

ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА КАДМИЯ (II) НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ, МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОРОСТКОВ ЩИРИЦЫ ЗАПРОКИНУТОЙ И ЛОФАНТА ТИБЕТСКОГО

Слепцов Игорь Витальевич, аспирант

Журавская Алла Николаевна, доктор биологических наук, профессор

ФГБУН Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, 677000, г. Якутск, пр. Ленина, 41; 8 (4112) 33 55 79;

e-mail: neroxasg@mail.ru

Ключевые слова: *Amaranthus retroflexus*, *Agastache rugosa*, кадмий, стресс, антиоксиданты, ферменты, перекисное окисление липидов

Исследовано влияние хлорида кадмия (II) в концентрациях 5, 10, 20, 40 и 80 мкМ на физиологические, морфологические и биохимические характеристики проростков щирицы запрокинутой (*Amaranthus retroflexus* L.) и лофанта тибетского (*Agastache rugosa* (Fisch. & C.A.Mey.)), в течение 30 дней наблюдения. Показано, что наряду с известным механизмом токсического действия ионов кадмия на физиологические характеристики, связанного с модификацией сульфгидрильных групп белков, влияющих на клеточное деление апикальных клеток растений, существенный вклад на физиологическое развитие проростков вносит прооксидантное действие Cd^{+2} и антиоксидантное - низкомолекулярных антиоксидантов.

Введение

В настоящее время одной из актуальных проблем человечества является проблема загрязнения атмосферы, растений, почв и водных ресурсов тяжелыми металлами. По данным Всемирной организации здравоохранения, среди загрязняющих веществ, оказывающих отрицательное действие на человека, первое место занимают пестициды, второе - тяжелые металлы, среди которых основными считаются Hg, Pb, Cd, As, Zn, Ni [1]. Тяжелые металлы поступают в атмосферу более 60% от общего количества в результате антропогенной деятельности человека, а Pb, Cd, Ni – до 90–99% [2, 3]. Кадмий является одним из самых распространенных загрязнителей почвы и высокотоксичным металлом [4]. ПДК кадмия составляет 1 мкг/дм³ воды и 0,5-2,0 мг/кг почвы. Ионы кадмия способны аккумулироваться в корнях растений и в надземных органах, таких как семена и плоды [5, 6]. Далее ионы кадмия поступают в организм человека и животных, вызывая интоксикацию. Аккумуляция Cd в тканях растений приводит к нарушению физиологических и биохимических процессов, к снижению их продуктивности и к гибели [7-9].

Ранее не проводились исследования по изучению влияния $CdCl_2$ на физиологические, морфологические и биохимические характеристики проростков щирицы запрокинутой (*Amaranthus retroflexus*) и лофанта тибетского (*Agastache rugosa*).

Цель данной работы изучить влияние различных концентраций хлорида кадмия (II) на физиологические, морфологические и биохимические характеристики проростков щирицы запрокинутой (*A. retroflexus*) и лофанта тибетского (*A. rugosa*)

Объекты и методы исследований

В качестве тест-объекта использовали семена *Amaranthus retroflexus* L. и *Agastache rugosa* (Fisch. & C.A.Mey.).

Amaranthus retroflexus - однолетнее дикорастущее травянистое растение, широко распространенное на территории Центральной Якутии. *Agastache rugosa* - многолетнее дикорастущее травянистое растение, произрастающее в Восточной Азии. Семена *A. retroflexus* и *A. rugosa* были собраны на территории Ботанического сада ИБПК СО РАН (Якутск) в конце августа 2014 года.

Семена *A. retroflexus* и *A. rugosa* проращивали на стеклянных шариках диаметром 2-3 мм с ватной подложкой, в прозрачных

Таблица 1

Физиологические характеристики проростков *Amaranthus retroflexus* при интоксикации хлоридом кадмия (II)

Концентрация CdCl ₂ , мкМ	Количество проростков с двумя листьями, %				
	7 день	14 день	17 день	21 день	30 день
0 (контроль)	33,0±1,2	39,0±2,5	39,0±2,5	39,0±2,5	39,0±2,5
5	14,7±1,2	15,3±1,2	15,3±1,2	15,3±1,2	15,3±1,2
10	13,0±1,2	13,3±1,2	13,3±1,2	13,3±1,2	13,3±1,2
20	8,7±1,2	10,7±1,2	10,7±1,2	10,7±1,2	10,7±1,2
40	5,3±1,2	6,0±2,0	6,0±2,0	6,0±2,0	6,0±2,0
80	2,7±1,2	2,7±1,2	2,7±1,2	2,7±1,2	2,7±1,2

пластиковых чашках объемом 250 мл, закрытых стеклянной крышкой. Масса стеклянных шариков составляла 400 граммов для каждой чашки, в которые наносили 100 мл водного раствора CdCl₂ в концентрациях 5, 10, 20, 40 и 80 мкМ, в качестве контроля использовали дистиллированную воду. Проращивание проводили в условиях климатической камеры BINDER KMF (Германия) при температуре 25°C с длиной светового дня 16 часов и при относительной влажности 60%. Опыт закладывали в четырех повторностях по 50 семян в каждой чашке для каждой концентрации.

Для оценки физиологических параметров использовали количество проростков с двумя, тремя и четырьмя листьями, в качестве морфологических – длину корешка и побега. Определение активности фермента супероксиддисмутазы (СОД) проводили по измерению величины молярного коэффициента экстинкции бисформазановых комплексов [10], активности пероксидазы (ПОК) – по стандартной методике окисления о-дианизидина H₂O₂ [11]. Определение суммарного содержания низкомолекулярных антиоксидантов (ΣНМАО) – по методике, основанной на окрашивании о-фенантролином восстановленного FeCl₂ [12]. Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по методике, основанной на реакции между малоновым диальдегидом (МДА) и тиобарбитуровой кислотой [13]. Коэффициент антиоксидантной защиты (Каоз) вычисляли как отношение нормированных к контрольному значению величин ΣНМАО к [МДА]:

$$\text{Каоз} = \frac{\Sigma\text{НМАО}_{\text{нормированные}}}{[\text{МДА}]_{\text{нормированные}}}$$

При определении физиологических и биохимических параметров статистический разброс определяли с использованием доверительного интервала по критерию Стьюдента [14].

Результаты исследований

Изучены физиологические характеристики проростков *A. retroflexus* и *A. rugosa* на 7, 14, 17, 21 и 30-й день при интоксикации CdCl₂. Во всем интервале исследуемых концентраций CdCl₂ количество проростков *A. retroflexus* с двумя листьями уменьшалось на 60-93% по отношению к контролю (табл.1). Это может быть связано с непосредственным действием CdCl₂ на процессы деления клеток, что могло вызывать торможение в развитие проростков [15].

На протяжении всего эксперимента количество проростков *A. rugosa* с двумя листьями при интоксикации CdCl₂ в концентрациях 5, 10 и 20 мкМ было выше в 1,1-2,2 раза, относительно контроля (табл.2). На 7-й и 14-й дни эксперимента, при интоксикации CdCl₂ в концентрации 40 мкМ, количество проростков с двумя листьями было выше на 16-31%, а при 80 мкМ – сохранялось на одном уровне с контролем. Начиная с 17-го дня по 30-й день эксперимента, при интоксикации CdCl₂ в концентрации 80 мкМ, количество проростков с двумя листьями было ниже на 17%, а при 40 мкМ статистически достоверно не отличалось от контроля. Это указывает на то, что CdCl₂ при низких концентрациях способен оказывать стимулирующее действие на развитие второго листа [16], а высокие его

Таблица 2

Физиологические характеристики проростков *Agastache rugosa* при интоксикации хлоридом кадмия (II)

Концентрация CdCl ₂ , мкМ	Количество проростков, %				
	7 день	14 день	17 день	21 день	30 день
Количество проростков с двумя листьями, %					
0 (контроль)	13,0±1,2	25,0±1,2	28,0±1,2	28,0±1,2	28,0±1,2
5	27,0±1,2	36,0±2,5	48,0±2,5	52,0±2,5	52,0±2,5
10	29,0±2,5	41,0±1,2	44,0±2,5	44,0±2,5	45,0±2,5
20	17,0±1,2	31,0±1,2	32,0±2,5	32,0±2,5	32,0±2,5
40	17,0±1,2	29,0±1,2	29,0±1,2	29,0±1,2	29,0±1,2
80	12,0±2,5	22,0±2,0	23,3±1,2	23,3±1,2	23,3±1,2
Количество проростков с тремя листьями, %					
0 (контроль)	0,0±0,0	19,0±1,2	22,0±2,5	25,0±1,2	27,0±1,2
5	0,0±0,0	2,7±1,2	16,7±1,2	18,0±2,5	35,0±1,2
10	0,0±0,0	2,0±1,2	13,0±1,2	15,0±1,2	25,3±1,2
20	0,0±0,0	2,0±1,2	9,0±1,2	15,0±1,2	22,0±1,2
40	0,0±0,0	1,0±1,2	7,0±1,2	11,0±1,2	11,0±1,2
80	0,0±0,0	0,7±1,2	3,3±1,2	9,0±1,2	9,0±1,2
Количество проростков с четырьмя листьями, %					
0 (контроль)	0,0±0,0	15,0±1,2	17,0±1,2	22,0±2,5	27,0±1,2
5	0,0±0,0	0,0±0,0	4,0±1,2	12,0±1,2	21,0±1,2
10	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0±1,2	6,0±2,0	17,0±1,2
20	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0±1,2	5,0±1,2	11,0±1,2
40	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1,3±1,2	3,3±1,2
80	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,7±1,2	0,7±1,2

концентрации угнетают процессы деления клеток апекса побега [15].

Образование третьего листа у проростков *A. rugosa* начиналось на 14-й день эксперимента. В период с 14-го по 21-й день наблюдений во всех вариантах исследуемых концентраций CdCl₂ количество проростков с тремя листьями было ниже на 28-96%, по сравнению с контролем. На 30-й день в варианте [5 мкМ CdCl₂] количество проростков с тремя листьями увеличилось на 30%; при 20, 40 и 80 мкМ - уменьшалось на 19-67%; при 10 мкМ - сохранилось на уровне контроля. Таким образом, низкие концентрации CdCl₂ способствовали увеличению числа проростков с тремя листьями на 30-й день наблюдения, но замедлили процессы развития проростков *A. rugosa*. Торможение в развитие проростков может быть также связано с замедлением клеточных делений вызванных интоксикацией CdCl₂ [17].

Четвертый лист у проростков *A. rugosa* образовывался на 14-й день эксперимента. На протяжении всего эксперимента при всех исследуемых вариантах концентраций CdCl₂ количество проростков с четырьмя листьями было ниже на 22-97% относительно контроля, что могло быть связано с нарушением процессов деления апекса побега CdCl₂ [15].

Известно, что при действии тяжелых металлов, в том числе и солей кадмия, происходит ингибирование длины корешка и побега [15, 17, 18, 20]. При интоксикации CdCl₂ концентрациями 5, 10, 20, 40 и 80 мкМ уменьшилась длина корешка на 30-й день наблюдения у проростков *A. retroflexus* и *A. rugosa* на 92,3-98,2% и 90,6-96,7%, соответственно (табл.3). Длина побега на этот же день у проростков *A. retroflexus* и *A. rugosa* снизилась на 71,0-89,2% и 50,0-79,1%, соответственно. Такое действие может быть вызвано тем, что происходило замедление ин-

Таблица 3

Морфологические и биохимические характеристики проростков *Amaranthus retroflexus* и *Agastache rugosa* при интоксикации CdCl_2 на 30 день

Концентрация CdCl_2 , мкМ	Длина корешка, мм	Длина побега, мм	НМАО, мг-экв кверцетина/г сырой массы	ПОЛ нмоль/г сырой массы
<i>Amaranthus retroflexus</i>				
0	60,95±7,31	22,70±3,41	0,56±0,02	52,8±6,6
5	4,67±0,33	6,59±0,40	0,46±0,01	114,5±4,0
10	3,00±0,18	4,60±0,37	0,39±0,03	115,5±8,2
20	1,79±0,16	4,00±0,28	0,41±0,04	138,1±5,8
40	1,39±0,07	3,27±0,16	0,26±0,01	158,6±6,7
80	1,08±0,06	2,46±0,25	0,27±0,02	154,2±7,5
<i>Agastache rugosa</i>				
0	74,86±8,98	5,52±0,66	3,19±0,02	162,24±7,07
5	7,04±0,49	2,76±0,17	2,51±0,04	243,76±13,61
10	6,12±0,37	2,44±0,20	2,48±0,04	267,55±7,07
20	5,00±0,45	2,13±0,15	1,95±0,08	266,59±3,47
40	3,88±0,19	1,41±0,07	2,01±0,10	300,13±4,87
80	2,50±0,15	1,16±0,12	1,99±0,02	411,29±15,03

тенсивности клеточных делений, связанное со сродством ионов кадмия к сульфгидрильным группам белков, которые являются ответственными за прохождение митоза [17].

Также нами были исследованы биохимические показатели в сырой массе проростков *A. retroflexus* и *A. rugosa*: концентрация МДА, Σ НМАО, активность ферментов СОД, ПОК (см. табл. 3). В клетках проростков *A. retroflexus* с увеличением концентрации CdCl_2 содержание МДА повысилось в 2,2-3,0 раза, на фоне снижения Σ НМАО на 17,6-51,5%, относительно контроля. Похожая ответная реакция наблюдалась и у проростков *A. rugosa* - с увеличением концентрации CdCl_2 количество МДА повышалось в 1,5-2,6 раз с одновременным снижением суммарного содержания НМАО на 21,3-37,6% (см. табл.3). Таким образом, установлено, что при действии всех изученных концентраций CdCl_2 повышается концентрация МДА и уменьшается содержание Σ НМАО. Это может быть связано с тем, что ионы Cd^{+2} усиливают образование свободных радикалов, которые в свою очередь индуцировали процессы перекисного окисления липидов [13]. Вследствие этого происходит уменьшение количества Σ НМАО, которые участвовали в инактивации свободных радикалов, а не-

которые из них могли образовать с тяжелыми металлами нерастворимые соединения [21].

Одними из важнейших составляющих антиоксидантной системы являются ферменты: ПОК и СОД. В клетках проростков *A. retroflexus* с увеличением концентрации CdCl_2 происходило увеличение активности ПОК и СОД в 1,7-3,9 и 2,0-11,6 раз, соответственно (рис.1). Для проростков *A. rugosa* наблюдалась похожая картина - увеличение концентрации CdCl_2 способствовало повышению активности ПОК и СОД в 2,2-3,2 и 1,7-4,1 раза, соответственно (рис.2). Таким образом, в проростках *A. retroflexus* и *A. rugosa* при действии всех исследуемых концентраций CdCl_2 активировались СОД и ПОК. Возможно, это связано с увеличением количества супероксид радикала и перекисей, вызванного интоксикацией хлоридом кадмия (II), которые в свою очередь могли привести к повышению активности СОД и ПОК [18,19]. Следует отметить, что повышение активности СОД и ПОК совершенно не коррелировало с изменением физиологических показателей проростков *A. retroflexus* и *A. rugosa* при увеличении концентрации CdCl_2 (сравнить рис. 1 и 2 с табл. 1 -3). Можно предположить, что повышение concentra-

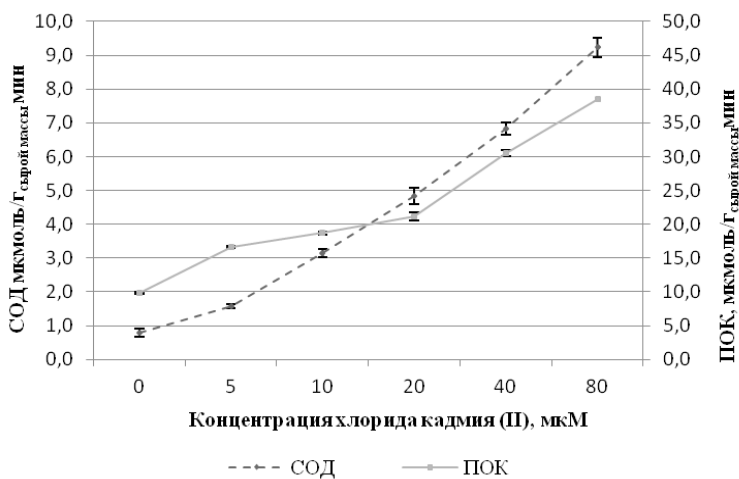


Рис. 1 - Активность супероксиддисмутазы и пероксидазы в проростках *Amaranthus retroflexus* при интоксикации $CdCl_2$

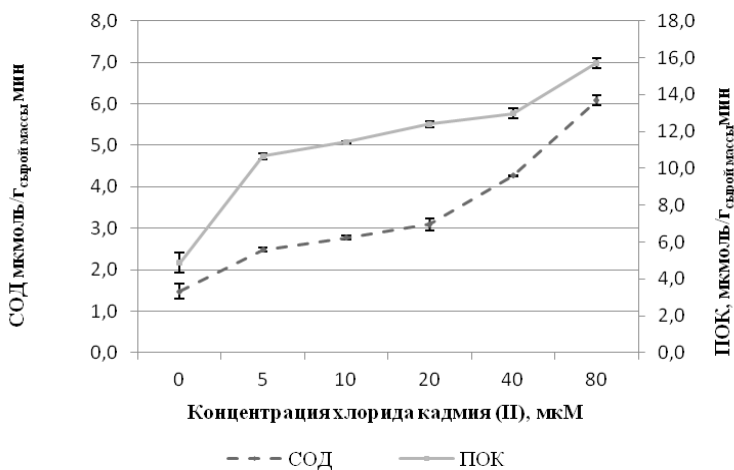


Рис. 2 - Активность супероксиддисмутазы и пероксидазы в проростках *Agastache rugosa* при интоксикации $CdCl_2$

ций супероксид радикала и перекисей при прооксидантном действии ионов Cd^{+2} не является основным токсическим фактором по отношению к проросткам *A. retroflexus* и *A. rugosa*.

Вычисленный коэффициент антиоксидантной защиты (Каоз), являющийся показателем вклада Σ НМАО в антиоксидантно-прооксидантные процессы, имеет высокие положительные коэффициенты корреляции с физиологическими характеристиками проростков обоих изученных видов (рис. 3 и 4). На рис.3 показано, что Каоз для проростков *A. retroflexus* снижается на 62-83% при увеличении концентрации $CdCl_2$ синхронно с физиологическими и морфологическими

характеристиками. Похожая тенденция наблюдалась для проростков *A. rugosa* (рис.4), где также происходило снижение Каоз на 48-75% с увеличением концентрации $CdCl_2$, на фоне уменьшения физиологических и морфологических характеристик (см.рис. 4). Коэффициент корреляции (r) Каоз к физиологическим и морфологическим характеристикам для всех видов выше 0,88.

$r_{\text{длины корешка и Каоз}} = 0.97$; $r_{\text{длины побега и Каоз}} = 0.98$; $r_{\text{количества проростков с 2 листьями и Каоз}} = 0.99$.

$r_{\text{длины корешка и Каоз}} = 0.95$; $r_{\text{длины побега и Каоз}} = 0.99$; $r_{\text{количества проростков с 4 листьями и Каоз}} = 0.88$.

Выводы

Изучено влияние хлорида кадмия (II) разных концентраций на физиологические характеристики проростков в течение 30-ти дней наблюдения. Установлено, что ионы кадмия оказывают угнетающее действие на развитие второго, третьего и четвертого листа у проростков *A. retroflexus* и *A. rugosa*. Показано, что при интоксикации $CdCl_2$ во всем диапазоне исследованных концентраций происходило уменьшение длины корешка и побега у проростков *A. retroflexus* и *A. rugosa*. Интоксикация $CdCl_2$ происходила на фоне увеличения концентрации МДА, активности СОД, ПОК и уменьшения суммарного содержания низкомолекулярных антиоксидантов в клетках проростков *A. retroflexus* и *A. rugosa*.

На основе полученных результатов предположено, что наряду с известным механизмом токсического действия ионов кадмия на физиологические и морфологические характеристики, связанного с модификацией сульфгидрильных групп белков, принимающих участие в процессах клеточного деления растущих апикальных клеток растения (корень, проросток) [15, 17], существенный вклад вносит прооксидантное действие Cd^{+2} и антиоксидантное (в первую

очередь за счет низкомолекулярных антиоксидантов). Высокий уровень Σ НМАО даже позволяет проростку при низких концентрациях ионов Cd^{+2} (5 мкМ) на стадиях «второй, третий лист» повышать их выживаемость. Хотя модификационное действие ионов Cd^{+2} на сульфгидрильные группы белков, принимающих участие в митозе, т.е. на уменьшении таких физиологических характеристик как длина корешка и побега, это не сказывается. Также показано, что активация ПОК и СОД в клетках проростков *A. retroflexus* и *A. rugosa*, которая была вызвана увеличением концентраций супероксид радикала и перекисей (водорода и органических), по-видимому, не являются основным токсическим фактором при интоксикации CdCl_2 , так как эти параметры не коррелировали с изменением физиологических и морфологических характеристик. Выявлено, что два различных вида, такие как *Amaranthus retroflexus* и *Agastache rugosa* проявили схожую ответную реакцию на интоксикацию хлоридом кадмия (II).

Работа выполнена в рамках НИР VI.56.1.5. «Физиолого-биохимические механизмы формирования адаптивного потенциала, устойчивости и продуктивности растительных компонентов экосистем Южной и Центральной Якутии» (№ госрегистрации - 01201282194).

Библиографический список

1. Ревич, Б.А. Методические рекомендации по оценке степени загрязнения атмосферного воздуха населенных пунктов металлами по их содержанию в снежном покрове и почве / Б.А. Ревич, Ю.Е. Саэт, Р.С. Смирнова.- М.: ИМГРЭ, 1990. – 9 с.
2. Рассеянные элементы в бореальных лесах / В. В.Никонов, Н. В.Лукина, В. С. Безель [и др.]; отв. ред. А. С. Исаев. - М.: Наука, 2004. - 616 с.

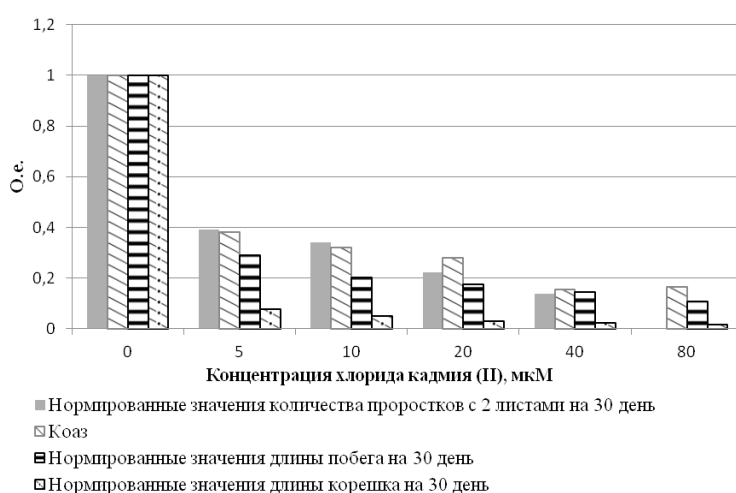


Рис. 3 - Нормированные значения физиологических, морфологических и биохимических характеристик проростков *Amaranthus retroflexus* при интоксикации CdCl_2

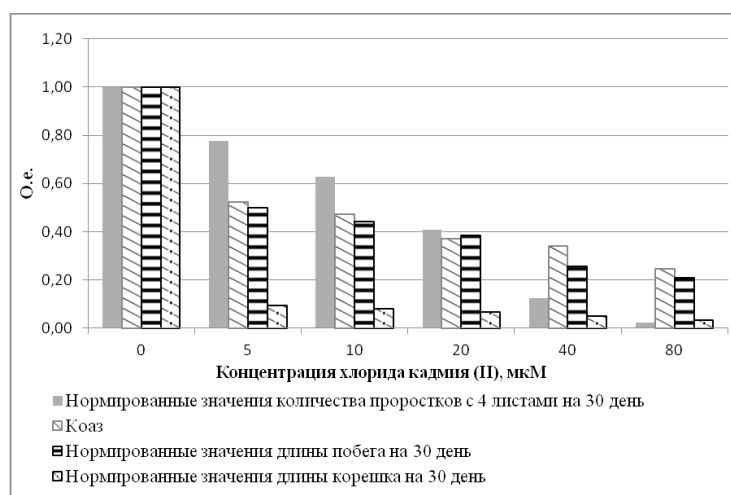


Рис. 4 - Нормированные значения физиологических, морфологических и биохимических характеристик проростков *Agastache rugosa* при интоксикации CdCl_2

3. Кулагин, А.А. Древесные растения и биологическая консервация ромышленных загрязнителей / А. А.Кулагин, Ю.А. Шагиева. - М.: Наука, 2005. - 190 с.

4. Серегин, И. В. Фитохелатины и их роль в детоксикации кадмия у высших растений / И. В. Серегин //Успехи биологической химии. - 2001. - Том 41. - С. 283-300.

5. Накопление кадмия и его распределение по органам у растений ячменя разного возраста / Ю. В.Батова, А. Ф.Титов, Н.М. Казнина, Г.Ф. Лайдинен // Труды Карельского научного центра РАН. - 2012. - Том 2. - С. 32-37.

6. Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to upper plant parts / J. A. C. Verkleij, A. Golan, Goldhirsh, D.M. Antosiewisz [et al.] // *Environ. Exp. Bot.* - 2009. - Vol. 67. - P. 10–22.
7. Серегин, И. В. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения / И. В. Серегин, В. Б. Иванов // *Физиология растений.* - 2001. - Том 48, № 4. - С. 606–630.
8. Устойчивость растений к тяжелым металлам / А. Ф. Титов, В. В. Таланова, Н. М. Казнина, Г. Ф. Лайдинен. - Петрозаводск: Карельский НЦ РАН, 2007. - 170 с.
9. Clemens, S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants / S. Clemens // *Biochimie.* - 2006. - Vol. 88. - P. 1707–1719.
10. Giannopolitis, C.N. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants / C.N. Giannopolitis, S.K. Ries // *Plant Physiol.* - 1977. - Vol. 59, № 2. - P. 309–314.
11. Рогожин, В. В. Методы биохимических исследований: учебное пособие / В. В. Рогожин. - Якутск, 1999. - 93 с.
12. Ермаков, А. И. Методы биохимического исследования растений / А. И. Ермаков. - Л.: Агропромиздат, 1987. - 430 с.
13. Владимиров, Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков. - М.: Наука, 1972. - 252 с.
14. Лакин, Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. - М.: Высшая школа. 1980. - 456 с.
15. Титов, А. Ф. Устойчивость растений к кадмию / А. Ф. Титов, Н. М. Казнина, В. В. Таланова. - Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2012. - 54 с.
16. Hochachka, P. W. Biochemical adaptation / P. W. Hochachka, G. N. Somero. - New Jersey: Princeton University Press, 1984. - 537 p.
17. Титов, А. Ф. Физиологические основы устойчивости растений к тяжелым металлам / А. Ф. Титов, В. В. Таланова, Н. М. Казнина. - Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2011. - 77 с.
18. Влияние малых концентраций ионов свинца и кадмия на развитие проростков ромашки лекарственной (*Matricaria chamomilla* L.) / Э. В. Филиппов, А. А. Шеин, И. А. Прокопьев, Г. В. Филиппова // *Наука и образование.* - 2014. - № 3. - С. 95–99.
19. Chen, L.M. Copper Toxicity in Rice Seedlings: Changes in Antioxidative Enzyme Activities, H₂O₂ Level, and Cell Wall Peroxidase Activity in Roots / L.M. Chen, C.C. Lin, C.H. Kao // *Bot. Bull. Acad. Sinica.* - 2000. - V. 41. - P. 99–103.
20. Прокопьев, И. А. Влияние техногенного загрязнения пылью, содержащей тяжелые металлы, на семенное потомство лебеды раскидистой / И. А. Прокопьев, Г. В. Филиппова, А. А. Шеин // *Физиология растений.* - 2012. - Том 59. - С. 238–243.
21. Michalak, A. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress / A. Michalak // *Pol. J. Environ. Stud.* - 2006. - V. 15. - P. 523–530.