

ДМИТРИЕВА О. О., БАШМАКОВ Д. И.
ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЭПИДЕРМАЛЬНЫХ КЛЕТОК *ALLIUM CEPA* L.
ПРИ КРАТКОВРЕМЕННОМ МЕТАЛЛИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

Аннотация. В работе исследованы эффекты регуляторов роста (РР) на жизнеспособность эпидермальных клеток лука при кратковременных экспозициях высоких (1 и 10 мМ) концентраций ионов тяжелых металлов (ТМ). Спустя 2 ч. экспозиции воздействие металлов достигало сублетального (на фоне 1 мМ Ni²⁺ и Cu²⁺, также 10 мМ Co²⁺, Zn²⁺ и Ni²⁺) и летального (на фоне 10 мМ Cu²⁺) уровня. В ряде случаев РР частично или полностью нивелировали возникающие под действием ионов ТМ негативные эффекты.

Ключевые слова: *Allium cepa* L., тяжелые металлы, жизнеспособность, регуляторы роста растений, эпидермальные клетки, кратковременный стресс.

DMITRIEVA O. O., BASHMAKOV D. I.
PROTECTIVE EFFECTS OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES
ON VIABILITY OF ONION (*ALLIUM CEPA* L.) EPIDERMAL CELLS
UNDER SHORT-TERM METAL STRESS

Abstract. We studied the effect of growth regulators (PGRs) on the viability of onion epidermal cells exposed to short-term metal stress (1 and 10 mM of heavy metal ions). After 2 h. the metal exposure has reached sub-lethal (at 1 mM Ni²⁺ or Cu²⁺ and 10 mM of Co²⁺, Zn²⁺ or Ni²⁺) and lethal (at 10 mM of Cu²⁺) levels. In some cases, the PGR neutralized (partially or completely) the negative HM effects.

Keywords: *Allium cepa* L., heavy metals, viability, onion epidermal cells, plant growth regulators, short-term stress.

В связи с проблемой загрязнения окружающей среды продуктами техногенеза тяжелые металлы (ТМ) стали объектом пристального внимания экологического мониторинга [2; 6]. Как и многие факторы среды, ТМ действуют на организм дозированно – их действие определяется не только концентрацией ионов, поступивших в клетку, но и продолжительностью экспозиции [2; 5; 13; 17]. Однако до сих пор чрезвычайно мало сведений о том, насколько быстро в клетках может развиваться окислительный стресс и последующие за ним окислительные повреждения мембран и органелл. К тому же, в естественных условиях ТМ на своем пути минуют многочисленные барьеры, препятствующие их продвижению по растению [13].

В современной агрономической практике используется большое количество искусственных и натуральных биологически активных веществ (БАВ), способных защитить

растения от холода, жары, засухи и других неблагоприятных факторов, повысить количество и качество урожая [1; 7; 8; 13–16; 19; 20]. Цель нашей работы – изучить влияние природных и синтетических БАВ на жизнеспособность растительных клеток на фоне непосредственного (на тканевом уровне) действия ТМ.

Постановка эксперимента. Клетки эпидермальной ткани луковицы лука (*Allium cepa* L.) сорта «Кабачок» помещали в чашки Петри на растворы, содержащие 1 мМ или 10 мМ ионов ТМ (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} или Co^{2+}). Контролем была дистиллированная вода. Половина чашек Петри из каждого варианта опыта содержала тот или иной синтетический или природный регулятор роста (РР): 10 нМ тидиазурина (TDZ); 0,1 мкМ цитодефа (CTD); 25 ppm 6-бензиламинопурина (6-БАП); 0,1% гумат+7 (HUM) или иммуноцитифита (ICP – 10 мкМ этилового эфира арахидоновой кислоты). По истечении 2 ч. эпидермальную ткань лука погружали в гипертоничный раствор NaCl и через световой микроскоп Биолам ЛОМО С1 (увеличение 150), по наличию или отсутствию плазмолиза, подсчитывали количество живых и погибших клеток в 4–5 полях зрения в каждом варианте опыта. Опыт повторяли трижды. Результаты обрабатывали статистически по общепринятым биометрическим формулам. Значения в таблицах и на рисунке представлены в виде «среднее арифметическое \pm стандартная ошибка среднего арифметического».

Из полученных в ходе экспериментов данных следует, что количество живых клеток в контроле на протяжении опыта оставалось на уровне около 85%. Ионы ТМ по-разному влияли на жизнеспособность эпидермальных клеток. Количество живых клеток в растворах, содержащих 1 мМ ионов Ni^{2+} , Co^{2+} и Zn^{2+} после двухчасовой экспозиции оставалось на уровне контроля, в то время как та же концентрация Cu^{2+} вызывала снижение числа жизнеспособных клеток на 13%. Имела место тенденция к уменьшению количества живых клеток с увеличением концентрации ТМ. Однако в среде, содержащей ионы Cu^{2+} и Ni^{2+} , наблюдали резкое существенное снижение жизнеспособности клеток. Как показали полученные результаты, Co и Zn лучше других металлов поддерживали жизнедеятельность растительных клеток, в то время как спустя 2 ч. экспозиции растворы, содержащие ионы Ni и Cu убивали от 5–12 до 11–30% клеток эпидермальной ткани лука (по сравнению с водным контролем).

Согласно методике, предложенной М. Н. Прозиной [4], если количество жизнеспособных клеток в той или иной токсичной среде меньше контрольной на 20% и более, то эта доза токсиканта считается летальной. Соответственно, если процент живых клеток в среде выше или на уровне контроля, то данная доза поддерживает жизнеспособность клеток и может считаться витальной (оптимальной). Сублетальные дозы, снижающие жизнеспособность клеток, лежат между этими экологическими зонами.

Можно заключить, что при кратковременном воздействии ионов Zn^{2+} и Co летальная

зона находилась вне исследованных концентраций. Сублетальными были обе исследованные концентрации Ni^{2+} . Летальным для клеток лука оказалось 2 ч. действие 10 мМ ионов Cu^{2+} .

Из таблицы видно, что синтетические и природные регуляторы роста оказывали неодинаковое влияние на жизнеспособность клеток по сравнению водным контролем. Так, в среде, содержащей синтетические регуляторы роста тидиазурон и цитодеф, количество живых клеток достоверно снижалось относительно водного контроля на 6% и 9% соответственно. Природные регуляторы роста сами по себе не влияли на жизнеспособность эпидермальных клеток. Однако, на фоне ТМ, положительный эффект синтетических регуляторов роста был более заметен по сравнению с таковым у природных. Так, в растворах, содержащих 1 мМ ионов ТМ, синтетические регуляторы роста поддерживали жизнеспособность клеток лука в оптимальной и субоптимальной зонах в 92% случаев, против 75% – у природных регуляторов. При увеличении концентрации до 10 мМ эффективность синтетических и природных регуляторов роста значительно падала (они поддерживали количество живых клеток на уровне водного контроля в 42% и 38% соответственно).

Таблица

Жизнеспособность эпителиальных клеток лукавицы *Allium cepa* L. при действии тяжелых металлов и регуляторов роста растений, % к водному контролю

Вариант опыта	Без РР	Регуляторы роста растений					
		синтетические			природные		
		CTD	TDZ	6-БАП	HUM	ICP	
Вода	100 ± 0,7	81,3 ± 6,7	93,7 ± 1,4	100,3 ± 1,7	99,6 ± 1,7	97,9 ± 2	
Co	1 мМ	98,7 ± 1,2	109,8 ± 1,5	99,5 ± 2,6	104,2 ± 7,4	107 ± 1,4	97,6 ± 1,7
	10 мМ	96,9 ± 1,4	107,9 ± 1,2	95,9 ± 2,9	94,6 ± 6,9	103,6 ± 2,8	97,2 ± 2,5
Zn	1 мМ	100 ± 0,9	94,6 ± 3,2	100 ± 4,9	99,9 ± 2	99,1 ± 2,4	91,3 ± 1,1
	10 мМ	96,5 ± 0,9	94,5 ± 2,2	103,5 ± 5,5	101 ± 3	98,6 ± 1,5	89,2 ± 2,2
Ni	1 мМ	94 ± 1,1	96,5 ± 4,6	100,1 ± 4,2	99,5 ± 2	92,2 ± 0,8	101,5 ± 2,4
	10 мМ	85,8 ± 1,9	94,2 ± 3,1	94,6 ± 3,1	100,4 ± 2,9	87,8 ± 5,3	82,4 ± 4,6
Cu	1 мМ	85,4 ± 8,6	92,1 ± 1,3	106,3 ± 2,5	100 ± 1,8	102,5 ± 2,7	97,4 ± 1,8
	10 мМ	64,2 ± 8,1	24,8 ± 1,6	23,3 ± 1,6	49,2 ± 3,5	88,6 ± 2,4	78,8 ± 2,4

	— витальная (оптимальная) зона
	— субоптимальная зона
	— сублетальная (пессимальная) зона
	— летальная зона

Кроме того, можно оценить относительную эффективность регуляторов роста, сравнивая жизнеспособность эпидермальных клеток в обработанных и необработанных РР вариантах. Можно констатировать, что реакция клеток на регуляторы роста металлоспецифична. Так, на фоне 1 мМ исследованных ТМ наиболее эффективны следующие регуляторы роста: на фоне Ni – иммуноцитифит и тидиазурон, на фоне Co – цитодеф и гумат+7, на фоне Cu – тидиазурон и гумат, на фоне Zn – ни один из исследованных РР существенно не повышал жизнеспособности клеток (рисунок 1, А). При увеличении концентрации ТМ до 10 мМ наибольший эффект оказывали: при повышенном содержании Ni – 6-БАП, Co – цитодеф и гумат+7, Cu – гумат+7 и иммуноцитифит, Zn – тидиазурон (рисунок 1, Б).

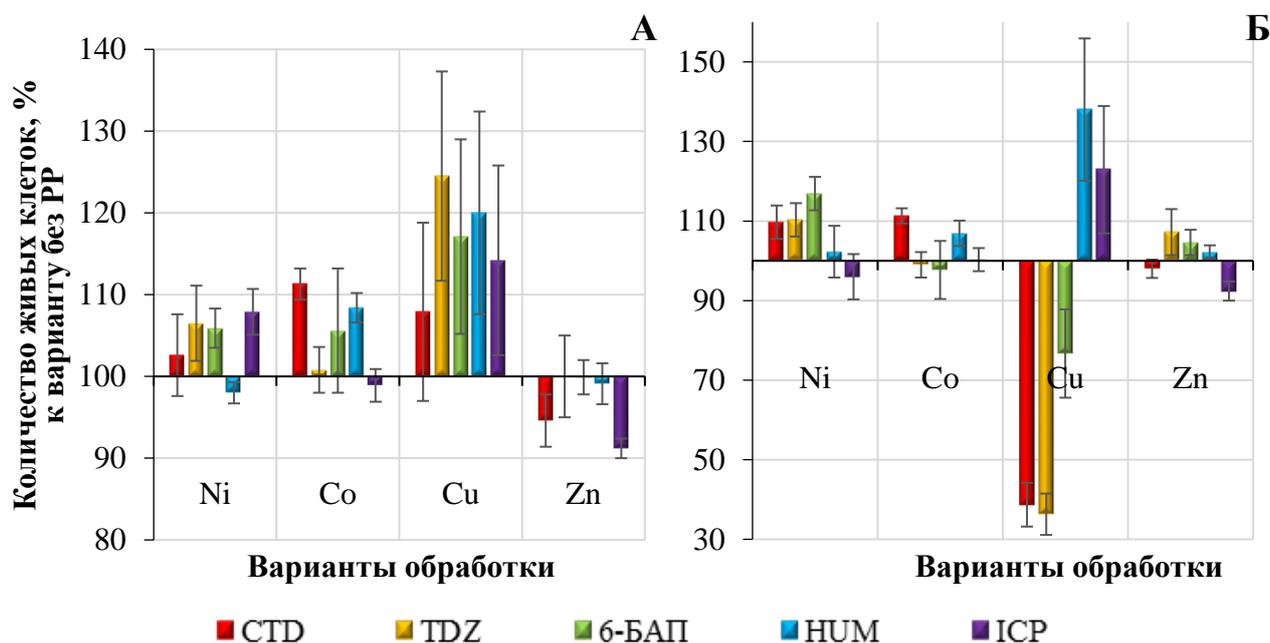


Рис. 1. Сравнительная эффективность регуляторов роста на фоне А – 1 мМ и Б – 10 мМ ТМ.

Таким образом, при кратковременном сильном Zn-стрессе тидиазурон оказывал слабый протекторный эффект на клетки лука. В присутствии ионов Co^{2+} слабоэффективны: тидиазурон, 6-БАП и иммуноцитифит; на фоне ионов Cu^{2+} – синтетические РР, а на фоне ионов Ni^{2+} – природные РР.

Мы предполагаем, что в условиях проведенного эксперимента в вариантах без РР наблюдались прямые последствия развития окислительного стресса [3; 5; 9; 11; 12; 17; 18], который уже в течение нескольких часов убивал значительное число эпидермальных клеток. В ряде вариантов с РР, очевидно, уже успевали активироваться механизмы устойчивости [7; 8; 10; 13–16; 19; 20], ущерб от окислительных повреждений был частично или полностью нивелирован. Однако влияние высоких (10 мМ) концентраций металлов все же приводило к летальным уровням АФК и гибели клеток.

Выводы.

1. Токсичность всех изученных ТМ возрастала с повышением их концентраций, однако этот эффект проявлялся в большей степени на фоне ионов Ni^{2+} и Cu^{2+} .

2. Спустя 2 ч. экспозиции эпидермальных клеток на растворах, содержащих регуляторы роста, успевали включаться протекторные механизмы, которые в ряде случаев частично или полностью нивелировали возникающие под действием ионов металлов окислительные повреждения.

3. Степень эффективности регуляторов роста металлоспецифична. При сильном загрязнении среды металлами наибольший эффект оказывали: при повышенном содержании Zn – тидиазурон, Co – цитодеф и гумат⁺, Ni – синтетические препараты цитокининового типа действия, Cu – природные регуляторы роста.

ЛИТЕРАТУРА

1. Башмаков Д. И., Лукаткин А. С., Духовскис П. В., Станис В. А. Влияние синтетических регуляторов роста на ростовые реакции огурца и кукурузы при действии тяжелых металлов // Доклады российской академии сельскохозяйственных наук. – 2007. – № 5. – С. 20–21.
2. Башмаков Д. И., Лукаткин А. С. Эколого-физиологические аспекты аккумуляции и распределения тяжелых металлов у высших растений / под ред. А. С. Лукаткина. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2009. – 236 с.
3. Колупаев Ю. Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции // Вестн. Харьковского нац. аграрн. ун-та. Сер. Биология. – 2007. – № 3. – С. 6–26.
4. Прозина М. Н. Микроскопическая техника. – М.: Высшая школа, 1960. – 198 с.
5. Сазанова К. А., Башмаков Д. И., Лукаткин А. С. Генерация супероксидного анион-радикала в листьях растений при хроническом действии тяжелых металлов // Тр. КарНЦ РАН. Сер. Экспериментальная биология. – 2012. – № 2. – С. 119–124.
6. Титов А. Ф., Таланова В. В., Казнина Н. М., Лайдинен Г. Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам // Институт биологии Кар. НЦ РАН. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. – 172 с.
7. Яхин О. И., Лубянов А. А., Серегин И. В., Яхин И. А. Влияние регуляторов роста на накопление тяжелых металлов и проявление их токсического действия у высших растений // Агрехимия. – 2014. – № 12. – С. 61–78.
8. Argueso C. T., Raines T., Kieber J. J. Cytokinin signaling and transcriptional networks. Curr. Opin // Plant Biol. – 2010. – Vol. 13. – pp. 533–539.
9. Barconi D., Bernardini G., Santucci A. Linking protein oxidation to environmental

pollutants: redox proteome approaches // *J. Proteomics*. – 2011. – Vol. 74, No 11. – pp. 2324–2337.

10. Bartoli C. G., Casalongue C. A., Simontacchi M. Marquez-Garcia B. Interaction between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress // *Environ. Exp. Bot.* – 2013. – Vol. 94. – pp. 73–88.

11. Dietz K. J., Baier M., Kramer U. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants // *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems* / Eds. M. N. V. Prasad, J. Hagemeyer. – Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1999. – pp. 73–97.

12. Finkel T., Holbrook N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing // *Nature*. – 2000. – Vol. 408, No 9. – pp. 239–247.

13. Gangwar S., Singh V. P., Tripathi D. K., Chauhan D. K., Prasad Sh. M. and Maurya J. N. Plant Responses to Metal Stress: The Emerging Role of Plant Growth Hormones in Toxicity Alleviation // *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance, Volume 2: A Sustainable Approach* / Ed. by P. Ahmad and S. Rasool. – Chapter 10. – Elsevier Inc., 2014. – pp. 215–248.

14. Ha S., Vankova R., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Phan Tran L. S. Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses // *Trends Plant Sci.* – 2012. – Vol. 17. – pp. 172–179.

15. Hamayun M., Khan S. A., Khan A. L., Shin J. H., Ahmad B., Shin D. H. et al. Exogenous gibberellic acid reprograms soybean to higher growth and salt stress tolerance // *J. Agric. Food Chem.* – 2010. – Vol. 58. – pp. 7226–7232.

16. Iqbal M., Ashraf M. Gibberellic acid mediated induction of salt tolerance in wheat plants: growth, ionic partitioning, photosynthesis, yield and hormonal homeostasis // *Environ. Exp. Bot.* – 2013. – Vol. 86. – pp. 76–85.

17. Maksymiec W. Signaling responses in plants to heavy metal stress // *Acta Physiol. Plant.* – 2007. – Vol. 29. – pp. 177–187.

18. Sytar O., Kumar A., Latowski D., Kuczynska P., Strzałka K., Prasad M. N. V. Heavy metal-induced oxidative damage, defence reactions, and detoxification mechanisms in plants // *Acta Physiol. Plant.* – 2013. – Vol. 35. – pp. 985–999.

19. Thomas J. C., Perron M., LaRosa P. C., Smigocki A. C. Cytokinin and the regulation of a tobacco metallothionein-like gene during copper stress // *Physiol. Plant.* – 2005. – Vol. 123. – pp. 262–271.

20. Wilkinson S., Kudoyarova G. R., Veselov D. S., Arkhipova T. N., Davies W. J. Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management // *J. Exp. Bot.* – 2012. – Vol. 63. – pp. 3499–3509.