мкМ; Fe^{2+} – 9,5 мкМ; NO_3^- – 2,0 мМ; PO_4^{3-} – 1,5 мМ; SO_4^{2-} – 0,616 мМ; Cl^- – 2,0 мМ; I^- – 1,0 мкМ; ЭДТА⁴⁻ – 9,5 мкМ, рН 4,5 с различными концентрациями CuSO_4 (0 (без добавления CuSO_4); 0,32 (контроль); 1; 2,5; 5; 10; 20; 25 и 50 мкМ). Смену растворов проводили каждые 5 сут. Эксперимент заканчивали по достижении сеянцами возраста 6 недель, на этапе органогенеза, характеризующемся высокой энергией роста хвои и интенсивным потреблением элементов минерального питания [3].

Оценку темпов накопления биомассы сеянцами проводили гравиметрическим методом. Измерения линейных размеров органов (главный корень, гипокотиль, семядоли, хвоя) проводили в программе MapInfo Professional v.9.5 после сканирования сеянцев с разрешением 800 dpi [3]. Для определения сухой биомассы и содержания воды в органах сеянцев их высушивали до постоянной массы [3].

Содержание ионов меди в органах семян определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре «Формула ФМ400» («Лабист», Россия) после минерализации в растворах концентрированных азотной и хлорной кислот [3].

Содержание фотосинтетических пигментов (хлорофиллы *a* и *b*, каротиноиды) в ассимилирующих органах семян определяли на спектрофотометре «Genesys 10UV» («Thermo Electron Corporation», США) в соответствии с ранее описанной процедурой [3].

Статистическую обработку результатов выполняли в программе Microsoft Excel 2003. Из каждой выборки исключали значения параметров, выходящие за рамки $\pm 3\sigma$. Итоговые значения, представленные в таблицах и на рисунках, являются средней арифметической величиной $\pm$ основная ошибка средней арифметической величины. Оценку существенности различий средних величин проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Корреляционный анализ проводили на основании всех имеющихся экспериментальных данных за исключением отклоняющихся. Оценку коэффициентов корреляции проводили в соответствии со шкалой Чеддока.

Результаты исследования и обсуждение

В диапазоне исследованных концентраций негативного влияния CuSO_4 на посевные качества семян сосны обыкновенной не обнаруживалось (табл. 1). Напротив, по сравнению с контролем, все испытанные концентрации Cu^{2+} вызывали значительное увеличение всхожести (на 15–22%) ($p = 0,01$) и энергии прорастания семян (на 17–24%) ($p = 0,01$), что свидетельствует о стимулирующем воздействии ионов меди. Вместе с тем корреляционной связи всхожести и энергии прорастания семян с испытанными концентрациями CuSO_4 не было установлено ($p > 0,05$): абсолютная всхожесть ($r = 0,27$; $t_r = 1,86$; $N = 45$), энергия прорастания ($r = 0,27$; $t_r = 1,84$; $N = 45$) (табл. 1). В экспериментах с хрустальной травкой (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) также отмечалось стимулирующее воздействие ионов меди (10–50 мкМ CuSO_4) на прорастание семян [16], однако механизм данного эффекта до сих пор не ясен. В то же время при более высоких концентрациях, как правило, ионы меди ингибируют прорастание, что характерно для хрустальной травки [16] и рапса (*Brassica napus* L.) [17].

В связи с тем что прорастание семян является первым физиологическим процессом, подверженным воздействию тяжелых металлов, традиционно считалось, что способность семян прорасти в среде с солями тяжелых металлов может выступать в качестве индикатора устойчивости к действующему фактору [18]. С другой стороны, прорастание семян многих видов растений устойчиво к тяжелым металлам [15]. Это обусловлено низкой проницаемостью для тяжелых металлов семенной кожуры большинства видов, из-за чего период от начала набухания семени до прорыва семенной кожуры кончиком корня наименее подвержен их токсическому воздействию [19].

Т а б л и ц а 3

Развитие органов семян в условиях хронического действия ионов меди

Наименование органа семца	CuSO ₄ , мкМ									
	0	0,32	1	2,5	5	10	20	25	50	
Сухая масса органов, мг										
Корневая система	6,55±0,36	5,86±0,37	5,69±0,07	4,11±0,18	4,34±0,16	1,20±0,21	0,18±0,02	0,25±0,01	0,25±0,04	
Гипокотиль	3,71±0,19	3,45±0,14	3,55±0,08	3,07±0,05	3,24±0,13	2,53±0,12	1,65±0,07	1,73±0,06	1,45±0,06	
Семядоли	5,35±0,23	4,93±0,16	5,08±0,11	4,56±0,13	4,72±0,17	4,01±0,18	2,76±0,12	2,85±0,07	3,04±0,08	
Хвоя	23,32±1,40	21,51±1,30	20,44±0,33	14,95±0,66	14,24±0,47	4,08±0,72	0,24±0,04	0,28±0,03	0,16±0,02	
Содержание воды в органах, %										
Корневая система	91,77±0,30	91,09±0,16	91,69±0,10	91,53±0,18	91,89±0,28	87,39±0,43	74,88±4,02	61,50±1,96	56,75±3,94	
Гипокотиль	74,48±0,54	76,55±0,70	76,17±0,57	77,05±0,70	75,95±0,87	75,26±0,77	77,63±0,55	78,72±0,38	77,48±0,87	
Семядоли	76,67±0,17	78,10±0,31	77,15±0,41	76,64±0,57	75,42±0,51	73,51±0,59	75,26±0,46	76,27±0,30	75,56±0,59	
Хвоя	80,78±0,20	81,06±0,13	80,92±0,15	81,70±0,12	80,99±0,23	78,11±0,35	71,03±2,44	68,53±4,12	72,00±6,00	
Длина органов, мм										
Главный корень	209,36±11,05	194,64±6,87	195,76±6,11	149,67±6,07	118,22±6,73	38,02±4,39	2,99±0,13	3,14±0,13	2,79±0,14	
Гипокотиль	33,64±1,01	32,42±0,63	30,98±0,80	32,64±1,17	30,98±1,03	27,16±0,89	23,72±0,46	23,69±0,47	17,99±0,44	
Семядоли	29,19±1,06	27,64±0,75	26,27±0,62	27,19±1,17	24,99±0,70	20,05±0,65	17,25±0,27	17,80±0,25	17,60±0,35	
Хвоя	38,22±1,15	35,34±0,75	34,83±0,93	32,17±1,38	33,13±1,20	24,21±1,13	3,83±0,22	4,04±0,20	3,17±0,20	

Подтверждением этому служит увеличение гибели всходов сосны с ростом концентрации CuSO_4 ($r = 0,95$; $t_r = 8,30$; $p = 0,001$) (см. табл. 1) по истечении срока, отведенного на определение всхожести. Все это позволяет заключить, что прорастание семян сосны обыкновенной не может являться достоверным критерием оценки токсичности ионов меди.

Содержание ионов меди в органах сеянцев обнаруживает весьма высокие корреляции с концентрацией CuSO_4 в питательном растворе ($p = 0,001$): корневая система ($r = 0,987$; $t_r = 25,27$; $N = 19$), гипокотили ($r = 0,985$; $t_r = 24,46$; $N = 20$), семядоли ($r = 0,90$; $t_r = 10,14$; $N = 26$), хвоя ($r = 0,968$; $t_r = 19,19$; $N = 27$) (рис. 1). В варианте опыта, при котором медь в состав среды не вносилась (0 мкМ CuSO_4), ее концентрация в среде достигала, тем не менее, 15,6 нМ, что могло быть результатом присутствия примесей солей меди в используемых для приготовления среды химических реактивах. В результате частой замены питательных сред и потенциальной абсорбции из воздуха содержание ионов меди в органах сеянцев к окончанию эксперимента достигало: в корневой системе – 82; гипокотилиях – 55; семядолях – 75; хвое – 55 нмоль/г сухой массы. На основании этих данных можно утверждать, что сеянцы сосны обыкновенной на ранней стадии онтогенеза способны интенсивно аккумулировать ионы меди даже при минимальном их содержании в среде, что позволяет обеспечить физиологически необходимый уровень данного элемента. Это также подтверждается результатами анализа содержания ионов меди в органах сеянцев, выращенных в присутствии 0,32 мкМ CuSO_4 (стандартная концентрация для питательных сред) – в 20 раз более высокая концентрация. При этом содержание ионов меди в органах сеянцев увеличивалось, по сравнению с 15,6 нМ: в корневой системе – в 2,7 ($p = 0,001$), в гипокотилиях – 1,3 ($t = 1,20$; $p > 0,05$), в семядолях – в 1,1 ($t = 0,74$; $p > 0,05$) и в хвое в 1,6 раза ($p = 0,001$).

Как правило, количество меди, накапливающейся в растении, пропорционально ее содержанию в окружающей среде, однако корневая система способна блокировать излишнее поступление ионов меди в надземные органы [13]. В диапазоне концентраций до 10 мкМ CuSO_4 наблюдалось плавное увеличение содержания ионов меди в органах сеянцев (рис. 1). При этом содержание ионов меди в корневой системе достоверно различалось между каждой из испытанных концентраций на уровне значимости 0,05–0,01. В гипокотилиях сеянцев значимые различия ($p = 0,05$) отмечались между 2,5 и 5 мкМ, 5 и 10 мкМ Cu^{2+} , а в семядолях – только между 1 и 2,5 мкМ ($p = 0,05$). Различия в содержании ионов меди в хвое сеянцев, с ростом испытанных концентраций, были достоверными при $p = 0,01$. Превышение концентрации 10 мкМ CuSO_4 приводило к усилению поступления ионов меди в корневую систему и их транспорта в надземные органы сеянцев (рис. 1). При 20 мкМ Cu^{2+} содержание ионов меди, по сравнению с 10 мкМ, увеличивалось в корневой системе в 6,3 раза ($p = 0,05$), в гипокотилиях – в 3,8 ($p = 0,001$), в семядолях – в 2,6 ($p = 0,01$), в хвое – в 5,4 раза ($p = 0,001$). Несмотря на линейное

увеличение содержания ионов меди в корневой системе при более высоких концентрациях CuSO_4 (рис. 1, *а*), их содержание в надземных органах повышалось не столь значительно. При концентрациях 20 и 25 мкМ CuSO_4 различий в содержании ионов меди в гипокотильях, семядолях и хвое сеянцев не обнаруживалось ($p > 0,05$), но при максимальной из использованных концентраций (50 мкМ CuSO_4) регистрировалось достоверное ($p = 0,01$) увеличение содержания ионов меди в надземных органах (рис. 1, *б-г*). Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что при всех вариантах обработки содержание ионов меди в корневой системе было значительно выше, чем в надземных органах.

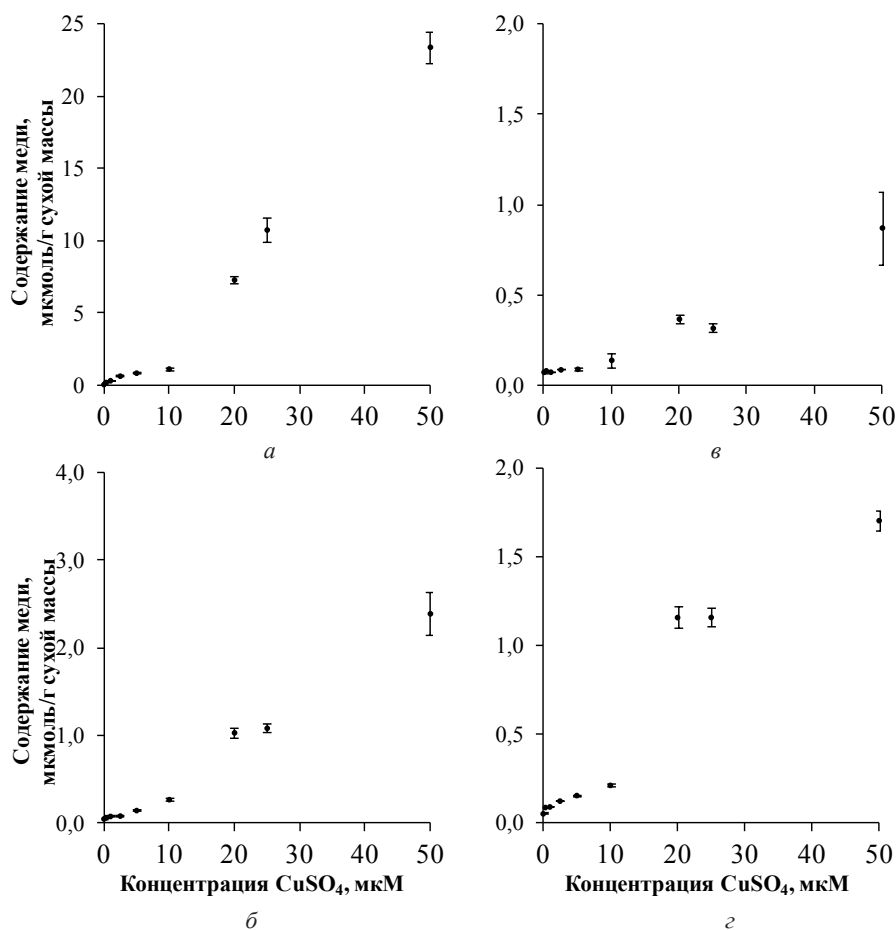


Рис. 1. Содержание ионов меди в органах сеянцев сосны обыкновенной:
а – корневая система; *б* – гипокотиль; *в* – семядоли; *г* – хвоя

Одним из механизмов, позволяющих сеянцам сосны в естественных условиях адаптироваться к повышенному содержанию меди в почве, является

симбиоз с эктомикоризными грибами. Например, благодаря колонизации корневой системы устойчивыми к меди штаммами масленка обыкновенного (*Suillus luteus* (L.) Gray) сеянцы сосны транспортируют в надземные органы меньшее количество ионов меди, по сравнению с немикоризными растениями [8]. Следовательно, в отличие от гидропоники, растения, выращенные в почве или ином твердом субстрате, способны проявлять большую устойчивость к токсическому действию тяжелых металлов из-за их связывания коллоидами почвы и микоризами грибов.

Аккумуляция биомассы сеянцами в условиях загрязнения среды солями тяжелых металлов является интегральным показателем степени их развития и может выступать в качестве индикатора устойчивости к воздействию тяжелых металлов [15]. Хроническое действие ионов меди в концентрации 2,5 мкМ уже приводило к значительному (на 28% по сравнению с контролем (0,32 мкМ), $p = 0,001$) снижению темпов аккумуляции сырой биомассы (см. табл. 2). С увеличением использованных концентраций CuSO_4 наблюдалось более сильное снижение биомассы с достоверными различиями ($p = 0,001$) между концентрациями до 20 мкМ CuSO_4 . При более высоких концентрациях различий в биомассе сеянцев не наблюдалось ($p > 0,05$). Таким образом, до 20 мкМ Cu^{2+} в питательной среде регистрировалось резкое, практически линейное снижение сырой биомассы сеянцев (см. табл. 2), которая, достигнув минимума при 20 мкМ, не изменялась при более высоких концентрациях (25 и 50 мкМ CuSO_4).

Корреляционным анализом всей совокупности экспериментальных данных ($N = 1119$) выявлена заметная отрицательная связь между испытанными концентрациями CuSO_4 и сырой биомассой сеянцев ($r = -0,67$; $t_r = 28,84$; $p = 0,001$). Еще более выраженным было снижение сухой массы сеянцев: корреляционная связь с использованными концентрациями ионов меди – высокая отрицательная ($r = -0,82$; $t_r = 13,08$; $p = 0,001$; $N = 83$). Значимые различия ($p < 0,05$) между концентрациями, как и в случае с сырой биомассой, отмечались при превышении 2,5 мкМ CuSO_4 в среде. Однако между 2,5 и 5 мкМ достоверных различий не наблюдалось ($p > 0,05$) (см. табл. 2), так же как и не отмечалось различий ($p > 0,05$) при повышении концентрации CuSO_4 до 25 и 50 мкМ.

Различия в темпах снижения сырой и сухой массы сеянцев при повышении содержания меди в среде могли быть обусловлены изменением содержания в них воды, несмотря на то что до концентрации 5 мкМ CuSO_4 оно оставалось постоянным (см. табл. 2). Значительное снижение содержания воды (на 7% по сравнению с контролем; $p = 0,001$) происходило лишь при концентрации 10 мкМ и усиливалось в присутствии 20 мкМ Cu^{2+} . Тем не менее корреляционный анализ выявил высокую отрицательную связь между испытанными концентрациями CuSO_4 и содержанием воды в сеянцах ($r = -0,79$; $t_r = 11,02$; $p = 0,001$; $N = 74$).

Анализ соотношения масс надземных и подземных органов сеянцев выявил высокую положительную связь с испытанными концентрациями ионов

меди ($r = 0,76$; $t_r = 10,38$; $p = 0,001$; $N = 83$), что свидетельствует о более интенсивном ингибировании солями меди развития корневой системы. В то же время до концентрации 5 мкМ CuSO_4 различий в соотношении масс органов не наблюдалось ($p > 0,05$) (см. табл. 2). По сравнению с 5 мкМ значительное увеличение соотношения масс органов (в 1,9 раза; $p = 0,01$) происходило при 10 мкМ CuSO_4 . При 20 мкМ Cu^{2+} это соотношение достигало максимума (в 3,3 раза больше, чем при 10 мкМ; $p = 0,001$), а при наибольших концентрациях снижалось ($p = 0,05$) без значимых различий между ними ($p > 0,05$) (см. табл. 2).

Сравнение соотношения сухой массы органов семян свидетельствует о преобладании массы хвои (до 60% сухой массы семени). Таким образом, регистрируемое снижение массы семян связано прежде всего с ингибированием аккумуляции массы хвои в присутствии CuSO_4 ($r = -0,84$; $t_r = 13,66$; $p = 0,001$; $N = 83$) (см. табл. 3). Сопоставимое по силе ингибирующее воздействие ионы меди, в испытанных концентрациях, оказывали и на аккумуляцию массы корневой системы ($r = -0,81$; $t_r = 12,25$; $p = 0,001$; $N = 83$). В то же время снижение массы гипокотилей ($r = -0,51$; $t_r = 5,83$; $p = 0,001$; $N = 101$) и семядолей ($r = -0,46$; $t_r = 5,32$; $p = 0,001$; $N = 107$) было не столь выраженным. Максимальное снижение массы всех органов семян происходило при концентрации 20 мкМ Cu^{2+} без значимых различий между более высокими концентрациями (см. табл. 3).

В диапазоне концентраций до 5 мкМ влияние ионов меди на содержание воды в органах семян не отмечалось, за исключением семядолей, где оно снижалось на 3,4% по сравнению с контролем ($p = 0,001$). Воздействие 10 мкМ CuSO_4 приводило к снижению ($p = 0,001$) содержания воды в корневой системе – на 4,1%, в семядолях – на 5,9%, а в хвое – на 3,6% по сравнению с контролем (см. табл. 3). При более высоких концентрациях CuSO_4 падение содержания воды в корневой системе ($r = -0,68$; $t_r = 7,95$; $p = 0,001$; $N = 76$) и хвое семян ($r = -0,75$; $t_r = 9,63$; $p = 0,001$; $N = 76$) было более выраженным. Так, при 20 мкМ CuSO_4 в корневой системе семян оно снижалось на 17,8%, а в хвое – на 12,4% по сравнению с контролем ($p = 0,001$); данная тенденция сохранялась и при более высоких концентрациях. Несмотря на заметную корреляцию с испытанными концентрациями меди ($r = -0,54$; $t_r = 6,56$; $p = 0,001$; $N = 107$); содержание воды в семядолях семян в диапазоне 10–50 мкМ CuSO_4 практически не изменялось (см. табл. 3). Влияние ионов меди на содержание воды в гипокотилеях семян нами не обнаружено ($r = 0,03$; $t_r = 0,29$; $p > 0,05$; $N = 101$).

На основании сопоставления данных о содержании воды в корневой системе и хвое, а также их массе (см. табл. 3), можно утверждать, что концентрации 20 мкМ CuSO_4 и выше являются летальными для семян сосны обыкновенной. Несмотря на отсутствие визуальных признаков обезвоживания, об этом свидетельствует значительное снижение содержания воды в органах, которое может служить надежным индикатором, указывающим на скорую гибель семян.

Ингибирование роста и накопления биомассы органов растений является одним из самых заметных интегральных показателей токсического воздействия ионов меди [1, 4]. Однако корневая система, непосредственно контактирующая с загрязненным субстратом, проявляет большую чувствительность к воздействию ионов металлов по сравнению с надземными органами [18]. Пороговые концентрации Cu^{2+} , приводящие к ингибированию роста, значительно различаются (от 0,1 до 1 000 мкМ) в зависимости от вида и возраста растений, химического состава, ионной силы и pH питательной среды [4]. Например, 50%-ное ингибирование развития корневой системы проростков рапса отмечалось при пятидневном воздействии 100 мкМ, а полная остановка роста – при 200 мкМ CuSO_4 [17]. В экспериментах с сеянцами сосны обыкновенной, выращенными в субстрате перлита-вермикулита, 50%-ное снижение биомассы сеянцев отмечалось при воздействии 15 мкМ CuSO_4 в течение 10 недель, а при воздействии 60 мкМ оно достигало 76%. При этом ингибирование развития корневой системы сеянцев было более выраженным по сравнению с надземными органами [8]. Воздействие 1 мкМ CuSO_4 в течение 7 дней на двухнедельные сеянцы пинии (*Pinus pinea* L.) и сосны приморской (*Pinus pinaster* Ait.) приводило к снижению скорости роста корневой системы на 49,5 и 51,4% соответственно, а воздействие 5 мкМ ионов меди в течение 3 дней полностью подавляло развитие корневых систем [1].

В данном эксперименте обнаружена высокая чувствительность корневой системы сеянцев сосны к токсическому воздействию ионов меди: даже при 2,5 мкМ происходило снижение длины главного корня сеянцев на 23% по сравнению с контролем ($p = 0,001$) (см. табл. 3). Более высокие концентрации CuSO_4 ингибировали рост главного корня в длину еще значительно: 5 мкМ – на 40%, 10 мкМ – на 80% ($r = -0,71$; $t_r = 20,08$; $p = 0,001$; $N = 390$). Минимальная длина главного корня регистрировалась при концентрации 20 мкМ CuSO_4 , что подтверждает вывод о летальном воздействии высоких концентраций ионов меди.

Токсическое действие Cu^{2+} проявлялось и в снижении средней длины хвоинок ($r = -0,75$; $t_r = 22,04$; $p = 0,001$; $N = 390$), однако достоверные ($p = 0,001$) различия с контролем отмечались при воздействии 10 мкМ Cu^{2+} и при более высоких концентрациях (см. табл. 3). Аналогично ингибированию роста главного корня концентрации 20 мкМ CuSO_4 и выше полностью останавливали развитие хвоинок сеянцев.

Примечательно, что воздействие ионов меди приводило к снижению средних длин гипокотилей ($r = -0,69$; $t_r = 18,98$; $p = 0,001$; $N = 390$) и семядолей сеянцев ($r = -0,59$; $t_r = 14,28$; $p = 0,001$; $N = 390$) (см. табл. 3). При этом достоверное снижение длины гипокотилей (на 19,3%), по сравнению с контролем, отмечалось лишь при воздействии 10 мкМ Cu^{2+} ($t = 4,82$; $p = 0,001$), а семядолей – при 5 мкМ (на 14,4%) ($t = 2,58$; $p = 0,05$) (см. табл. 3). Отметим, что развитие семядолей сеянцев сосны является довольно устойчивым

к воздействию ионов тяжелых металлов. Например, значительное (около 22,4%) снижение длины семядолей сеянцев регистрировалось при воздействии 800 мкМ Zn^{2+} [15], и лишь на 7,4% – при воздействии 50 мкМ Pb^{2+} (неопубликованные данные).

Таким образом, повышенные концентрации ионов меди являются более токсичными для развития сеянцев сосны обыкновенной, по сравнению с ионами цинка и свинца, а ингибирование развития надземных органов сеянцев может являться диагностическим признаком токсического воздействия ионов меди.

Одним из симптомов токсического воздействия ионов меди, регистрируемых у многих видов растений, является развитие хлорозов [20]. Учитывая критическое состояние сеянцев, выращенных при концентрациях свыше 20 мкМ $CuSO_4$, содержание фотосинтетических пигментов в них не исследовалось. В диапазоне концентраций 0,32–10 мкМ Cu^{2+} регистрировались разнонаправленные изменения в содержании хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов в семядолях и хвое сеянцев (табл. 4). Для семядолей сеянцев было характерно стабильное содержание хлорофилла *a* ($r = 0,06$; $p > 0,05$; $N = 41$) и каротиноидов ($r = 0,15$; $p > 0,05$; $N = 41$) во всем диапазоне исследованных концентраций $CuSO_4$. Тем не менее при концентрации 10 мкМ Cu^{2+} отмечалось значительное (на 27%) снижение содержания хлорофилла *b*, по сравнению с контрольными растениями ($p = 0,05$). Вместе с тем корреляционный анализ его содержания в семядолях ($r = -0,19$; $p > 0,05$; $N = 40$) не выявил достоверной связи с испытанными концентрациями ионов меди (табл. 4).

Т а б л и ц а 4

Содержание основных фотосинтетических пигментов в ассимилирующих органах сеянцев в условиях хронического действия ионов меди

Наименование органа сеянца	$CuSO_4$, мкМ					
	0	0,32	1	2,5	5	10
Содержание хлорофилла <i>a</i> , мг/г сухой массы						
Семядоли	4,97±0,37	5,42±0,21	4,90±0,68	4,96±0,64	5,58±0,37	4,97±0,18
Хвоя	2,96±0,07	3,38±0,09	3,16±0,12	3,87±0,04	2,99±0,18	2,59±0,14
Содержание хлорофилла <i>b</i> , мг/г сухой массы						
Семядоли	1,84±0,13	1,97±0,08	1,92±0,17	2,19±0,32	1,73±0,11	1,45±0,19
Хвоя	0,81±0,07	0,92±0,06	0,84±0,05	1,12±0,14	0,69±0,04	0,74±0,10
Содержание каротиноидов, мг/г сухой массы						
Семядоли	0,73±0,04	0,81±0,03	0,70±0,12	0,87±0,17	0,84±0,12	0,88±0,09
Хвоя	0,57±0,07	0,60±0,04	0,59±0,07	0,64±0,09	0,48±0,06	0,48±0,03
Соотношение содержания хлорофиллов <i>a/b</i> , раз						
Семядоли	2,70±0,13	2,65±0,09	2,90±0,17	2,62±0,09	3,14±0,23	3,55±0,31
Хвоя	3,94±0,39	3,97±0,25	3,81±0,26	3,54±0,38	4,02±0,35	3,74±0,38
Соотношение содержания каротиноидов к сумме хлорофиллов <i>a</i> и <i>b</i> , раз						
Семядоли	0,099±0,002	0,113±0,007	0,104±0,011	0,114±0,007	0,102±0,010	0,137±0,006
Хвоя	0,148±0,019	0,138±0,011	0,149±0,019	0,129±0,014	0,127±0,014	0,145±0,009

В хвое сеянцев, напротив, прослеживалась тенденция к снижению содержания фотосинтетических пигментов с ростом концентраций CuSO_4 : хлорофилл *a* ($r = -0,50$; $p = 0,001$; $N = 41$), хлорофилл *b* ($r = -0,23$; $p > 0,05$; $N = 41$), каротиноиды ($r = -0,30$; $p > 0,05$; $N = 41$). Максимальное снижение их содержания, в среднем на 23% по сравнению с контролем, отмечалось при воздействии 10 мкМ Cu^{2+} : хлорофилл *a* ($p = 0,001$), хлорофилл *b* ($p = 0,01$), каротиноиды ($p = 0,05$) (табл. 4). В то же время при концентрации 2,5 мкМ CuSO_4 отмечалось и явное стимулирующее воздействие. По сравнению с контролем существенно увеличивалось содержание хлорофилла *a* (на 15%, $p = 0,01$) и хлорофилла *b* (на 22%; $p > 0,05$), но содержание каротиноидов практически не изменялось (увеличение на 5,5%; $p > 0,05$) (см. табл. 4).

Анализ полученных результатов свидетельствует о значительном увеличении соотношения хлорофиллов *a* и *b* в семядолях сеянцев с ростом концентраций CuSO_4 ($r = 0,57$; $p = 0,001$). Так, при концентрации 10 мкМ Cu^{2+} оно увеличивалось на 34% ($p = 0,05$) по сравнению с контролем, что может свидетельствовать о снижении интенсивности синтеза хлорофилла *b*. В то же время изменений в соотношении хлорофиллов в хвое сеянцев не отмечалось ($r = -0,06$; $p > 0,05$), т.е. их содержание снижалось равнозначно (см. табл. 4).

При воздействии 10 мкМ CuSO_4 в семядолях сеянцев также наблюдалось увеличение соотношения содержания каротиноидов к сумме хлорофиллов *a* и *b* – на 21% выше контроля ($p = 0,05$), свидетельствующее о более значительном подавлении синтеза хлорофиллов по сравнению с каротиноидами. При более низких концентрациях ионов меди такого эффекта не отмечалось ($r = 0,21$; $p > 0,05$). Анализ соотношения содержания каротиноидов к сумме хлорофиллов в хвое сеянцев (табл. 4) не выявил связи с испытанными концентрациями CuSO_4 ($r = -0,02$; $p > 0,05$).

На основании полученных данных можно утверждать, что при хроническом воздействии ионов меди в ассимилирующих органах сеянцев развиваются признаки хлороза, которые могут быть связаны с нарушением минерального питания сеянцев. В пользу данной гипотезы свидетельствует повышенное содержание фотосинтетических пигментов в семядолях, которые развиваются как за счет элементов, запасенных в семени, так и за счет элементов, поглощенных корневой системой на стадии закладки хвоинок. Подтверждением этому также выступают результаты экспериментов с ионами цинка, при воздействии которых отмечалась сходная динамика содержания фотосинтетических пигментов.

Заключение

Совокупность представленных экспериментальных данных свидетельствует о высокой чувствительности сеянцев сосны обыкновенной к хроническому воздействию ионов меди, что проявляется в снижении аккумуляции массы всех органов сеянцев, в особенности хвои и корневой системы.

Сильное ингибирование (более 40%) роста главного корня в длину даже при минимальных испытанных концентрациях (2,5 мкМ CuSO_4) может значительно ограничивать естественное лесовозобновление сосны обыкновенной даже на умеренно загрязненных медью почвах.

Литература

1. Arduini I., Godbold D.L., Onnis A. Influence of copper on root growth and morphology of *Pinus pinea* L. and *Pinus pinaster* Ait. seedlings // Tree Physiology. 1995. Vol. 15. P. 411–415.
2. Kabata-Pendias A., Mukherjee A.B. Trace Elements from Soil to Human. Berlin : Springer-Verlag, 2007. 576 p.
3. Иванов Ю.В., Савочкин Ю.В., Кузнецов Вл.В. Сосна обыкновенная как модельный объект для изучения механизмов адаптации хвойных к действию тяжелых металлов. 1. Изменение морфометрических и физиологических параметров при развитии семян сосны в условиях хронического действия цинка // Физиология растений. 2011. Т. 58, № 5. С. 728–736.
4. Куликова А.Л., Кузнецова Н.А., Холодова В.П. Влияние избыточного содержания меди в среде на жизнеспособность и морфологию корней сои // Физиология растений. 2011. Т. 58, № 5. С. 719–727.
5. Серегин И.В., Иванов В.Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // Физиология растений. 2001. Т. 48, № 4. С. 606–630.
6. Nagajyoti P.C., Lee K.D., Sreekanth T.V.M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review // Environ. Chem. Lett. 2010. Vol. 8. P. 199–216.
7. Иванов Ю.В., Савочкин Ю.В., Кузнецов Вл.В. Хроническое действие высоких концентраций цинка на активность антиоксидантных ферментов в семенах сосны обыкновенной // Вестник Московского государственного университета леса – Лесной вестник. 2012. № 1(84). С. 105–108.
8. Adriaansen K., Vralstad T., Noben J.-P., Vangronsveld J., Colpaert J.V. Copper-adapted *Suillus luteus*, a symbiotic solution for pines colonizing Cu mine spoils // Applied and environmental microbiology. 2005. Vol. 71. P. 7279–7284.
9. Иванов В.Б., Быстрова Е.И. Влияние различных химических соединений на продолжительность формирования бокового корня в главном корне проростков кукурузы // Доклады Академии наук. 1998. Т. 363, № 1. С. 141–144.
10. Гельфман М.И., Юстратов В.П. Неорганическая химия. Комплексные соединения : учеб. пособие. Кемерово, 2004. 112 с.
11. Yruela I. Copper in Plants: Acquisition, Transport and Interactions // Funct. Plant Biol. 2009. Vol. 36. P. 409–430.
12. U.S. Geological Survey. Mineral Commodity Summaries // U.S. Geological Survey. 2011. 198 p.
13. Войчик М., Павликовская-Павлега Б., Тукиендорф А. Физиологические и ультраструктурные ответы растений арабидопсиса на избыток меди и изменение уровня восстановленного глутатиона // Физиология растений. 2009. Т. 56, № 6. С. 906–916.
14. Иванов Ю.В., Савочкин Ю.В. Влияние длины светового дня на устойчивость семян сосны обыкновенной к токсическому действию цинка // Вестник Московского государственного университета леса – Лесной вестник. 2012. № 1(84). С. 99–104.
15. Иванов Ю.В., Савочкин Ю.В., Марченко С.И., Иванов В.П. Анализ ростовых процессов *Pinus sylvestris* L. на ранних стадиях онтогенеза в условиях хронического действия цинка // Известия высших учебных заведений. Лесной журнал. 2011. № 2. С. 12–18.
16. Холодова В.П., Волков К.С., Кузнецов Вл.В. Адаптация к высоким концентрациям солей меди и цинка растений хрустальной травки и возможность их использования в целях фиторемедиации // Физиология растений. 2005. Т. 52, № 6. С. 848–858.

17. Иванова Е.М., Холодова В.П., Кузнецов В.В. Биологические эффекты высоких концентраций солей меди и цинка и характер их взаимодействия в растениях рапса // Физиология растений. 2010. Т. 57, № 6. С. 864–873.
18. Ahmad M.S.A., Ashraf M., Tabassam Q., Hussain M., Firdous H. Lead (Pb)-induced regulation of growth, photosynthesis, and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) plants at early growth stages // Biol. Trace Elem. Res. 2011. Vol. 144. P. 1229–1239.
19. Лянгузова И.В. Влияние аэротехногенного загрязнения на прорастание семян и рост проростков дикорастущих растений // Физиология растений. 2011. Т. 58, № 6. С. 844–852.
20. Cobbett C., Goldsbrough P. Phytochelatin and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis // Annu. Rev. Plant Biol. 2002. Vol. 53. P. 159–182.

Поступила в редакцию 13.10.2012 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2013. № 1 (21). P. 103–117

doi: 10.17223/19988591/21/8

Yury V. Ivanov¹, Yuri V. Savochkin¹, Ekaterina V. Shumeiko², Vladimir V. Kuznetsov¹

¹K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

²Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

IMPLEMENTATION OF SCOTS PINE'S EARLY ONTOGENETIC STAGE AGAINST COPPER TOXIC EFFECT

The copper effect (0, 0.32, 1, 2.5, 5, 10, 20, 25, 50 μM CuSO_4), which ranks first among metal-ligand complexes (Irving-Williams series), on the sowing qualities of seeds, Scots pine seedlings growth and development on early ontogenetic stage (within six weeks), as well as the content of the main photosynthetic pigments in cotyledons and needles are investigated. The population of data denotes high sensitivity of Scots pine seedlings to copper ions chronic exposure. It was found that Scots pine seeds germination cannot be a reliable assessment criterion of copper toxicity, due to high resistance of seed germination. It was shown that Scots pine seedlings are able to incept and accumulate in aboveground organs copper ions even with such minimal concentration (15.6 nM) in the nutrient solution, which can satisfy a physiological requirement in this metal. A strong correlation was found between copper contents in root system and aboveground organs with CuSO_4 concentrations, which permit to use Scots pine seedlings as a typical indicator of this metal. The inhibitory effect of copper ions on the Scots pine seedlings growth and development was observed in the entire range of tested concentrations and expressed in a significant reduction of seedlings weight and average dimensions. When exposed to 5 μM Cu^{2+} , 40% inhibition of the taproot growth was recorded, and at 10 μM – 80%, which can significantly limit the natural regeneration of Scots pine even on moderately copper contaminated soils. It is proved that a significant (10%) reduction in the water content in the seedlings organs can serve a good indicator of their death, despite a lack of visually distinct signs of dehydration. It was shown that the concentration of 20 μM CuSO_4 and higher are lethal for Scots pine seedlings growing in hydroponic culture. Chronic exposure to copper ions is accompanied by the needles chlorosis, but not by seedlings cotyledons, as exemplified by the main photosynthetic pigments content.

Key words: *Pinus sylvestris*; heavy metals; sowing qualities of seeds; seedlings; morphometric features; photosynthetic pigment.

Received October 13, 2012