

УДК 581.1(04)

ИНДУЦИРОВАННЫЙ СВИНЦОМ УМЕРЕННЫЙ БИОЛОГИЧЕСКИЙ СТРЕСС ПРОРОСТКОВ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ(*TRITICUMAESTIVUM*L.)

Л.Р. Берников

ФГБОУ ВПО «Калининградский государственный технический университет»,
236022, Россия, г. Калининград, Советский проспект, 1
E-mail: bernikovy@gmail.com

Изучено действие умеренных концентраций ионов свинца на физиолого-биохимические показатели листовых пластинок первых настоящих листьев проростков яровой пшеницы (*Triticumaestivum* L.) с целью анализа биологического стресса с использованием следующих маркеров: уровень выхода электролитов через клеточные мембраны и фотосинтетических пигментов, флуоресценция хлорофилла в листьях, содержание свободного пролина. Показано наличие стрессовых изменений, начиная с концентрации Pb^{2+} 0,03 мг/л, продемонстрировано переключение фаз стресса. Обнаружены явления преобладания антистрессовых процессов над токсическим действием стрессора при 0,03 мг/л ионов свинца, стрессового ответа без снижения пула фотосинтетических пигментов, активации ряда процессов при минимальных концентрациях поллютанта. Результаты обсуждаются с точки зрения целесообразности подходов к дальнейшему изучению биологического стресса, индуцируемого свинцом.

Triticumaestivum, проростки, свинец, биологический стресс

ВВЕДЕНИЕ

В связи со все обостряющимся техногенным загрязнением биосферы тема биологического стресса является самой упоминаемой в литературных источниках по физиологии растений [1-9]. Множество работ посвящается действию одного из наиболее распространенных и опасных поллютантов – тяжелым металлам. Тем не менее данные этих исследований, в частности по свинцу, достаточно однотипны и фактически сводятся к констатации очевидной токсичности загрязнителей. Естественно, ничего выходящего за границы банального данные работы предоставить не в состоянии.

Наша лаборатория в течение трех лет изучала модельную систему биологического стресса проростков пшеницы (*Triticumaestivum*L.), индуцированного свинцом в условиях вегетационного опыта [5, 6]. В отличие от подавляющего большинства подобных физиологических исследований, направленных на создание условий эффективного биологического стресса, мы использовали умеренные, встречающиеся в естественных условиях [10], концентрации тяжелого металла (до 1 мг/л). Нами обнаружено, что в этих условиях свинец заметно воздействует на рост, развитие и водный обмен растений, вызывая, однако, изменения лишь невысокой интенсивности [5, 6]. В данной работе автор подверг исследуемую систему анализу, используя общепризнанные критерии оценки биологического стресса растений. Полученные данные не только дали возможность охарактеризовать в общих чертах явление биологического стресса в данных условиях, но и проде-

монстрировали особую содержательность результатов при использовании именно умеренных концентраций ионов свинца.

МЕТОДЫ

Растительный материал. Использовали листовые пластинки первыхнастоящих листьев 10-11-дневных проростков яровой пшеницы (*Triticumaestivum*L.) сорта «Эстер» (урожай 2011 г.), выращенных на питьевой воде «Sovlit» (ООО«Совлит», г. Советск, Россия) с добавлением $Pb(NO_3)_2$ в дозах, необходимых для достижения концентраций Pb^{2+} 0,01-1,00 мг/л. Контрольные растения выращивали без добавления свинца. Интенсивность освещения составляла 70 Вт/м² ФАР (лампы ЛД-20), температура воздуха была естественной и изменялась в диапазоне 20-25° С.

Морфологические исследования. У полученных 10-дневных проростков измеряли длину и площадь (по формуле: $S = \frac{2}{3} * l * d$; где S – площадь, l – длина, d – ширина листовой пластинки) листовой пластинки первогонастоящего листа.

Выход электролитов через клеточные мембраны оценивали у 10-дневных проростков, согласно [11], с использованием для кондуктометрических измерений портативногомультипараметрового прибораMultiLineP3 (WTW, Германия). Для анализа стрессовых изменений использовали процент выхода электролитов, а также коэффициент поврежденности мембран – показатель, предложенный в [11]:

$$k = (L_o - L_k) / (100\% - L_k) * 100\%, (1)$$

где L_o – выраженный в процентах выход электролитов в опытном; L_k – в контрольном образцах.

Содержание фотосинтетических пигментов оценивали в 10-дневных проростках в ацетоновом экстракте при длинах волн 470, 645 и 662 нм, по [12], на спектрофотометре UNICO модель 2100, США.

Флуоресценцию хлорофилла регистрировали в квазистационарной фазе на нативных листьях 11-дневных проростков с помощью однолучевого флуориметра (спектрофлуориметр «Панорама-92-С-Э», Россия) при длине волны 684 нм. Длина волны возбуждающего света – 480нм.

Определение свободногопролина. Растительный материал из 10-дневных проростков фиксировали горячим этанолом. Экстракциюпролина проводили методом водной экстракции аминокислот по [13], а его количественное определение – с нингидриновым реактивом спектрофотометрически (спектрофотометр UNICO модель 2100, США) при длине волны 520 нм, согласно [7].

Биологическая повторность опытов – трехкратная (за исключением морфологических измерений, проводившихся параллельно с другими экспериментами и, таким образом, не исключавших большую повторность).

Рисунки выполнены в полулогарифмической шкале, за исключением точки 0,00 мг/л Pb^{2+} , вынесенной в начало координат.

Результаты обработаны статистически. **Достоверность всех выводов о формеполученных графиков апробирована вероятностным моделированием парных сравнений по Терстоуну-Мостеллеру.** На рис. 1-5 представлены средние арифметические значения и их стандартные отклонения.

Представленные значения являются результатом анализа средней пробы большого количества листьев.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В нашей экспериментальной модели свинец вызывал **изменения длины** (рис. 1) листовой пластинки первых настоящих листьев проростков, правда, не более чем на 10 %. Для этой характеристики мы зарегистрировали падение вплоть до 0,03 мг/л Pb^{2+} с плечом при 0,01 мг/л, максимум при 0,10 мг при большем содержании в воде тяжелого металла – дальнейшее снижение.

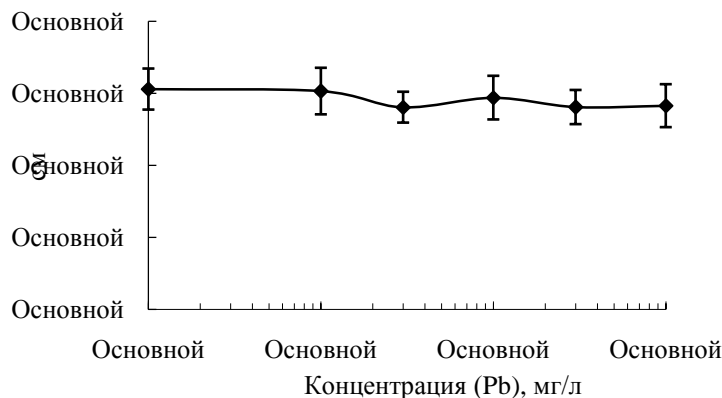


Рис. 1. Концентрационная зависимость влияния свинца на длину листовых пластинок первых настоящих листьев проростков яровой пшеницы
Fig. 1. Concentration dependence of lead influence on length of the 1st true leaves

Анализ **выхода электролитов через клеточные мембраны** (см. рис. 2) выявил небольшие стрессовые изменения ($k \leq 2,5$ %, см. рис. 2, б). Мы зарегистрировали характерный максимум измеренных показателей при концентрации свинца 0,03 мг/л и возрастание, начиная с 1,00 мг/л (см. рис. 2).

Определение **содержания фотосинтетических пигментов** не выявило статистически достоверной динамики зависимости содержания хлорофилла *a* и каротиноидов (данные не приведены) от концентрации Pb^{2+} . Что же касается хлорофилла *b*, то его содержание на единицу площади поверхности листа претерпевало максимум при минимальных значениях (0,01-0,10 мг/л) исследуемого диапазона концентраций свинца (см. рис. 4).

Полученная кривая **флуоресценции хлорофилла** первых настоящих листьев оказалась аналогичной графику динамики уровня выхода электролитов (см. рис. 3). При этом, как указано выше, содержание хлорофилла *b* (который содержится только во II светособирающем комплексе и, в основном, вызывает измеряемую флуоресценцию [14]) в единице поверхности листа претерпевало при 0,03 мг/л гораздо менее существенное (около 10 %) возрастание, а при 1,00 мг/л мало отличалось от такового в контроле (см. рис. 4). Таким образом, рост флуоресценции в обоих случаях не мог быть объяснен исключительно изменением концентрации хромофора.

Наибольший уровень **свободного пролина** выявлен в контрольном варианте. Минимальные дозы свинца приводили к его заметному падению, при дальнейшем повышении концентрации Pb^{2+} возникал четкий максимум, соответствующий 0,10 мг/л (см. рис. 5).

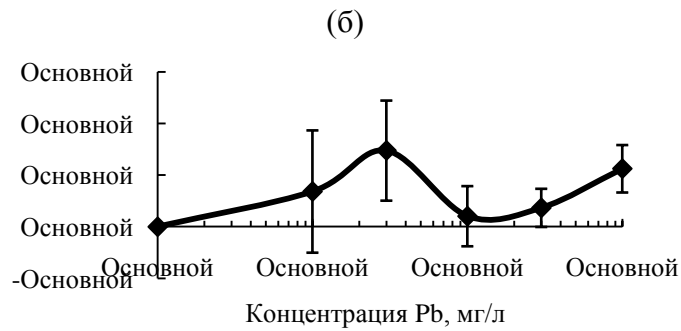
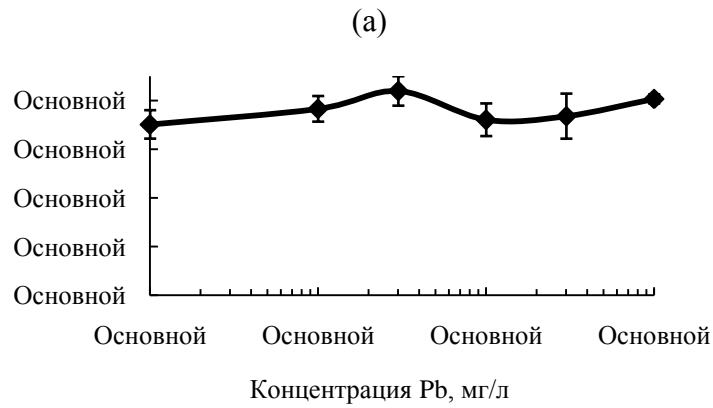


Рис. 2. Концентрационная зависимость влияния свинца на выход электролитов через клеточные мембраны (а) и коэффициент повреждения плазмалеммы (б) для листовых пластинок первых настоящих листьев проростков яровой пшеницы
 Fig. 2. Concentration dependence of lead influence on electrolytes yield (a) and k value (б) for the 1st true leaves

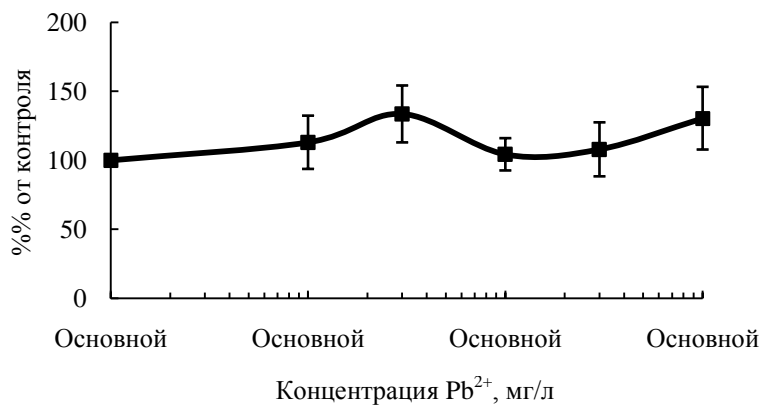


Рис. 3. Концентрационная зависимость влияния свинца на флуоресценцию хлорофилла в листовых пластинках первых настоящих листьев проростков яровой пшеницы
 Fig. 3. Concentration dependence of lead influence on chlorophyll fluorescence level in the 1st true leaves

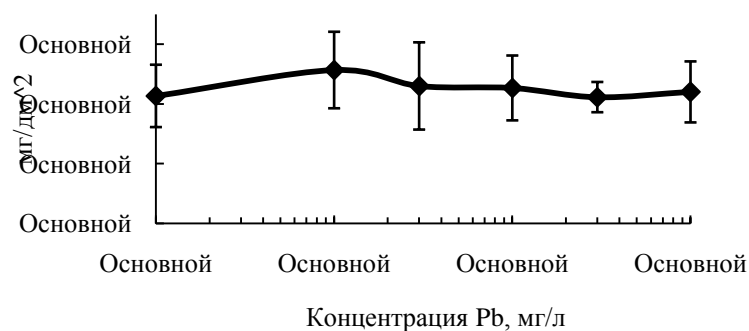


Рис. 4. Концентрационная зависимость влияния свинца на уровень хлорофилла b в единице поверхности листовых пластинок первых настоящих листьев проростков яровой пшеницы

Fig.4. Concentration dependence of lead influence on chlorophyll b level per surface unit in the 1st true leaves

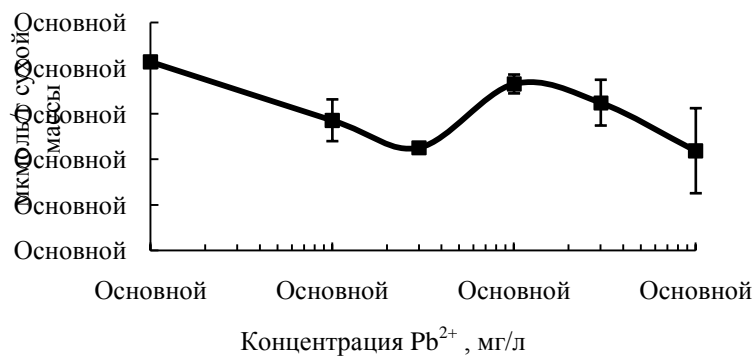


Рис. 5. Концентрационная зависимость влияния свинца на содержание свободного пролина в листовых пластинках первых настоящих листьев проростков яровой пшеницы

Fig.5. Concentration dependence of lead influence on free proline level in the 1st true leaves

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как известно, при взаимодействии с повреждающим фактором организм сначала претерпевает фазу стресс-реакции, при которой включаются имеющиеся в норме механизмы непосредственного ответа. Следующая фаза – специализированная адаптация – включает уже экспрессию ранее молчавших генов и синтез белков *denovo*[3]. Процесс смены этих стадий малоизучен.

Метод изучения выхода электролитов через клеточные мембраны оценивает повреждение плазмалеммы, наблюдающееся при любом виде биологического стресса клеток[1, 2, 11]. Предложенный в [11] коэффициент поврежденности мембран (k)[11] близко отражает процент мембранной поверхности, претерпевший деградацию в результате стресса. В представленном случае указанная величина была небольшая (в среднем, до 1,5 %, см. рис. 2, б); за достижением этого уровня при 0,03 мг/л ионов свинца наступал спад (см. рис. 2, б). Очевидно, это объясня-

ется наступлением фазы специализированной адаптации, при которой происходит репарация мембран. Существенно, что при этом процессы адаптации преобладают над токсическим действием стрессора. Далее показатель вновь рос (см. рис. 2), что свидетельствует о критическом углублении стресса.

Известно, что 90% флуоресценции хлорофилла интактного растения приходится на излучение света с длиной волны около 680 нм фотосистемой II (ФС II), причем флуоресценция в квазистационарной фазе F характеризует, в целом, степень поврежденности ФС II [14]. Методы оценки биологического стресса растений по измерению выхода электролитов через мембраны клеток и по флуоресценции хлорофилла нативных листьев объединяет то обстоятельство, что в обоих случаях принимается во внимание непосредственное повреждение растения, а не ответ на него. Несмотря на различие мишеней стрессового повреждения, которые подвергаются анализу в данных случаях, мы получили очень близкие кривые измеряемых показателей (см. рис. 2, 3). Таким образом, по-видимому, выводы относительно чередования фаз биологического стресса, сделанные выше, справедливы и для повреждения ФС II.

В то же время, при добавлении свинца мы не зарегистрировали статистически достоверного снижения содержания хлорофиллов. Более того, неизменным оставался уровень каротиноидов. Последние также являются одними из важнейших антиоксидантов [1, 2]. Следовательно, изменений, связанных с окислительным стрессом (при котором затрагивался бы пул каротиноидов), в данных опытах мы не обнаружили. Такое состояние растений при стрессе, индуцированном тяжелыми металлами, малоисследованно. Впрочем, плазмалемма в данном случае повреждалась (см. выше), и одной из причин этого могла быть все же избыточная генерация активных форм кислорода.

Эндогенное накопление свободного пролина является достаточно универсальной характеристикой обеих фаз биологического стресса [3]. В рассматриваемых условиях максимум графика зависимости его уровня от концентрации Pb^{2+} мы наблюдали при 0,10 мг/л (рис. 5), что всего в 3 раза больше концентрации, соответствующей фазе стресс-реакции (0,03 мг/л Pb^{2+}). Таким образом, начало накопления повреждений в плазмалемме и фотосинтетическом аппарате коррелирует с динамикой стрессового ответа, связанного с накоплением свободного пролина. Подъема уровня свободного пролина при концентрации Pb^{2+} , соответствующей I фазе биологического стресса (0,03 мг/л ионов свинца), мы не обнаружили. Наиболее вероятной причиной снижения содержания свободного пролина, начиная с контрольного образца, является необходимость растения в свинце (отсутствующем в контроле) в качестве микроэлемента, поскольку при минимальных концентрациях стрессора наблюдался рост уровня хлорофилла *b* (см. рис. 4) и нередко – увеличение размеров листьев.

Обнаруженные ростовые изменения коррелировали с зарегистрированными показателями стрессовой реакции (ср. рис. 1-3), однако изменения роста листа не превышали 10 % вплоть до более чем 30-кратных концентраций стрессора (см. рис. 1). Существенно, что исследования биологического стресса растений, индуцированного свинцом, как правило, были проведены при концентрациях ионов тяжелого металла не ниже 0,3-1,0 мг/л [1, 4, 8, 9], когда наблюдались отчетливые признаки реперного показателя – ингибирования роста. Однако, согласно приведенным в данной работе результатам, сопротивляемость растений при этом уже

не компенсирует стрессовые повреждения, поэтому информативность исследований критически снижается. Напротив, разнообразие биотических процессов мы наблюдали именно при умеренных концентрациях стрессора, хотя окончательные выводы будут правомерны только в случае воспроизведения данных результатов в системе с фотопериодом, так как постоянное освещение могло усугублять биологический стресс и приводить к более низкому порогу наблюдаемых процессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты продемонстрировали очевидный интерес применения умеренных нагрузок свинцом для наиболее полного изучения биологического стресса. В частности, мы наблюдали следующие процессы, которые прежде неминуемо выпадали из поля зрения исследователей:

1. Переключение двух фаз биологического стресса.
2. Явление преобладания антистрессовых процессов над токсическим действием стрессора при 0,03 мг/л ионов свинца.
3. Стрессовый ответ без изменения пула фотосинтетических пигментов, в том числе, каротиноидов.
4. Активация ряда процессов при минимальных концентрациях поллютанта.

В то же время, в целях получения надежных и содержательных результатов дальнейшие исследования требуется вести в экспериментальной модели с чередованием световой и темновой фаз.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Кошкин, Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур: учебник / Е.И. Кошкин. – М.: Дрофа, 2010. – 638 с.
2. Кузнецов, Вл.В. Физиология растений / Вл.В. Кузнецов, Н.Д. Дмитриева. – изд. 2-е, перераб. и доп. – М.: ФГУП «Издательство «Высшая школа», 2006. – 742 с.
3. Кузнецов Вл.В. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция / Вл.В. Кузнецов, Н.И. Шевякова // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 2. – С. 321-336.
4. Серегин, И. В. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения / И.В. Серегин, В.Б. Иванов // Физиология растений. – 2001. – Т. 48, № 4. – С. 606-630.
5. Роньжина, Е.С. Действие свинца на ранние этапы онтогенеза пшеницы (*Triticum aestivum* L.) / Е.С. Роньжина, Л.Р. Берников // Инновации в науке и образовании-2009: междунар. науч. конф. (20-22 окт.): в 2-х ч. / КГТУ. – Калининград. Изд-во ФГОУ ВПО «КГТУ», 2009. – Ч. 1. – С. 143-144.
6. Роньжина, Е.С. Действие свинца на водный обмен растений пшеницы (*Triticum aestivum* L.) на ранних этапах онтогенеза / Е.С. Роньжина, Л.Р. Берников, Н.Н. Сорокина // Известия КГТУ. – 2011. – № 22. – С. 232-238.
7. Bates, L.S. Rapid determination of free proline for water-stress studies / L.S. Bates, R.P. Waldren, J.D. Teare // Plant and Soil. – 1973. – V. 39. – № 1. – P. 205.

8. Титов, А.Ф. Влияние ионов свинца на рост проростков пшеницы, ячменя и огурца / А.Ф. Титов [и др.]. // Физиология растений. – 1995. – Т. 42, № 3. – С. 457-462.
9. Башмаков, Д.И. Влияние синтетического регулятора роста цитодефи тяжелых металлов на окислительный статус растений огурца / Д.И. Башмаков[и др.] // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 1. – С. 67-73.
10. Зенин, А.А. Гидрохимический словарь / А.А. Зенин, Н.В. Белоусова. – Л.: Гидрометеиздат, 1988. – 240 с.
11. Малый практикум по физиологии растений: учеб.пособ / под ред. А.Т. Мокроносова. – 9-е изд., перераб и доп. – М.: МГУ, 1994. – 184 с.
12. Lichtenthaler, H.K. Determination of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf in different solvents / H.K. Lichtenthaler, A.R. Wellburn // Biol. Soc. Trans. – 1985. – V. 11. – P. 591-592.
13. Калинкина, Л.Г. Модифицированный метод выделения свободных аминокислот для определения на аминокислотном анализаторе / Л.Г. Калинкина, Л.В. Назаренко, Е.Е. Гордеева // Физиология растений. – 1990. – Т. 37, вып. 3. – С. 617-621.
14. Корнеев, Д.Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла / Д.Ю. Корнеев – К.: «Альтерпрес», 2002. – 188 с.

LEAD-INDUCED MODERATE BIOLOGICAL STRESS OF WHEAT
(*Triticum aestivum* L.) SEEDLINGS

L. R. Bernikov

Action of moderate Pb^{2+} concentrations on physiologo-biochemical values of the 1st true leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings using markers of general use was explored. Stress changings from 0,03 mg/l Pb^{2+} concentration and the switching of stress phases were demonstrated. Phenomena of predominance of anti-stress processes over toxic pollutant action, of stress answer without changes of photosynthetic pigments levels and of activation of some processes at minimal Pb^{2+} concentrations were found. Observed processes are discussing concerning with advisability of approaches for further researches of the lead-induced biological stress.

Triticum aestivum, seedlings, lead, biological stress