

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ УСТОЙЧИВОСТИ ДВУХ СОРТОВ ЯРОВОГО РАПСА К ДЕЙСТВИЮ ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ИОНОВ Cu^{+2} И Zn^{+2} *

М.М. Марей¹, Г.Н. Ралдугина²,
Х.Х. Алобайди¹

¹Кафедра ботаники, физиологии растений и агробиотехнологии
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198

²Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
ул. Ботаническая, 35, Москва, Россия, 127276

В статье представлены результаты изучения влияния повышенных концентраций солей CuSO_4 и ZnSO_4 на ряд физиологических параметров растений двух сортов ярового рапса (*Brassica napus L.*) — Вестар и Подмосковный. Установлено, что соли меди оказывали на растения обоих сортов более сильное воздействие, чем соли цинка. На основании полученных данных сделано заключение, что рапс, особенно сорт Подмосковный, более эффективен для удаления из питательного субстрата ионов цинка, чем ионов меди.

Ключевые слова: рапс, *Brassica napus*, Вестар, Подмосковный, фиторемедиация, цинк, медь, пролин.

Тяжелые металлы (ТМ) при антропогенном рассеивании загрязняют окружающую среду, оказывая токсичное воздействие в результате их биоаккумуляции в живых организмах и природных экосистемах даже в малых концентрациях.

Одним из наиболее распространенных отрицательных эффектов ТМ является их взаимодействие с SH-группами белков, приводящее к инактивации ферментов и изменению других биологических свойств макромолекул, что сопровождается нарушением клеточного метаболизма и физиологических свойств растений [1].

Известно, что некоторые виды растений, так называемые аккумуляторы, способны накапливать ТМ. Среди таких растений выделяют особую группу — растений-гипераккумуляторов, способных не только успешно расти на загрязненных

* Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ, гранты № 10-04-00799 и № 10-04-90456-Укр_а, и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

тяжелыми металлами почвах, но и накапливать значительные количества ионов ТМ в надземных органах.

Уровень накопления металла растением, который позволяет отнести тот или иной вид к гипераккумуляторам, не является постоянной величиной, а зависит, прежде всего, от природы ТМ [2]. Использование растений с целью восстановления загрязненных тяжелыми металлами почв называется фиторемедиацией [3]. Главным ее недостатком является относительно небольшая биомасса большинства растений-гипераккумуляторов и низкая скорость их роста. Поэтому особый интерес представляет изучение таких видов растений, которые способны в значительных концентрациях накапливать ТМ в надземных органах и при этом формировать значительную биомассу. Исходя из этих обстоятельств в качестве объекта исследований в данной работе был выбран рапс — *Brassica napus L.*, который относится к роду *Brassica L.*, семейству *Brassicaceae*, как и большинство известных в настоящее время гипераккумуляторов.

Цель работы заключалась в том, чтобы установить, как отвечают растения рапса двух разных сортов (Вестар и Подмосковный) на различные концентрации солей CuSO_4 и ZnSO_4 , и выяснить, какой из них более перспективен для использования в целях фиторемедиации.

Объект и методы исследования. В качестве объекта исследований были взяты 2 сорта ярового рапса (Вестар канадской селекции и Подмосковный селекции ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса, любезно предоставленный сотрудниками этого института).

Растения рапса выращивали в водной культуре в камере фитотрона при дневной температуре 23—25 °С и ночной 18—20 °С с фотопериодом 12/12 (день/ночь) часов при интенсивности освещения 350 люкс/м²сек. В качестве питательной среды использовали среду Хоагганда-Снайдерс [4]. Семена проращивали в перлите и на 10-е сутки переносили в непрозрачные пластиковые сосуды с питательной средой, которую обновляли 1 раз в 7 дней.

В работе использовали 3-недельные растения рапса — по 3 растения на вариант.

Соли тяжелых металлов — сульфаты меди или цинка — вносили в питательную среду в концентрациях: CuSO_4 — от 10 до 50 мкМ, ZnSO_4 — от 100 до 500 мкМ. Для контроля использовали растения, растущие на стандартной питательной среде. Биомассу и содержание воды в растительном материале проводили, используя гравиметрический метод. Сухую массу усредненной навески растительной ткани отдельно с каждого растения определяли после фиксации при 90 °С и высушивания при 70 °С до постоянного веса. Содержание воды (%) рассчитывали, исходя из разности свежей и сухой биомасс по формуле:

$$(m_{\text{свеж. листа}} - m_{\text{сух. листа}}) / m_{\text{свеж. листа}} \cdot 100\% [5].$$

Содержание свободного пролина определяли с помощью кислого нингидринового реактива по методу [6]. Содержание пролина выражали в мкмоль на 1 г свежей или сухой биомассы. Определение содержания меди и цинка проводили

по методу Голубкиной [7], окисляя ткани растений смесью концентрированных азотной и хлорной кислот. Содержание выражали в мкг металла / г сухой биомассы листа.

В экспериментах по определению содержания пролина, содержания металлов использовали среднюю выборку всех листьев, не считая семядольных. Все опыты проводили в трехкратной биологической повторности. Результаты обрабатывали статистически и выражали как среднюю арифметическую и ошибку репрезентативности среднего квадратического отклонения. Результаты экспериментов статистически обрабатывали с использованием программы Excel.

Результаты исследования. *Влияние тяжелых металлов на рост и накопление биомассы растений рапса.* В начале опыта сырая биомасса надземной части растений была примерно равна у обоих сортов растений (1,07 г у Вестара и 1,05 г у Подмосковного). В течение эксперимента растения контрольного варианта быстро росли, их сырая биомасса через 7 дней увеличивалась в 5 раз, а через 15 дней в 7 раз. Добавление CuSO_4 в концентрации 10, 25, 50 мкМ ингибировало накопление биомассы у обоих сортов (табл. 1), при этом различия между сортами при действии сульфата меди не наблюдались.

Таблица 1

Влияние CuSO_4 на биомассу растений рапса

Сорт рапса	Время воздействия (сут.)	Накопление надземной биомассы (г сырой массы / растение)			
		Концентрация CuSO_4 в растворе (мкМ)			
		0	10	25	50
Вестар	7	5,30 ± 0,60	4,10 ± 0,20	3,60 ± 0,60	1,66 ± 0,34
	15	7,44 ± 0,52	6,11 ± 0,22	4,43 ± 0,46	2,20 ± 0,16
Подмосковный	7	5,30 ± 0,30	3,90 ± 0,22	3,50 ± 0,10	1,55 ± 0,02
	15	7,48 ± 0,80	6,00 ± 0,20	4,33 ± 0,36	2,11 ± 0,12

Результаты изучения действия сульфата цинка на накопление сырой биомассы представлены в табл. 2, из которой видно, что ингибирующий эффект используемых концентраций этой соли на накопление биомассы выражен был значительно меньше, чем действие сульфата меди. Прирост биомассы растений обоих сортов рапса уменьшился не более чем на $\frac{1}{3}$ даже при максимальной концентрации цинка — 500 мкМ. При этом можно видеть, что на оба сорта рапса такие концентрации сульфата цинка действуют почти одинаково.

Таблица 2

Влияние ZnSO_4 на биомассу растений рапса

Сорт рапса	Время воздействия (сут.)	Накопление надземной биомассы (г сырой массы / растение)			
		Концентрация ZnSO_4 в растворе (мкМ)			
		0	100	250	500
Вестар	7	5,30 ± 0,60	4,88 ± 0,02	4,50 ± 0,16	4,22 ± 0,04
	15	7,44 ± 0,52	6,80 ± 0,12	6,50 ± 0,64	6,12 ± 0,08
Подмосковный	7	5,30 ± 0,30	4,70 ± 0,40	4,44 ± 0,02	4,00 ± 0,20
	15	7,44 ± 0,8	6,70 ± 0,20	6,60 ± 0,10	6,00 ± 0,20

Измерение оводненности растений. Под воздействием солей металлов, добавленных в питательный раствор, менялась оводненность листьев растений (табл. 3), которая уменьшалась у обоих сортов в зависимости от концентрации соли в растворе и от времени выращивания растений на среде с повышенным содержанием солей, при этом различий между сортами не наблюдали.

Таблица 3

Влияние солей металлов на оводненность растений рапса

Сорт рапса	Время воздействия (сут.)	Содержание воды в надземной биомассе (%)						
		Концентрация соли в растворе (мкМ)						
		0	ZnSO ₄			CuSO ₄		
			100	250	500	10	25	50
Вестар	7	93	93	90	88	91	90	90
	15	93	92	90	87	90	88	87
Подмосковный	7	92	92	90	87	90	89	89
	15	92	92	90	87	89	88	87

Измерение содержания свободного пролина. Известно, что в ответ на воздействие различных стрессорных факторов, и в частности тяжелых металлов, в растениях происходит накопление свободного пролина. Добавление в питательный раствор различных количеств сульфатов меди и цинка приводило к изменению содержания пролина в листовой ткани растений. Результаты представлены в табл. 4 и 5.

Таблица 4

Влияние CuSO₄ на аккумуляцию пролина в листьях рапса

Сорт рапса	Время воздействия (сут.)	Содержание пролина в листовой ткани (мкмоль/г сухой массы)			
		Концентрация CuSO ₄ в растворе (мкМ)			
		0	10	25	50
Вестар	7	6,6 ± 0,4	15,4 ± 1,8	25,5 ± 3,1	50,6 ± 5,4
	15	11,2 ± 1,2	30,5 ± 3,2	55,4 ± 5,2	120,3 ± 9,2
Подмосковный	7	7,6 ± 0,7	18,5 ± 1,7	30,5 ± 4,4	60,4 ± 7,3
	15	12,4 ± 1,2	40,5 ± 5,4	63,2 ± 6,4	150,3 ± 14,5

Таблица 5

Влияние ZnSO₄ на аккумуляцию пролина в листьях рапса

Сорт рапса	Время воздействия (сут.)	Содержание пролина в листовой ткани (мкмоль/г сухой массы)			
		Концентрация ZnSO ₄ в растворе (мкМ)			
		0	100	250	500
Вестар	7	8,2 ± 0,8	12,2 ± 1,2	14,3 ± 1,4	12,1 ± 1,2
	15	12,1 ± 1,2	13,4 ± 1,3	16,5 ± 1,4	14,3 ± 1,5
Подмосковный	7	7,3 ± 0,6	11,8 ± 1,2	13,4 ± 1,4	11,5 ± 1,1
	15	11,2 ± 1,2	12,3 ± 1,3	14,5 ± 1,5	13,6 ± 1,2

В контрольных растениях уровень пролина составлял до начала опыта 3,7 мкмоль у сорта Вестар и 4,2 мкмоль у сорта Подмосковный, увеличиваясь к 7-м суткам до 6,6 (Вестар) и 7,6 (Подмосковный) и к 15-м суткам — до 11,2 и 12,4 мкмоль/г сухой биомассы соответственно. Добавление 10 мкМ CuSO_4 вызывало значительное увеличение содержания пролина, которое относительно контрольных значений возрастало через 7 суток в 2,5 раза и через 15 суток — в 2,8 и 3,4 раза. Добавление 25 мкМ CuSO_4 вызывало увеличение содержания пролина у растений рапса сорта Вестар приблизительно в 4 раза (7 сут.) и в 5 раз (15 сут.), для Подмосковного превышение было в 4 раз (7 сут.) и в 5 раз (15 сут.), а 50 мкМ CuSO_4 увеличивали количество пролина примерно в 8 раз у обоих сортов (7 сут.).

Добавление к питательной среде ZnSO_4 вызывало незначительное увеличение содержания пролина в растениях обоих сортов. Например, воздействие в течение 7 суток сульфата цинка в концентрациях 100, 250 и 500 мкМ обусловило количество пролина в листьях на уровне 11,5 и 14,5 мкмоль/г сухой массы (см. табл. 5). Использованные концентрации цинка не вызывали существенного накопления пролина в тканях листа даже при воздействии в течение 15 суток.

Аккумуляция ТМ в листьях растений рапса. Растущие на стандартной среде растения рапса сорта Вестар содержали 6,4 мкг (7 сут.) и 8,4 мкг (15 сут.) меди в грамме сухих тканей листа, а растения сорта Подмосковный — 8,4 мкг (7 сут.) и 13,1 мкг (15 сут.) меди в грамме сухих тканей листа. При добавлении 10 мкМ CuSO_4 содержание меди через 7 суток превышало показатели контрольных растений в 2,6 раза, а через 15 суток количество меди в листьях растений превышало эти показатели в 4 раза у Вестара и в 2 раза у Подмосковного (табл. 6). При увеличении концентрации CuSO_4 до 25 мкМ содержание меди в листьях через 7 суток составляло 25 и 30,8 мкг меди, что в 4 и 3,6 раза превышало контроль. На 15-е сутки в листьях рапса накапливалось в 3,8 и 5 раз больше меди, чем в контроле. При дальнейшем повышении концентрации меди до 50 мкМ количество металла еще увеличивалось и через 7 и 15 суток превышало контрольные показатели более чем в 5 раз у обоих сортов.

Таблица 6

Влияние CuSO_4 на содержание меди в листьях рапса

Сорт рапса	Время воздействия (сут.)	Содержание Cu в листовой ткани (мкг металла / г сухой массы ткани листа)			
		Концентрация CuSO_4 в растворе (мкМ)			
		0	10	25	50
Вестар	7	6,4 ± 0,4	16,7 ± 1,3	25,0 ± 2,1	33,7 ± 3,1
	15	8,4 ± 0,7	34,3 ± 2,9	42,9 ± 3,5	43,4 ± 3,7
Подмосковный	7	8,4 ± 0,6	21,9 ± 2,1	30,8 ± 2,9	42,5 ± 3,8
	15	13,1 ± 0,9	27,0 ± 2,1	50,2 ± 4,6	71,9 ± 6,4

При определении содержания Zn^{+2} (табл. 7) было выяснено, что в растениях до начала опыта его содержание составляло 15,1 и 9,4 мкг/г сухой массы листа сортов Вестар и Подмосковный соответственно. На стандартной среде его ко-

личество увеличилось через 7 сут. в 2 раза и через 15 сут. — в 4 раза у Вестара и в 3 раза и в 6 раз у Подмосковного. При внесении 100 мкМ ZnSO₄ количество металла через 7 и 15 суток превышало его содержание по сравнению с контрольными растениями почти в 2 (Вестар) и в 4 и 3 раза (Подмосковный). При возрастании концентрации ZnSO₄ до 250 мкМ содержание металла у растений сорта Вестар превышало показатели растений, содержащихся на стандартной среде, приблизительно в 2,6 раза, тогда как для Подмосковного накопление металла превышало количество в контрольных растениях в 6 раз (7 сут.) и 5,5 раз (15 сут.). При добавлении 500 мкМ ZnSO₄ количество металла увеличивалось почти в 6 раз (15 сут.) в растениях сорта Вестар и в 8 раз в растениях Подмосковного.

Таблица 7

Влияние ZnSO₄ на содержание цинка в листьях рапса

Сорт рапса	Время воздействия (сут.)	Содержание Zn в листовой ткани (мкг металла / г сухой массы ткани листа)			
		Концентрация ZnSO ₄ в растворе (мкМ)			
		0	100	250	500
Вестар	7	33,2 ± 2,8	58,2 ± 5,1	86,7 ± 7,6	187,9 ± 15,3
	15	60,7 ± 5,4	131,5 ± 12,1	158,5 ± 14,2	350,3 ± 26,2
Подмосковный	7	18,2 ± 1,4	84,0 ± 7,4	111,1 ± 9,7	209,5 ± 18,2
	15	53,8 ± 4,3	151,6 ± 13,2	291,8 ± 20,2	419,6 ± 20,3

Однако при пересчете содержания металла на сухую биомассу надземной части одного растения (см. рис.) видно, что CuSO₄ в концентрации выше 25 мкМ ингибировал поглощение меди у обоих сортов растений (рис., А). При этом растения сорта Подмосковный отличались большим накоплением меди.

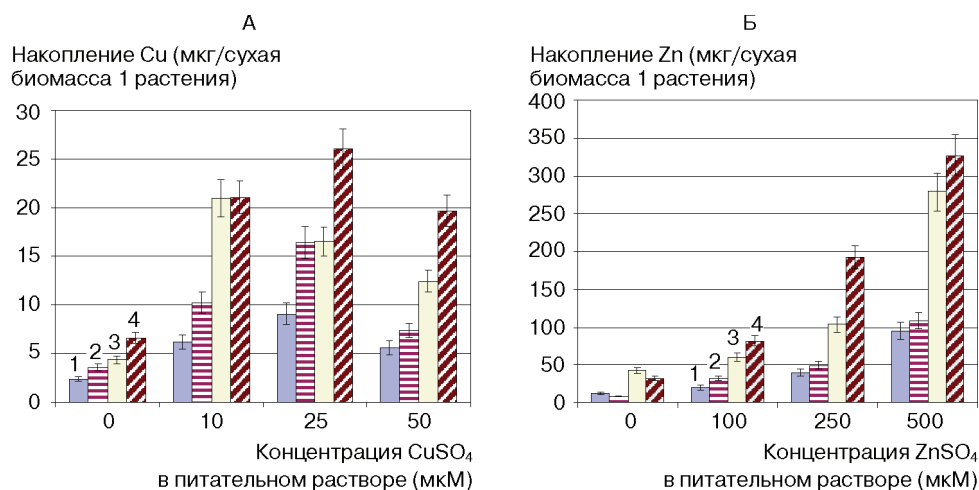


Рис. Накопление ионов металлов в надземной части растений рапса в зависимости от повышенной концентрации солей в питательном растворе:

А — Cu⁺², Б — Zn⁺²; содержание металла в сухой биомассе растения сорта:
1 — Вестар через 7 суток, 2 — Подмосковный через 7 суток, 3 — Вестар через 15 суток, 4 — Подмосковный через 15 суток

Пересчет содержания цинка на ткань надземной части одного растения (рис., Б) показал, что повышенные концентрации $ZnSO_4$ поглощение металла не ингибировали. При этом аккумуляция цинка зависела от продолжительности экспозиции — содержание металла в 7-суточных растениях было значительно меньше, чем в 15-суточных. Имелось незначительное различие поглощения цинка между сортами: растения сорта Подмосковный в среднем диапазоне концентраций накапливали Zn больше, чем растения сорта Вестар.

Обсуждение результатов. Для фиторемедиации загрязненных тяжелыми металлами почв используют растения, обладающие способностью поглощать металлы из почвы, что связано со способностью металла транспортироваться по растению, и накапливающие большую биомассу несмотря на ингибирующее действие солей металлов на их рост. Одним из видов растений, подходящих для фиторемедиации, является, по мнению ряда исследователей, рапс, который, обладая достаточно высокой устойчивостью к ТМ, имеет хорошо развитую надземную часть с большой биомассой [8; 10].

Растения рапса сорта Вестар, по мнению ряда исследователей [11; 12], имеют высокую устойчивость к ТМ и, следовательно, хорошо развитую надземную биомассу, которая делает его очень перспективным для фиторемедиации. Растения сорта Подмосковный ранее с этой точки зрения не изучались.

В ответ на стрессовое воздействие металлов растения реагировали снижением биомассы их надземной части (см. табл. 1, 2), небольшим изменением оводненности тканей растений (см. табл. 3) и накоплением пролина (см. табл. 4, 5). При этом $CuSO_4$ обладал более сильным ингибирующим воздействием, чем $ZnSO_4$, что совпадает с данными других исследователей, изучавших действие солей этих металлов [13; 14].

Значительное накопление пролина происходило в наших опытах только под воздействием повышенных концентраций $CuSO_4$ с большим значением у растений сорта Подмосковный (см. табл. 4). Ионы цинка вызывали значительно меньший эффект. Похожие результаты были получены в работе Радионова и др. [11] для растений рапса сорта Вестар. Вполне вероятно, что при стрессовом воздействии ионов цинка в защитное действие вместо пролина вступают какие-то другие механизмы.

Накопление в ткани растений ионов металлов зависело от концентрации их в питательном растворе, времени экспозиции и сорта растений (см. табл. 6, 7). С увеличением концентрации солей количество накопленного в растениях металла возрастало, увеличивалось оно также при удлинении времени экспозиции. При этом аккумуляция цинка была выше у обоих сортов, чем аккумуляция меди. Это согласуется с тем фактом, что растения семейства *Brassicaceae* являются гипераккумуляторами цинка [9; 11].

При сравнении двух сортов по содержанию металла в надземной биомассе одного растения (см. рис., А, Б) можно видеть, что их накапливали оба сорта. Однако увеличение концентрации меди свыше 25 мкМ ингибировало аккумуляцию

металла в растениях обоих сортов (см. рис., А), тогда как цинк аккумулировался с увеличением его концентрации в растворе. Известно, что растения выработали несколько механизмов поглощения любого питательного вещества в условиях недостатка в почве и могут также ограничивать поглощение некоторых элементов при их высоких концентрациях [15].

Результаты, полученные в этом исследовании, позволили выявить разницу в поведении двух сортов рапса по реакции на стресс, создаваемый ТМ. Однако оба исследованных сорта оказались эффективны в фитоэкстракции ТМ из питательного раствора, поскольку оба показали значительное увеличение накопления Zn и Cu в надземной части растений. Таким образом, оба испытанных нами сорта могут быть использованы в целях фиторемедиации, при этом по возможности следует отдавать предпочтение сорту Подмосковный.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Кузнецов Вл.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений. — М: Высшая школа, 2006.
- [2] Brooks R.R. Copper and cobalt uptake by *Naumianastrum* species // *Plant Soil*. — 1977. — V. 48. — P. 541—544.
- [3] Chaney R.L., Malik M., Li Y.M., Brown S.L., Brewer E.P., Angle J.S., Baker A.J.M. Phytoremediation of Soil Metals // *Current Opinions in Biotechnology*. — 1997. — V. 8. — P. 279—284.
- [4] Третьяков Н.Н., Карнаухова Т.В., Паничкин Л.А. Практикум по физиологии растений. — М.: Агропромиздат, 1990.
- [5] Пустовой И.В., Филли В.И., Корольков А.В. Практикум по агрохимии. — М.: Колос, 1995.
- [6] Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // *Plant and Soil*. — 1973. — V. 39. — P. 205—207.
- [7] Голубкина Н.А. Флуорометрический метод определения селена // *Журнал аналитической химии*. — 1995. — V. 50. — P. 492—497.
- [8] Ghnaya A.B., Charles G., Hourmant A., Hamida J B., Branchard M. Physiological Behaviour of Four Rapeseed Cultivar (*Brassica napus L.*) Submitted to Metal Stress // *C. R. Biol.* — 2009. — V. 332. — P. 363—370.
- [9] Ebbs S.D., Kochian L.V. Toxicity of Zinc and Copper to Brassica Species: Implications for Phytoremediation // *J. Environ. Qual.* — 1997. — V. 26. — P. 776—781.
- [10] Purakayastha T.J., Viswanath T., Bhadraray S., Chhonkar P.K., Adhikari P.P., Suribabu K. Phytoextraction of Zinc, Copper, Nickel and Lead from a Contaminated Soil by Different Species of Brassica // *International J of Phytoremediation*. — 2008. — V. 10. — P. 61—72.
- [11] Радионов Н.В., Волков К.С., Холодова В.П. Сравнительный анализ устойчивости растений рапса к повышенным концентрациям меди и цинка // *Вестник РУДН. Серия «Агронмия и животноводство»*. — 2007. — № 4. — С. 21—29.
- [12] Иванова Е.М., Холодова В.П., Кузнецов Вл.В. Биологические эффекты высоких концентраций солей меди и цинка и характер их взаимодействия в растениях рапса // *Физиология растений*. — 2010. — Т. 57. — С. 864—873.
- [13] Liu X., Gao Y., Duan S. K. G., Chen A. L., Zhao L., Liu L. Z., Wu X. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on contaminated sites and their potential accumulation capacity in Heqing, Yunnan // *Environmental Sciences*. — 2008. — V. 20. — P. 1469—1474.
- [14] Dushenkov V., Kumar P.B.A.N., Motto H., Raskin I. The use of plants to remove heavy metals from aqueous streams // *Env. Sci. Technol.* — 1995. — V. 29. — P. 1239—1245.
- [15] Кабата-Пендиас А. Проблемы современной биогеохимии микроэлементов // *Российский химический журнал*. — 2005. — Т. XLIX. — № 3. — P. 15—19.

**COMPARATIVE ANALYSIS OF STABILITY
OF 2 VARIETIES OF SPRINGRAPE (*BRASSICA NAPUS L.*)
TO THE EFFECT OF THE IONS COPPER AND ZINC**

**M.M. Maree¹, G.N. Raldugina²,
K.H. Alobaidi¹**

¹Department of botany, plant physiology and agrobiotechnology
Peoples' Friendship University of Russia
Miklucho-Maklay str., 8/2, Moscow, Russia, 117198

²Timirjazev Institute of Plant Physiology
Russian Academy of Science
Botanicheskaya str., 35, Moscow, Russia, 127276

The paper is devoted to the effects of higher concentrations of salts CuSO_4 and ZnSO_4 on several physiological parameters of two species of plants of spring rape (*Brassica napus L.*) — Westar and Podmoskovny. It is established that the copper salt had on the plants of both varieties stronger effect than zinc salts. Based on these data, it is concluded that rape especially grade Podmoskovny is more effective for the removal of nutrient substrat of zinc ions than copper ions.

Key words: *Brassica napus*, Westar, Podmoskovny, phytoremediation, zink, copper, proline.