

УДК 581.1:581.2.02

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ Pb^{2+} И ЭДТА НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ *PELARGONIUM ZONALE* L.

Д. И. Башмаков, Л. П. Акамова, К. А. Сазанова

Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева

В работе исследовано влияние ионов Pb^{2+} и ЭДТА на физиолого-биохимические параметры (рост осевых органов, площадь листа, металлоторерантность, скорость генерации супероксидного анион-радикала, интенсивность перекисного окисления липидов, активность аскорбат-пероксидазы) молодых растений *Pelargonium zonale* L. Результаты проведенной работы свидетельствуют, что ионы Pb^{2+} , в отличие от других металлов, в диапазоне изученных концентраций практически не влияли на растения *Pelargonium zonale*. Предобработка семян ЭДТА оказывала негативный эффект на рост и окислительный статус ювенильных растений пеларгонии, подвергнутых действию ионов Pb^{2+} .

Ключевые слова : *Pelargonium zonale* L., предобработка семян, ЭДТА, индекс толерантности, свинец, супероксидный анион-радикал, перекисное окисление липидов, аскорбат-пероксидаза.

D. I. Bashmakov, L. P. Akamova, K. A. Sazanova. Pb^{2+} AND EDTA EFFECT ON PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS IN *PELARGONIUM ZONALE* L.

We studied Pb^{2+} and EDTA effects on the growth of axial organs, leaf area, metal tolerance, superoxide generation rate, LPO rate and APX activity in *Pelargonium zonale* L. seedlings. Within the investigated range of concentrations, ions of Pb^{2+} , unlike other metals, had practically no effect on *Pelargonium zonale* plants. Pretreatment of *Pelargonium zonale* seeds with EDTA negatively affected the growth parameters and oxidative status of young plants exposed to Pb^{2+} .

Key words : *Pelargonium zonale* L.; seed pretreatment, EDTA; index of tolerance; lead; superoxide anion; lipid peroxidation; ascorbate peroxidase.

Введение

Начало выплавки и использования свинца относится ко II тысячелетию до н. э., однако до начала XIX века свинцовая промышленность была развита слабо [Рынок руд...]. В настоящее время свинец входит в шестерку основных цветных металлов, по которым проводят торги на London Metal Exchange. По данным U. S. Geological Survey [2011], на 1 января 2011 года

общемировые запасы свинца составляли 75,9 млн тонн, или 0,26 % от общего объема запасов цветных металлов. Мировая добыча свинца в 2010 году составила 4,2 млн тонн (4 место после алюминия, меди и цинка). Вопреки тому, что свинец вытесняется в современных высокотехнологичных производствах пластмассами или другими металлами – оловом, цинком, алюминием, происходит ежегодный рост объемов добычи свинца на 6 %. Это сопровождается

ся увеличением его эмиссии в окружающую среду. В результате происходит интенсивное загрязнение свинцом почв и водных бассейнов, как на территориях, непосредственно прилегающих к районам добычи и переработки, так и далеко за их пределами [Callender, 2003]. Свинец надолго включается в биологические круговороты и способен аккумулироваться в растительном и животном организме, поэтому увеличение техногенной эмиссии в окружающую среду делает свинец одним из опасных загрязнителей биоты.

Свинец, как правило, обнаруживается в каждом растении, но не относится к эссенциальным элементам [Ильин, 1991]. В небольших количествах Pb^{2+} повышает содержание крахмала, ускоряет прорастание семян [Ягодин, 1989]. Но уже в концентрациях от 0,1 до 2,4 мМ свинец способен ингибировать активность фотосистемы II [Физиология растительных организмов..., 1989]. Pb^{2+} влияет на поглощение воды растением, ингибирует дыхание [Козаренко, 1987], биосинтез хлорофилла [Singh et al., 1996], минеральное питание [Malcová, Gryndler, 2003]. При действии Pb^{2+} снижается содержание хлорофилла и корневая активность [Li-hong et al., 2006]. Pb^{2+} нарушает транспорт калия и кальция через плазматические мембраны [Rucinska, Gwozdz, 2005], препятствует образованию веретена деления и нормальному прохождению митоза, индуцирует образование двудерных клеток [Jiang, Liu, 2000].

Известно, что самоочищение почв практически не происходит или скорость его чрезвычайно низка. Так, период полуудаления из почвы свинца составляет несколько тысяч лет [Лебедева, Фрумин]. Свинец не подвержен биодegradации [Saxena et al., 1999], поэтому растения являются наиболее важными природными компонентами в решении проблемы нейтрализации вредных воздействий индустриального производства. Их устойчивость и способность аккумулировать различные загрязнители определяют использование некоторых видов в фиторемедиации почв. Эта находящаяся на стадии становления и недорогая технология позволяет использовать растения для удаления, преобразования или стабилизации загрязняющих веществ, локализованных в воде, отложениях или почвах [McGrath, Zhao, 2003]. Некоторые виды, растущие на содержащих свинец почвах, выработали способность аккумулировать в своих тканях большие количества этого металла без проявления симптомов токсичности. Их предложено использовать для очистки загрязненных свинцом участков [Baker, Brooks, 1989]. В начале 1990-х гг. были проведены по-

левые опыты для проверки потенциальной фитоэкстракции металлов растениями-гипераккумуляторами [Brown et al., 1995]. По сравнению с неаккумулялирующими растениями концентрации металлов в растениях-гипераккумуляторах на 1–3 порядка выше. К гипераккумуляторам свинца относят тот или иной вид, если в его надземных или подземных органах аккумулируется свыше 1000 мкг/г (0,1 % сухой массы) этого металла [McGrath, 1998]. В мировой флоре насчитывают всего 5 видов-гипераккумуляторов свинца [Prasad, Freitas, 2006]. Самый распространенный среди них вид – пеларгония зональная (*Pelargonium zonale* L.).

Большую актуальность имеет разработка и внедрение способов повышения фиторемедиационной способности растений методами генной инженерии, чтобы придать быстро растущим неаккумулялирующим растениям некоторые свойства гипераккумуляторов [Chaney et al., 1997], или обработкой физиологически активными веществами для повышения экстрагирующей способности растений [Pierzynski, Schwab, 1993]. Искусственные хелаты типа этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) были проверены на повышение фитодоступности металлов и последующее поглощение и транслокацию в побеги [Прасад, 2009]. По данным ряда авторов, ЭДТА можно применять в качестве препарата, повышающего фитоэкстракцию свинца из загрязненных почв [Huang, Cunningham, 1996; Saxena et al., 1999; Автухович, 2005].

Исходя из вышесказанного, целью данной работы было изучение физиолого-биохимических параметров пеларгонии при действии тяжелых металлов и совместном действии ЭДТА и ионов Pb^{2+} .

Материалы и методы

Объект исследования. Молодые растения *Pelargonium zonale* L. (семейство Гераниевые – *Geraniaceae*). Эта декоративная культура появилась в Европе в начале XVIII века в результате многократных скрещиваний пеларгонии зональной с другими видами и формами. Высота растений колеблется от 30 до 120 см. Очень нетребовательна к условиям выращивания [Комнатные растения...].

Постановка эксперимента. 1. Влияние эквимолярных концентраций ТМ на растения пеларгонии. Перед посевом семена стерилизовали в растворе 13%-й H_2O_2 в 96%-м C_2H_5OH в течение 5 мин. После удаления стерилизующего раствора семена проращивали в чашках Петри (по 30 штук на чашку) в факторостатных условиях (освещенность около 80 мкМ фото-

нов/м²·с, фотопериод 14 ч, температура 21 °С) на растворах, содержащих 0 (контроль), 10, 100 и 1000 мкМ ионов Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺ или Pb²⁺ (концентрации подобраны в предварительных экспериментах и близки к физиологической, сублетальной и летальной соответственно). Использовали соли CuSO₄·5H₂O; ZnSO₄·7H₂O NiSO₄·7H₂O и Pb(NO₃)₂ квалификации чда. На 12-е сутки опыта у растений измеряли линейные размеры (длину корня и побегов).

2. Влияние ионов Pb²⁺ и ЭДТА на растения пеларгонии. Семена пеларгонии замачивали в растворе ЭДТА (10⁻² %) или дистиллированной воде (контроль) в течение 8 часов, затем их переносили на растворы, содержащие 10 мкМ или 1 мМ ионов Pb²⁺ (Pb(NO₃)₂). На 5, 8 и 12-е сутки измеряли линейные параметры растений пеларгонии, а также на 12-е сутки – площадь листа. На 10-е сутки опыта спектрофотометрическим методом определяли скорость генерации супероксидного анион-радикала, интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активность аскорбатпероксидазы (АПО) в листьях пеларгонии.

Для определения величины устойчивости растений рассчитывали индекс толерантности (ИТ) = длина корня в опыте / длина корня в контроле [Koornneeff et al., 1997].

Определение линейных размеров проростков и площади листа. Молодые растения сканировали с разрешением 800 dpi. Измерения длины органов проростков (главный корень, побег) с точностью до 0,1 мм, а также определение площади семядолей проводили в программе MapInfo Professional v. 11.

Скорость генерации супероксидного анион-радикала определяли по восстановлению адреналина в адренохром [Лукаткин, 2002а]. Высечки листьев (300 мг) гомогенизировали в 15 мл дистиллированной воды, затем гомогенат центрифугировали 15 мин при 4000 g. К 3 мл супернатанта добавляли 100 мкл 0,01%-го раствора адреналина и инкубировали 45 мин при комнатной температуре и освещенности 80 мкМ фотонов/м²·с. Сразу после инкубации измеряли оптическую плотность образовавшегося адренохрома против гомогената с водой на спектрофотометре UV-mini 1240 (Shimadzu, Япония) при длине волны 480 нм. Скорость генерации супероксида рассчитывали в мкМ/г·мин ($\epsilon = 4020 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Интенсивность ПОЛ в листьях оценивали по накоплению продукта окисления – малонового диальдегида (МДА) – по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [Лукаткин, Голованова, 1988]. Навеску листьев 0,3 г гомогенизировали в среде выделения (0,1 М фосфатный

буфер pH 7,6, содержащий 0,35 М NaCl). К 3 мл гомогената добавляли 2 мл 0,5 % ТБК в 20 % трихлоруксусной кислоте, инкубировали на кипящей водяной бане 30 мин, фильтровали и регистрировали оптическую плотность фильтрата на спектрофотометре UV-mini 1240 (Shimadzu, Япония) при длине волны 532 нм. Контролем служила среда выделения с реагентом. Концентрацию МДА рассчитывали по молярной экстинкции ($\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$); количество МДА, содержащегося в листьях, рассчитывали в мкМ МДА на 1 г сырой массы.

Активность АПО определяли по методике [Лукаткин, 2002б] с модификациями. Высечки листьев массой 1 г гомогенизировали в 10 мл 50 мМ фосфатного буфера (pH 7,6) с добавлением 0,3 г поливинилпирролидона (ПВП). Полученную смесь фильтровали и центрифугировали 10 мин при 8000 g.

Реакционная смесь состояла из 50 мкл 0,1 мМ ЭДТА, 300 мкл 0,05 мМ аскорбиновой кислоты, 50 мкл перекиси водорода, 2,55 мл фосфатного буфера (pH 7,6) и 50 мкл полученного при центрифугировании экстракта. Оптическую плотность регистрировали на спектрофотометре UV-mini 1240 (Shimadzu, Япония) при длине волны 290 нм.

Контролем служила следующая смесь: 2,75 мл фосфатного буфера (pH 7,6), 50 мкл ЭДТА, 50 мкл перекиси водорода, 150 мкл аскорбиновой кислоты (без ферментного экстракта).

При расчете активности АПО использовали снижение оптической плотности раствора за первые 30 с реакции с последующим расчетом активности с использованием коэффициента молярной экстинкции $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Повторности и статистическая обработка результатов. Все опыты проводили в трех повторностях. Каждый опыт состоял из двух-трех биологических повторностей (высечек листьев с 10–15 проростков), каждый вариант включал три аналитические повторности. Результаты обрабатывали статистически по общепринятым биометрическим формулам с использованием пакетов прикладных программ «Microsoft Excel 2010» и «Statistica v. 8». Существенность различий между вариантами оценивали по критерию Стьюдента при уровне значимости 95 %.

Результаты и обсуждение

Сравнительное действие эквимольных концентраций тяжелых металлов (ТМ) на рост побегов и корней пеларгонии приведено на рис. 1.

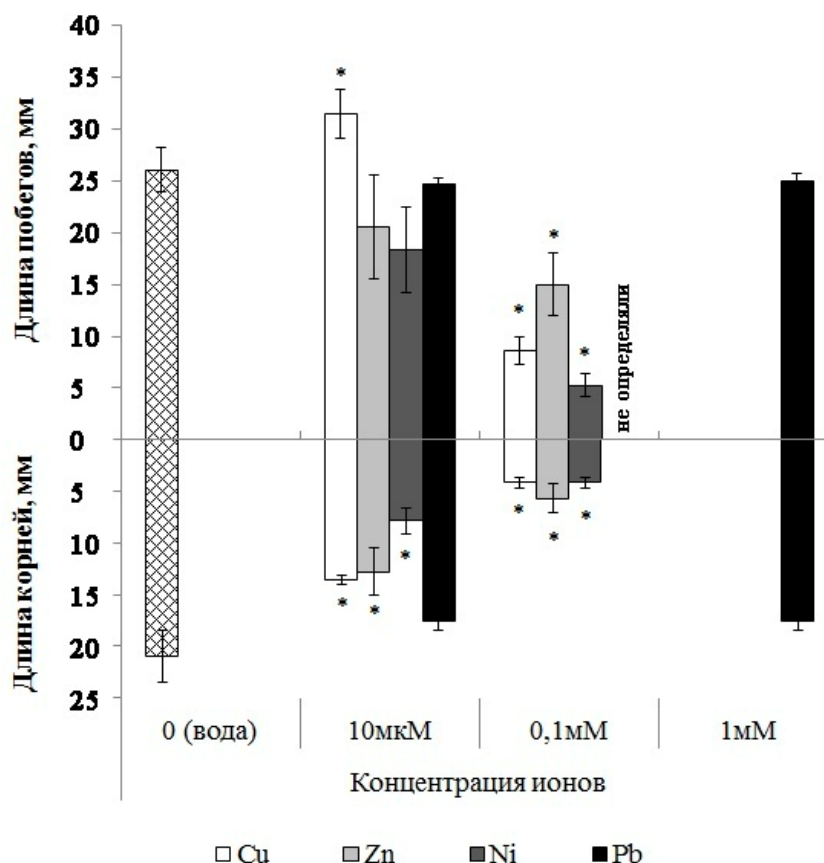


Рис. 1. Влияние эквимольных концентраций тяжелых металлов на рост побегов и корней *Pelargonium zonale* L.

Примечание. * отмечены значения опытных вариантов, существенно отличающихся от водного контроля при $P = 0,05$

При концентрации 10 мкМ ионы Cu^{2+} стимулировали рост побегов. В остальных вариантах существенных различий по действию ТМ на рост побегов не отмечено. Изученные ТМ, за исключением Pb^{2+} , при концентрации 10 мкМ существенно ингибировали рост корней. При концентрации 100 мкМ ингибирование роста побегов и корней ионами Cu^{2+} , Ni^{2+} и Zn^{2+} усилилось. Концентрации 1 мМ изученных ТМ оказались летальными для пеларгонии. Однако ионы Pb^{2+} даже при концентрации 1 мМ не оказывали существенного токсического действия на рост осевых органов растений.

Результаты корреляционного анализа свидетельствуют о том, что исследованные концентрации ТМ оказывали менее выраженный эффект на рост корней, чем на рост побегов. Наиболее сильно ингибировали рост побегов ионы Ni^{2+} ($r = -0,96$) и Cu^{2+} ($r = -0,95$), а рост корней – ионы Cu^{2+} ($r = -0,93$) и Zn^{2+} ($r = -0,89$), тогда как ионы Pb^{2+} на рост осевых органов оказывали слабое и умеренное влияние ($r = -0,27$ и $-0,50$ для побегов и корней соответственно).

Дальнейшие исследования были сконцентрированы на изучении физиологических эффектов ионов свинца и ЭДТА на молодые растения пеларгонии. В табл. 1 отображено влияние ионов Pb^{2+} и ЭДТА на площадь листовой пластинки.

Как низкие, так и высокие концентрации свинца практически не изменяли площадь листьев пеларгонии. И даже имеется тенденция к увеличению площади листа с повышением концентрации ионов свинца в среде выращивания ($r = 0,80$). Обработка ЭДТА приводила к значительному увеличению листовых пластинок в контроле, однако на фоне ионов Pb^{2+} отмечено резкое ингибирование роста листьев, усиливающееся по мере повышения концентрации свинца в инкубационной среде.

На фоне действия ионов Pb^{2+} длина побегов всегда была на уровне контроля или выше его значений. Изменения длины побегов по сравнению с контролем не зависели от испытанных концентраций и носили, по всей видимости, случайный характер (табл. 1).

Таблица 1. Влияние предобработки семян ЭДТА на рост осевых органов *Pelargonium zonale* на фоне ионов Pb^{2+} , мм

Концентрация Pb^{2+}	Сутки опыта	Побеги		Корни	
		без ЭДТА	с ЭДТА	без ЭДТА	с ЭДТА
0 (вода)	5	8,8 ± 0,6	8,0 ± 0,4	10,1 ± 0,7	10,3 ± 0,9
	8	20,4 ± 0,7	19,8 ± 0,7	13,9 ± 0,8	13,6 ± 0,8
	12	21,9 ± 0,6	22,4 ± 0,6	14,7 ± 0,8	14,4 ± 1,0
10 мкМ	5	8,5 ± 0,6	7,6 ± 0,6	10,7 ± 0,8	13,1 ± 0,9
	8	22,8 ± 0,5	19,3 ± 0,6	17,3 ± 0,8	15,8 ± 0,8
	12	24,6 ± 0,6	22,7 ± 0,6	17,6 ± 0,9	17,4 ± 0,8
1 мМ	5	9,6 ± 0,6	6,2 ± 0,3	11,4 ± 0,7	9,2 ± 0,9
	8	22,2 ± 0,7	21,3 ± 0,7	17,1 ± 0,8	10,9 ± 0,7
	12	25,0 ± 0,6	25,8 ± 0,7	16,6 ± 0,9	12,7 ± 0,8

Обработка ЭДТА существенно не изменяла динамику роста побегов.

На 5-е сутки опыта как низкие (10 мкМ), так и высокие (1 мМ) концентрации ионов Pb^{2+} стимулировали рост корней пеларгонии. Этот эффект усиливался при увеличении времени экспозиции (спустя 8 суток) и сохранялся при хроническом действии ионов Pb^{2+} (на 12-е сутки опыта). Обработка ЭДТА стимулировала рост корня при 10 мкМ Pb^{2+} и негативно сказалась на росте корней на фоне 1 мМ ионов Pb^{2+} .

Для определения устойчивости растений пеларгонии к неблагоприятным факторам среды рассчитывали индекс толерантности (ИТ). О степени адаптации растений свидетельствует как величина ИТ, так и динамика его изменения. Так, на фоне ионов Pb^{2+} ИТ превышал 100 %, что свидетельствует о высокой устойчивости пеларгонии к действию этого металла (рис. 2).

Величина ИТ у необработанных и обработанных ЭДТА растений несущественно менялась с течением времени, что также может свидетельствовать об отсутствии признаков хронического отравления свинцом или ЭДТА. Однако на фоне 1 мМ ионов Pb^{2+} ИТ обработанных ЭДТА растений был ниже 100 %, что говорит о негативном влиянии ЭДТА на металлоустойчивость проростков. Тем более что проростки, обработанные ЭДТА, характеризовались менее развитым ассимиляционным аппаратом. Об этом свидетельствовало сокращение площади листьев (табл. 2). Это особенно опасно на герминальной (предъювенильной) стадии развития, до образования устойчивого ассимиляционного аппарата и перехода растения к самостоятельному питанию.

Таблица 2. Влияние предобработки семян ЭДТА на площадь листа *Pelargonium zonale* на фоне ионов Pb^{2+} , мм²

Вариант опыта	0 (вода)	10 мкМ	1 мМ
Без ЭДТА	13,72 ± 0,81	15,73 ± 0,75	17,07 ± 0,81
ЭДТА	21,67 ± 1,10	12,75 ± 0,45	11,30 ± 0,44

Ростовые параметры являются интегральным показателем стрессового воздействия на растения. Изученные ТМ (за исключением Pb^{2+}) негативно влияли на рост осевых органов пеларгонии. Более сильному ингибированию подвергались побеги, а не корни. Ионы Pb^{2+} не влияли на рост корней и побегов пеларгонии зональной и слабо стимулировали рост

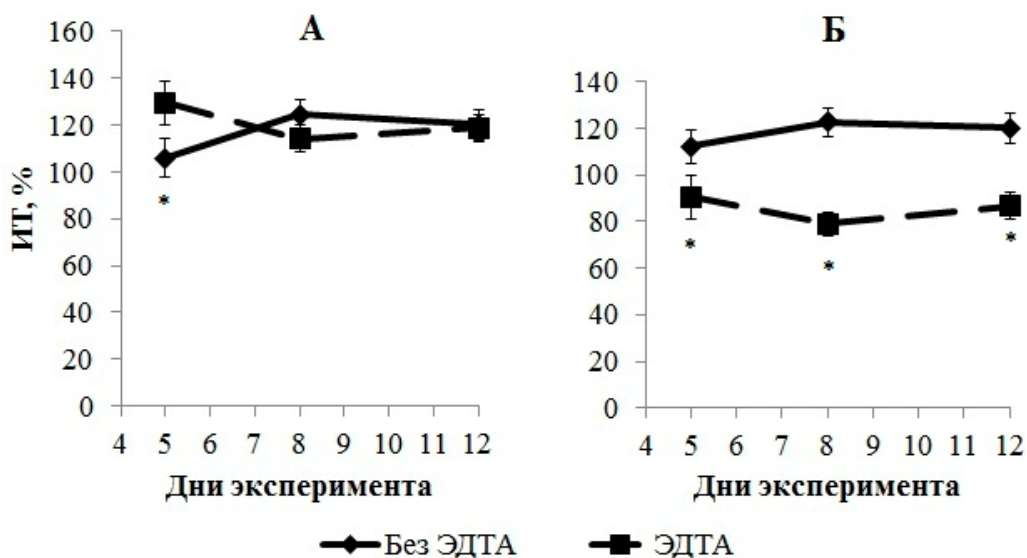


Рис. 2. Индексы толерантности растений *Pelargonium zonale* на фоне ионов Pb^{2+} (А – 10 мкМ, Б – 1 мМ) и предобработки семян ЭДТА.

Примечание. * отмечены значения опытных вариантов, существенно отличающихся от контроля (вариант без ЭДТА) при $P = 0,05$

семядольных листьев. Подобные эффекты являются нетипичными для действия ТМ [Shah et al., 2010]. Можно предположить, что растения герани развили «гипертолерантность» к ионам Pb^{2+} , но не обладают сопутствующей толерантностью к другим металлам, особенно Ni и Cu [Schat, Vooijs, 1997]. У видов-гиперэкстракторов загрузка металлами ксилемы может происходить за счет меньшего секвестрирования металлов в вакуолях корней [Lasat et al., 1998; Heavy Metal Stress..., 2004]. Этим, вероятно, объясняется повышенная токсичность изученных металлов для побегов.

Индукцированная химическими веществами фитоэкстракция рассматривается как двухступенчатый процесс, в котором растения сначала аккумулируют металлы в корнях, а затем усиливается перенос металлов в побеги за счет стимулирующего компонента [Salt et al., 1998]. Этот перенос – следствие нарушения метаболизма, регулирующего транспорт металла в побеги. Токсичность ионов свинца для растений, обработанных ЭДТА, по всей видимости, объясняется нарушением одного из механизмов защиты растения, например, вакуолярной компартментации свинца в физиологически неактивных формах. Вследствие этого ионы свинца накапливаются в растениях в концентрациях, превышающих металлоустойчивость клеток [Xiong Zhi-ting, Lu Ping, 2002; Автухович, 2005].

Совокупность данных по повреждающему действию ТМ в растительном организме можно представить следующей схемой. Когда клетки получают металлы в небольшом избытке, работают механизмы избегания, такие как исключение, секвестрирование или компартментация. Когда избыток металла достигает сублетальных концентраций, то окислительный стресс, запускаемый токсическими металлами, приводит к возрастанию активных форм кислорода; на этой основе далее разрушаются биомолекулы и сильно нарушается метаболизм. Это в конечном счете приводит к ослаблению или остановке роста [Bertrand, Poirier, 2005; Küpper, 2009].

Руководствуясь этой схемой, мы изучили влияние ионов Pb^{2+} и ЭДТА на окислительный статус растений *Pelargonium zonale*. Очевидно, что первичные эффекты ТМ связаны с генерацией АФК, происходящей на уровне клеток и их органелл.

Для оценки уровня окислительного стресса в растениях мы определяли скорость генерации супероксидного анион-радикала – одной из наиболее быстро образующихся в клетках растений АФК [Mittler, 2002; Stancheva et al.,

2010]. В наших опытах выявлено, что ионы Pb^{2+} практически не изменяли стационарный уровень супероксида (табл. 3).

Таблица 3. Влияние предобработки семян ЭДТА на скорость генерации супероксидного анион-радикала в листьях *Pelargonium zonale* на фоне ионов Pb^{2+} , мкМ/г-мин

Вариант опыта	0 (вода)	10 мкМ	1 мМ
Без ЭДТА	0,86 ± 0,04	0,91 ± 0,04	0,95 ± 0,04
ЭДТА	0,79 ± 0,09	1,09 ± 0,03	0,74 ± 0,06

Обработка ЭДТА индуцировала повышение скорости генерации супероксидного анион-радикала на фоне 10 мкМ и снижение до уровня контроля – при 1 мМ ионов Pb^{2+} .

АФК способны реагировать со многими компонентами клеток, включая липиды, белки и нуклеиновые кислоты, приводя к нарушению их структуры и функций [Kehrer, 2000]. При взаимодействии АФК с жирными кислотами образуются пероксиды липидов. Показано, что повышение ПОЛ при стрессе может происходить в результате повышения активности липоксигеназы [Gallego et al., 1996; Weckx, Clijsters, 1997]. Активность этого фермента и сопровождающее ее накопление продуктов ПОЛ в корнях и листьях растений также индуцируется ТМ [Saeidi-Sar et al., 2007].

В качестве индикатора деградации клеточных мембран часто используют содержание малонового диальдегида (МДА). Интенсивность ПОЛ в листьях пеларгонии, оцененная по накоплению МДА, представлена в табл. 4.

Таблица 4. Влияние предобработки семян ЭДТА на концентрацию МДА в листьях *Pelargonium zonale* на фоне ионов Pb^{2+} , мкМ/г

Вариант опыта	0 (вода)	10 мкМ	1 мМ
Без ЭДТА	0,26 ± 0,05	0,29 ± 0,06	0,26 ± 0,06
ЭДТА	0,45 ± 0,09	0,34 ± 0,07	0,36 ± 0,08

Ионы Pb^{2+} не оказывали существенного влияния на концентрацию МДА. Результаты корреляционного анализа свидетельствуют о том, что интенсивность ПОЛ при действии ионов Pb^{2+} не связана со скоростью генерации супероксида в листьях пеларгонии ($r = 0,06$). В варианте с ЭДТА без металла было отмечено резкое повышение концентрации МДА, а в вариантах Pb^{2+} +ЭДТА зарегистрировано несущественное превышение интенсивности ПОЛ по сравнению с вариантами без ЭДТА.

Сверхвысокое накопление ионов ТМ смещает клеточное равновесие в сторону ускорения окисления. Предполагается, что толерантность к тяжелым металлам может быть связана со способностью растений тушить

активные формы кислорода [Лукаткин и др., 2007]. Показано, что после обработки растений ТМ происходила металлозависимая активация низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбиновой кислоты, восстановленного глутатиона, α -токоферола) и ферментов каталазы, АПО, супероксиддисмутазы, глутатион-редуктазы [Башмаков, 2012].

Неоднозначны данные об активности ряда ферментов при действии Pb^{2+} . Так, с повышением концентрации Pb^{2+} активность супероксиддисмутазы (СОД) слегка возрастала или не изменялась, активность каталазы обычно возрастала, пероксидазы — вначале возрастала, затем снижалась [Li-hong et al., 2006]. При исследовании хронического действия свинца на растения показано, что при низких концентрациях ($< 2,5$ мМ/л) ионов Pb активность СОД в клетках постепенно возрастала; при высокой концентрации (>10 мМ/л) активность СОД вначале возрастала, а затем понижалась, с одновременным возрастанием уровня активированных форм кислорода и денатурации антиоксидантных ферментов [Hui-zhong et al., 2006].

При изучении реакций антиоксидантных ферментов на обработку металлами сообщалось об увеличении активности АПО. Б. П. Шоу и Н. П. Роут [Shaw, Rout, 1998] наблюдали металл-специфические (Hg и Cd) различия в реакции фермента у старых проростков *Phaseolus aureus* по сравнению с более молодыми, когда Hg индуцировал активацию фермента, а Cd — нет. Предполагается, что повышенный синтез АПО в ответ на Hg может защищать растение от окислительного стресса, индуцированного металлом.

В наших экспериментах ионы Pb^{2+} не индуцировали активность АПО в листьях пеларгонии (табл. 5). Напротив, высокие (1 мМ) концентрации свинца снижали активность фермента на 33 % по отношению к водному контролю.

Таблица 5. Влияние предобработки семян ЭДТА на активность АПО в листьях *Pelargonium zonale* на фоне ионов Pb^{2+} , мкМ/г-мин

Вариант опыта	0 (вода)	10 мкМ	1 мМ
Без ЭДТА	1,43 ± 0,03	1,43 ± 0,24	0,95 ± 0,04
ЭДТА	0,71 ± 0,17	0,71 ± 0,06	0,48 ± 0,08

Обработка ЭДТА резко снижала активность АПО в листьях растений пеларгонии как по отношению к контролю, так и по отношению к необработанным растениям. Результаты попарного корреляционного анализа также свидетельствуют в пользу того, что при обработке ЭДТА роль АПО в антиоксидантной защите у

растений пеларгонии снижается. Так, в листьях растений, не обработанных ЭДТА, отмечена высокая обратно пропорциональная зависимость активности АПО и скорости генерации супероксида ($r = -0,83$), в то время как в вариантах с ЭДТА зависимость переходит в прямо пропорциональную ($r = 0,61$).

Заключение

Ростовые параметры и индексы толерантности молодых растений *Pelargonium zonale* L. не зависели от концентрации ионов Pb^{2+} и длительности экспозиции, в отличие от воздействия других металлов, резко ингибирующих ростовые параметры с увеличением концентрации ионов в среде выращивания. Ионы Pb^{2+} практически не изменяли окислительный статус молодых растений пеларгонии. Однако при высоких концентрациях Pb^{2+} значительно снижалась активность АПО в листьях изученных растений.

Обработка ЭДТА существенно снижала металлоторантность растений на фоне 1 мМ Pb^{2+} , индуцировала повышенную генерацию супероксидного анион-радикала при 10 мкМ ионов Pb^{2+} и резко ингибировала активность АПО в листьях растений пеларгонии.

Поскольку в целом обнаружены неблагоприятные эффекты ЭДТА на растения пеларгонии, мы не рекомендуем применять предпосевную обработку семян данным препаратом при использовании пеларгонии для фиторемедиации почв, загрязненных свинцом.

Литература

- Автухович И. Е. Роль органических кислот в повышении фитоэкстракции свинца древесными растениями из водного раствора // Лесной вестник МГУЛ. 2005. Вып. 2, № 38. С. 10–12.
- Башмаков Д. И. Экофизиологические аспекты металлотоксичности высших растений. LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012. 309 с.
- Ильин В. Б. Тяжелые металлы в системе почва-растение. Новосибирск: Наука, 1991. 151 с.
- Козаренко А. Е. Свинец в растениях // Свинец в окружающей среде. М.: Наука, 1987. С. 71–76.
- Комнатные растения. Пеларгония. URL: <http://www.florets.ru/komnatnye-rasteniya/pelargoniya/> (дата обращения: 15.06.2012).
- Лебедева О. Ю., Фруммин Г. Т. Распределение валовых форм тяжелых металлов в почвах Костромской области // Среда обитания. URL: http://www.terrahumana.ru/archiv/10_03/10_03_47.pdf (дата обращения: 17.08.2012).
- Лукаткин А. С. Вклад окислительного стресса в развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. 1. Образование активированных форм кислорода при охлаждении растений // Физиология растений. 2002а. Т. 49, № 5. С. 697–702.

Лукаткин А. С. Вклад окислительного стресса в развитие холодого повреждения в листьях теплолюбивых растений. 2. Образование активированных форм кислорода при охлаждении растений // Физиология растений. 2002б. Т. 49, № 6. С. 878–885.

Лукаткин А. С., Голованова В. С. Интенсивность перекисного окисления липидов в охлажденных листьях теплолюбивых растений // Физиология растений. 1988. Т. 35, вып. 4. С. 773–779.

Лукаткин А. С., Грачева Н. В., Грищенкова Н. Н., Духовскис П. В., Бразайтите А. А. Цитокинин-подобные препараты ослабляют повреждения растений кукурузы ионами цинка и никеля // Физиология растений. 2007. Т. 54, № 3. С. 432–439.

Прасад М. Н. В. Растения, аккумулирующие и/или включающие токсичные микроэлементы, и их роль в фиторемедиации // Микроэлементы в окружающей среде: биогеохимия, биотехнология и биоремедиация / Под ред. М. Н. В. Прасада, К. С. Саджвана, Р. Найди; пер. с англ. к. б. н. Д. И. Башмакова и д. б. н. А. С. Лукаткина. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2009. С. 592–620.

Рынок руд и концентратов цветных металлов 2011: алюминий, медь, никель, олово, цинк. URL: <http://www.metalresearch.ru/page144.html> (дата обращения: 15.08.2012)

Физиология растительных организмов и роль металлов / Кожанова О. Н., Дмитриева А. Г., Чернавская Н. М. и др. М.: Изд-во МГУ, 1989. 155 с.

Ягодин Б. А. Применение удобрений и охрана окружающей среды // Агрохимия. М.: Агропромиздат, 1989. С. 626–649.

Baker A. J. M., Brooks R. R. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution // Ecology and Phytochemistry. Biorecovery 1. 1989. P. 81–126.

Bertrand M., Poirier I. Photosynthetic organisms and excess of metals // Photosynthetica. 2005. Vol. 43, N 3. P. 345–353.

Brown S. L., Chaney R. L., Angle J. S., Baker A. M. Zinc and cadmium uptake by hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and metal tolerant *Silene vulgaris* grown on sludge-amended soils // Environ. Sci. Technol. 1995. Vol. 29. P. 1581–1585.

Callender E. Heavy Metals in the Environment – Historical Trends // Treatise on Geochemistry / Ed.: B. Sherwood Lollar; Executive Eds. H. D. Holland and K. K. Turekian, Elsevier. 2003. Vol. 9. P. 67–105.

Chaney R. L., Malik M., Li Y. M., Brown S. L., Brewer E. P., Angle J. S., Baker A. J. Phytoremediation of soil metals // Curr. Opin. Biotechnol. 1997. N 8. P. 279–284.

Gallego S. M., Benavides M. P., Tomaro M. L. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress // Plant Sci. 1996. Vol. 121. P. 151–159.

Heavy Metal Stress in Plants: from Biomolecules to Ecosystems / Ed. M. N. V. Prasad, Heidelberg: Springer-Verlag, 2004. 462 p.

Huang J. W., Cunningham S. D. Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation // New Phytol. 1996. Vol. 134. P. 75–84.

Hui-zhong W., Xin-quan Zh., Cur-ping H. Влияние свинца на активность супероксид дисмутаза в корнях проростков *Agrostis* // Nongye hanjing kexue xuebao= J. Agro-Environ. Sci. 2006. Vol. 25, N 3. P. 644–647.

Jiang W., Liu D. Effects of Pb²⁺ on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays* L. // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2000. Vol. 65, N 6. P. 786–793.

Kehrer J. P. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity // Toxicol. 2000. Vol. 149. P. 43–50.

Koornneeff M., Alonso-Blanco C., Peeters A. J. M. Genetic approaches in plant physiology // New Phytol. 1997. Vol. 137. P. 1–8.

Küpper H. Heavy Metals and Plants – a complicated relationship. URL: http://www.unikonstanz.de/FuF/Bio/kuepper/Homepage/Heavy_Metal_detoxification_PortoAlegre2009.pdf. (дата обращения: 23.04.2010).

Lasat M. M., Baker A. J. M., Kochian L. V. Altered Zn compartmentation in the root symplasm and stimulated Zn absorption into the leaf as mechanisms involved in Zn hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens* // Plant Physiol. 1998. Vol. 118, N 1. P. 675–883.

Li-hong Zh., Xue-mei L., Qiang Ch., Xing-yuan H. Влияние свинца на антиоксидантные ферменты и активность корней сортов кукурузы // Jilin xuebao=J. Jilin Agr. Univ. 2006. Vol. 28, N 2. P. 119–122.

Malcová R., Gryndler M. Amelioration of Pb and Mn toxicity to arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intradices* by maize root exudates // J. Biol. Plantarum. 2003. Vol. 47, N 2. P. 297–299.

McGrath S. P. Phytoextraction for soil reclamation // Plants That Hyperaccumulate Heavy Metals. Their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytomining / Ed. R. R. Brooks, Wallingford, Oxon: CAB International, 1998. 261 p.

McGrath S. P., Zhao F. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils // Curr. Opin. Biotechnol. 2003. Vol. 14, N 1. P. 277–282

Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends in Plant Science. 2002. Vol. 7. Iss. 9, N 1. P. 405–410.

Pierzynski, G. M., Schwab A. P. Bioavailability of zinc, cadmium and lead in metal-contaminated alluvial soil // J. Environ. Qual. 1993. Vol. 22. P. 247.

Prasad M. N. V., Freitas H. Metal-tolerant plants: biodiversity prospecting for phytoremediation technology // Trace elements in the environment: biogeochemistry, biotechnology, and bioremediation / Eds. M. N. V. Prasad, K. S. Sajwan, R. Naidu, Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2006. Chapter 25. P. 483–506.

Rucinska R., Gwozdz E. A. Influence of lead on membrane permeability and lipoxygenase activity in lupine roots // J. Biol. Plantarum. 2005. Vol. 49, N 4. P. 617–619.

Saeidi-Sar S., Khavari-Nejad R. A., Fahimi H., Ghorbanli M., Majd A. Interactive effects of gibberellin A3 and ascorbic acid on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in Glycine max seedlings under nickel stress // Russ. J. Plant Physiol. 2007. Vol. 54. P. 74–79.

Salt D. E., Smith R. D., Raskin I. Phytoremediation // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1998. Vol. 49, N 1. P. 643–668.

Saxena P. K., Krishnaraj S., Dan T., Perms M. R., Vettakkorum-Kankav N. N. Phytoremediation of metal contaminated and polluted soils // Heavy Metal Stress in Plants – from Molecules to Ecosystems / Eds. M. N. V. Prasad, J. Hagemeyer, Heidelberg: Springer-Verlag, 1999. P. 305–329.

Schat H., Vooijs R. Multiple tolerance and co-tolerance to heavy metals in *Silene vulgaris*, a co-segregation analysis // New Phytol. 1997. Vol. 136. P. 489–496.

Shah F. U. R., Ahmad N., Masood K. R., Peralta-Videa J. R. and Ahmad F. U. D. Heavy Metal Toxicity in Plants // Plant Adaptation and Phytoremediation / Eds. M. Ashraf, M. Ozturk, M. S. A. Ahmad, Springer, 2010. 481 p.

Shaw B. P., Rout N. P. Age-dependent responses of *Phaseolus aureus* Roxb. to inorganic salts of mercury and cadmium // Acta Physiol. Plant. 1998. Vol. 20. P. 85–90.

Singh R. P., Dabas S., Choudhary A. Recovery of Pb^{2+} caused inhibition of chlorophyll biosynthesis in leaves of *Vigna radiata* (L.) Wilczek by inorganic salts // Indian J. Exp. Biology. 1996. Vol. 34, N 11. P. 1129–1132.

Stancheva I., Geneva M., Hristozkova M., Markovska Y., Salamon I. Antioxidant capacity of sage grown on heavy metal-polluted soil // Физиология растений. 2010. Т. 57. С. 857–863.

U. S. Geological Survey. Mineral Commodity Summaries // U. S. Geological Survey. 2011. 198 p.

Weckx J. E. J., Clijsters H. M. M. Zn phytotoxicity induces oxidative stress in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* // Plant Physiol Biochem. 1997. Vol. 35. P. 405–410.

Xiong Zhi-ting, Lu Ping. Joint enhancement of lead accumulation in Brassica plants by EDTA and ammonium sulfate in sand culture // J. Environ. Sci. (China), 2002. Vol. 14, N 2. P. 216–220.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Башмаков Дмитрий Идрисович

доцент каф. ботаники и физиологии растений, к. б. н.
ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный
университет им. Н. П. Огарева»
ул. Большевикская, 68, Саранск,
Республика Мордовия, Россия, 430005
эл. почта: dimabashmakov@yandex.ru
тел.: (8342) 322507

Bashmakov, Dmitry

Mordovia, Ogariov State University.
68, Bolshevitskaja St., 430005, Saransk,
Mordovia, Russia
e-mail: dimabashmakov@yandex.ru
tel.: (8342) 322507

Сазанова Кристина Александровна

аспирантка
ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный
университет им. Н. П. Огарева»
ул. Большевикская, 68, Саранск,
Республика Мордовия, Россия, 430005
эл. почта: krissaz@rambler.ru
тел.: (8342) 322507

Sazanova, Kristina

Mordovia, Ogariov State University.
68, Bolshevitskaja St., 430005, Saransk,
Mordovia, Russia
e-mail: krissaz@rambler.ru
tel.: (8342) 322507

Акамова Людмила Петровна

студентка 6 курса
ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный
университет им. Н. П. Огарева»
ул. Большевикская, 68, Саранск,
Республика Мордовия, Россия, 430005
эл. почта: mila@mail2k.ru
тел.: (8342) 322507

Akamova, Lyudmila

Mordovia, Ogariov State University.
68, Bolshevitskaja St., 430005, Saransk,
Mordovia, Russia
e-mail: mila@mail2k.ru
tel.: (8342) 322507