

ВЛИЯНИЕ МЕДИ НА РОСТ *CALENDULA OFFICINALIS* L. И ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ ЕЕ В ОРГАНАХ РАСТЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ВОДНОЙ КУЛЬТУРЫ

Л.А. Стеценко

к.б.н., ст. науч. сотрудник, Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (Москва)
E-mail: larstet@mail.ru

Исследовано влияние меди на накопление биомассы надземной части растений и корней, содержание воды и фотосинтетических пигментов в листьях *Calendula officinalis* L. в условиях водной культуры. Определено содержание меди в корнях, листьях и соцветиях календулы в период вегетативного роста и цветения. Установлено, что календула устойчива к действию меди, аккумуляция этого элемента в растении органоспецифична. Во всех вариантах эксперимента накопление меди в корнях было выше, чем в надземной части растения. Показано, что наиболее высокий уровень аккумуляции меди – в листьях среднего яруса, однако в листьях верхушки побега содержание меди снижалось, а наиболее заметное снижение наблюдали в цветках.

Ключевые слова: *Calendula officinalis* L., аккумуляция меди, распределение меди в органах растения.

Высокая потребность фармацевтической промышленности в растительном сырье приводит к необходимости выращивания лекарственных растений на плантациях. Основной спрос приходится на такие виды лекарственного растительного сырья, как ромашка, шалфей и календула [1].

С ухудшением экологической обстановки возникли несвойственные для природы концентрации тяжелых металлов (ТМ) в почве и повышенная аккумуляция их в растениях. Наиболее подвержены загрязнению почвы промышленно развитых регионов. Например, в Московской области 40% земли занимают почвы, загрязненные ТМ, среди которых отмечены кадмий, свинец, цинк и медь [2]. Представляет интерес исследование аккумуляции меди растениями, поскольку в малых количествах медь является необходимым элементом минерального питания растений, а избыток меди оказывает значительное ингибирующее действие на их рост и развитие [3, 4].

Медь, являясь одним из важнейших эссенциальных элементов в метаболизме человека, животных и растений, участвует в окислительно-восстановительных процессах, входит в качестве кофермента в состав большого числа ферментов [3]. В отдельных случаях возникают предпосылки для развития дефицита микроэлементов у человека (железа, цинка, селена, меди и др.), и дополнением к лекарственным средствам могут стать лекарственные растения, в которых эти элементы

находятся в органически связанной, т.е. наиболее доступной и усвояемой форме [4].

Причинами накопления меди в почве являются сточные и талые воды, свалки, минеральные удобрения, отходы промышленных производств, использование медьсодержащих препаратов для борьбы с болезнями и вредителями сельскохозяйственных культур и др. [2, 5, 6]. Медь в качестве загрязнителя относится ко второму классу опасности [2]. При избытке меди в почве угнетается рост растений, изменяется их морфология, происходят изменения на клеточном уровне, которые проявляются в нарушении мембранных структур митохондрий, хлоропластов и др. [3, 4]. Значительное число исследований посвящено изучению влияния избытка ТМ в почве, в частности меди, на растения [3–7]. Известно, что токсичность ТМ зависит не только от их концентрации в почве, значительное влияние имеет еще подвижность металлов, рН среды, емкость катионного поглощения и состава почвы, степень увлажнения и другие факторы [7]. В связи с этим представляет интерес изучение влияния меди и ее накопления в растениях при выращивании в условиях водной культуры, которая позволяет соблюдать точные дозировки солей меди в среде выращивания.

Цель работы – исследование устойчивости календулы к меди в условиях водной культуры и долгосрочного выращивания растений на средах, содержащих широкий диапазон концен-

траций меди, а также в определении аккумуляции этого элемента в различных органах растения в период вегетативного роста и цветения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования выбрано растение *Calendula officinalis* L. Семена календулы сорта Кальта, полученные в ФГБНУ ВИЛАР (Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений), проращивали в термостате на увлажненной фильтровальной бумаге при температуре 24–25 °С. Проростки переносили на водную среду Хогланда–Снайдерс модифицированного состава (10 мМ KNO₃, 7,4 мМ KH₂PO₄, 4,1 мМ MgSO₄·7H₂O, 4,2 мМ Ca(NO₃)₂·4H₂O, 1,77 мкМ MnSO₄·5H₂O, 8,87 мкМ H₃BO₃, 1,0 мкМ ZnSO₄·7H₂O, 0,32 мкМ CuSO₄·5H₂O, 0,026 мкМ (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 28,7 мкМ FeSO₄·7H₂O), pH среды 6,5±0,2 и выращивали в условиях водной культуры в камере фитотрона при 12-часовом фотопериоде (натриевые лампы Reflux-250, Россия), освещенности 100±20 мкмоль/м²·с, температуре воздуха 23±3/18±3 °С (день/ночь) и относительной влажности воздуха 55/70% (день/ночь). По достижении растениями возраста три недели в питательную среду опытных вариантов одноразово внесли CuSO₄ до концентраций 50, 100, 200 и 300 мкМ Cu. В каждом варианте использовали 9–12 растений, которые размещали по 2–3 растения в 1-литровые сосуды. Смену питательной среды во всех сосудах проводили каждые 6–7 сут. Продолжительность опыта составила 30 сут. В части контрольных и опытных растений через 7 сут экспозиции на указанных средах были измерены физиологические параметры (биомассу корней и надземной части, содержание воды и фотосинтетических пигментов в листьях), содержание меди в корнях, в листьях 1–3-го ярусов и в листьях верхушки побега. Остальные растения продолжали выращивать до появления бутонов. Через 30 сут экспозиции контрольных и опытных растений на указанных средах определяли содержание меди в листьях 3-го яруса и в цветочных корзинках.

Биомассу растений измеряли общепринятым гравиметрическим методом с точностью до 0,1 мг. Содержание фотосинтетических пигментов определяли по методу, представленному в работе [8].

Содержание меди в растительных образцах устанавливали методом атомно-абсорбционной спектроскопии. Для удаления адсорбирован-

ных на поверхности корней ионов меди перед фиксацией корневую систему растений последовательно промывали водопроводной водой, затем 5 мин 10 мМ ЭДТА и дистиллированной водой согласно методу, описанному в [3]. Растительный материал сушили при 60 °С до постоянной массы. Навеску воздушно-сухого материала (~ 50 мг) заливали смесью концентрированной азотной (1,6 мл) и хлорной (0,8 мл) кислот и выдерживали сутки при комнатной температуре, затем инкубировали в термостате TDB-A-400 («BioSan», Латвия) последовательно при температурах 150 °С (1,5 ч) и 180 °С (2 ч). После окончания данной процедуры в охлажденные образцы добавляли 37% H₂O₂ до осветления смеси и прекращения вспенивания. Пробы доводили до требуемого объема бидистиллированной водой. Анализ содержания меди в полученных пробах проводили на атомно-абсорбционном спектрофотометре Формула ФМ400 («ЛабИст», Россия) с применением ламп с полым катодом («Hamamatsu Photonics», Япония).

Данные трех биологических и нескольких аналитических повторностей обрабатывали методами параметрической статистики в среде Microsoft Excel 2007. Бары на рисунках обозначают стандартные отклонения от среднего при 5%-ном уровне значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выращивание растений календулы в течение 7 сут в присутствии 50–300 мкМ Cu приводило к снижению прироста биомассы, которое находилось

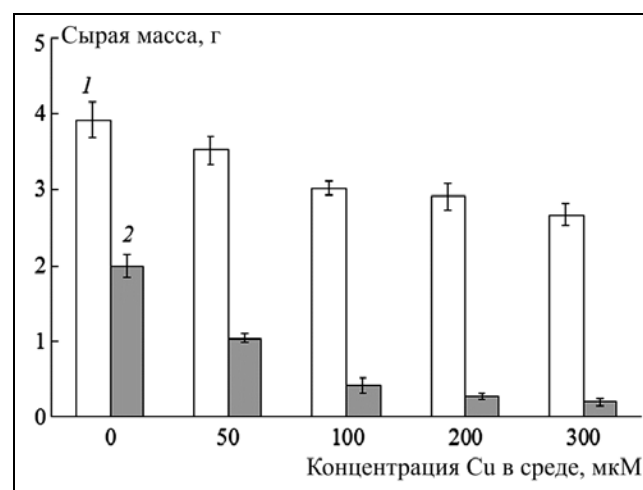


Рис. 1. Изменение массы надземной части растений (1) и корневой системы (2) календулы после 7 сут выращивания растений на средах, содержащих 50–300 мкМ Cu

в прямой зависимости от концентрации меди в среде (рис. 1). Наиболее сильно ингибировался прирост биомассы в корнях и в листьях верхушки побега. О снижении прироста массы в корнях косвенно свидетельствует отношение надземной массы растений к массе корня, которое в контроле составляло в среднем 2, а через 7 сут экспозиции на средах в присутствии 50, 100, 200 и 300 мкМ Cu величина отношения составила в среднем 3, 7, 10 и 13 соответственно. При концентрации меди в среде 200–300 мкМ наблюдали появление некротических пятен на листьях нижних ярусов. Следует отметить,

что и через 30 сут роста на среде с медью растения всех вариантов зацвели и сохраняли жизнеспособность, что свидетельствует о высокой устойчивости растений календулы к меди.

Через 7 сут экспозиции в контрольных и опытных растениях были отобраны пробы для определения содержания воды в листьях 1–3-го ярусов. Во всех вариантах эксперимента оводненность листьев снижалась с повышением их ярусности (рис. 2). С ростом концентрации меди в среде понижалось не только содержание воды в целом растении (рис. 2), но снижалось также содержание фотосинтетических пигментов в листьях календулы (рис. 3). Сумма фотосинтетических пигментов в листьях растений в присутствии 100 и 300 мкМ Cu в среде за 7 сут экспозиции понизилась и от значений контрольных растений составила 80 и 58% соответственно (рис. 3).

Выявлена неравномерность накопления и распределения ионов меди в растениях *Calendula officinalis* L. Содержание меди в корнях зависело

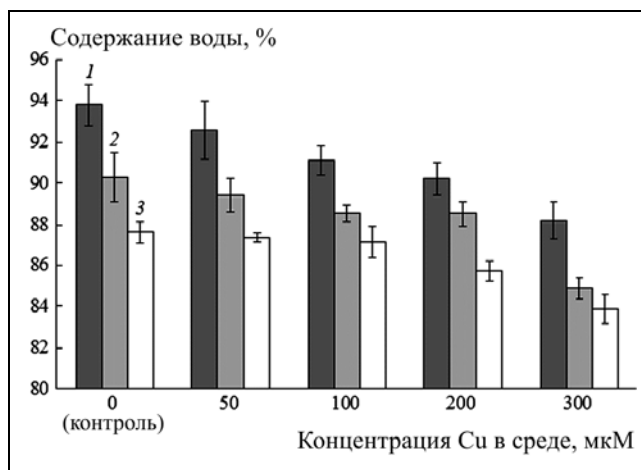


Рис. 2. Содержание воды в листьях 1–3-го ярусов календулы после 7 сут выращивания растений на средах, содержащих 50–300 мкМ Cu: 1 – первый ярус листьев; 2 – второй ярус листьев; 3 – третий ярус листьев

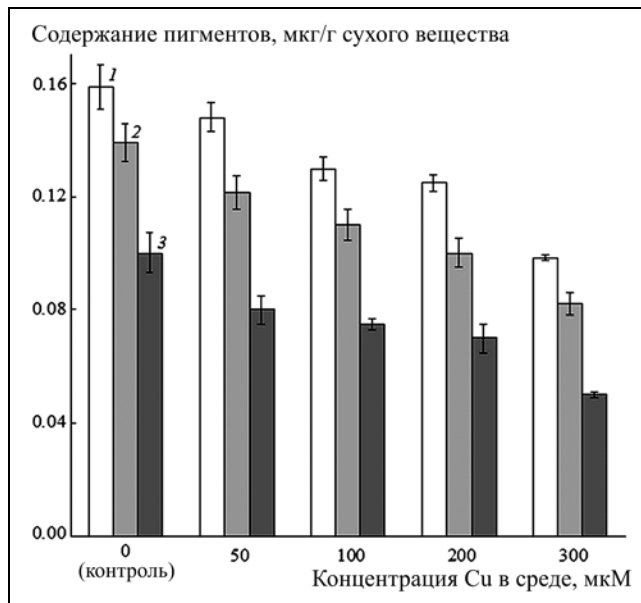


Рис. 3. Содержание хлорофилла a (1), хлорофилла b (2) и каротиноидов (3) в листьях календулы после 7 сут выращивания растений на средах, содержащих 50–300 мкМ Cu

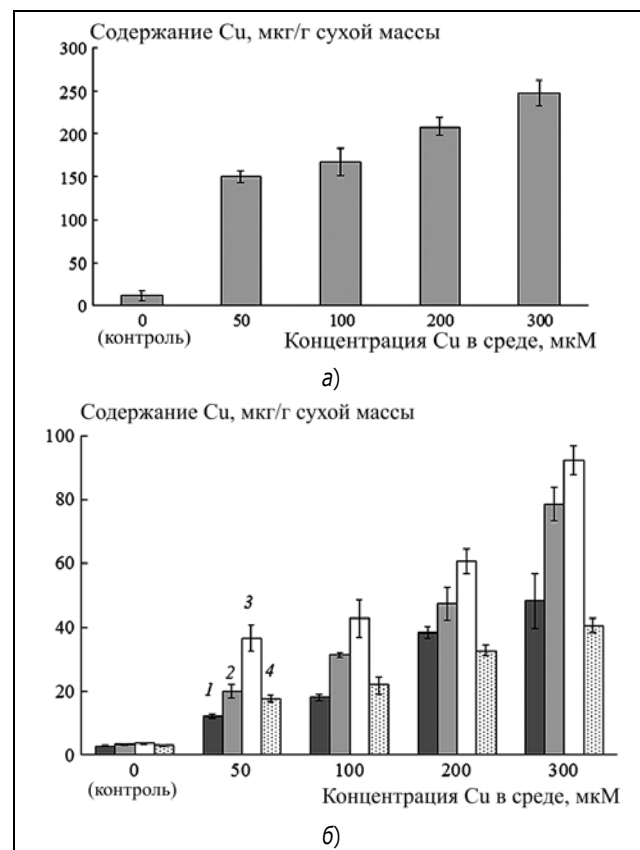


Рис. 4. Накопление меди в корнях календулы (а) и в листьях различных ярусов (б) после 7 сут выращивания растений на средах, содержащих 50–300 мкМ Cu: 1 – листья первого яруса; 2 – листья второго яруса; 3 – листья третьего яруса; 4 – листья верхушки побега

от концентрации Cu в среде и было максимальным для варианта 300 мкМ Cu (рис. 4,а) и значительно превышало содержание меди в листьях (рис. 4,б).

По способности к аккумуляции металлов выделяют две контрастные группы растений: исключатели, у которых поглощаемые металлы задерживаются в корневой системе и незначительно поступают в побеги, и гипераккумуляторы, у которых они накапливаются в больших количествах в надземных органах без видимого нарушения метаболизма [6]. Действие ТМ на рост растений зависит от особенностей их тканевого и внутриклеточного распределения. Согласно этой классификации, растения календулы занимают промежуточное положение, поскольку при выращивании на средах, содержащих медь, накопление этого элемента происходит во всех органах растения. Исследование аккумуляции меди в 1–3-м ярусах листьев и в листьях верхушки побега календулы показало, что во всех вариантах опыта наибольшая концентрация меди наблюдалась в листьях 2-го и 3-го ярусов (рис. 4,б). Содержание меди в верхушечных листьях за 7 сут экспозиции растений на среде 300 мкМ Cu в среднем было в 2 раза ниже, чем ее содержание в листьях 3-го яруса (рис. 4,б). При исследовании накопления

цинка и меди в корнях и в надземных органах малины в фазе плодоношения также было отмечено снижение содержания этих металлов в верхушечных листьях побегов [7].

На 30-е сут эксперимента в растениях, которые выращивались на среде с добавлением 50, 100, 200 и 300 мкМ Cu, содержание меди в листьях 3-го яруса повысилось по сравнению с контрольными значениями в среднем в 13, 16, 22 и 33 раза соответственно (таблица). В конце 3-й недели от начала эксперимента появились бутоны и соцветия в контрольных растениях и в растениях, которые выращивались на среде 50 мкМ Cu. На 25–30-е сут зацвели растения остальных вариантов опыта. На 30-е сут эксперимента содержание меди в цветочных корзинках опытных растений по сравнению с контрольными значениями повысилось в среднем в 3, 5, 6 и 8 раз соответственно увеличению концентрации меди в среде (таблица). Сравнительные данные показывают, что интенсивность накопления меди в цветочных корзинках была намного ниже, чем в листьях 3-го яруса растений, и, возможно, свидетельствуют о наличии физиологического барьера, препятствующего избыточному накоплению меди в генеративных органах календулы.

Таблица. Содержание меди в листьях 3-го яруса и в цветочных корзинках *Calendula officinalis* L. после 30 сут экспозиции растений в присутствии 50–300 мкМ Cu

Образец	Содержание Cu в питательной среде, мкМ				
	0 (контроль)	50	100	200	300
Листья 3-го яруса, мкг Cu / г сухой массы	4,2±0,21	54,1±2,71	68,3±0,34	94,5±4,72	140,4±0,72
Цветочные корзинки, мкг Cu / г сухой массы	3,6±0,17	9,4±0,47	15,2±0,76	18,4±0,92	28,3±0,14

Выводы

1. Растения календулы довольно устойчивы к действию меди.
2. Аккумуляция меди в растении *Calendula officinalis* L. органоспецифична. Во всех вариантах эксперимента накопление меди в корнях было выше, чем в надземной части растения. Наиболее высокий уровень аккумуляции меди отмечали в средних ярусах листьев. В листьях верхушки побега содержание меди снижалось, и наиболее заметное снижение наблюдали в цветках.
3. Полученные данные могут найти применение при исследовании действия различных ТМ на рост растений, а также при оценке качества растительного лекарственного сырья.

ЛИТЕРАТУРА

1. Куркин В.А., Шарова О.В., Афанасьева П.В. и др. Перспективы создания высокопродуктивной сырьевой базы календулы лекарственной // Известия Самарского научного центра РАН. 2012. Т. 14. № 1(9). С. 2249–2252.
2. Доклад о состоянии окружающей среды в Москве в 2012 году. Правительство Москвы, Департамент природопользования и охраны окружающей среды города Москвы / Под общ. ред. А.О. Кульбачевского). М.: Спецкнига. 2012. 178 с.
3. Куликова А. Л., Кузнецова Н. А., Холодова В. П. Влияние избыточного содержания меди в среде на жизнеспособность и морфологию корней сои // Физиология растений. 2011. Т. 58. № 5. С. 719–727.
4. Ловкова М.Я., Бузук Г.Н. Лекарственные растения-концентраторы и сверхконцентраторы меди и ее роль в метаболизме этих видов // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 2. С. 209–216.
5. Демидчик В.В., Соколик А.И., Юрин В.М. Токсичность избытка меди и толерантность к нему растений // Успехи современной биологии. 2001. Т. 121. № 5. С. 511– 525.

6. Серёгин И.В., Кожеевникова А.Д., Давыдова М.А., Быстрова Е.И., Счат Н., Иванов В.Б. Роль тканей корня и побега растений исключателей и гипераккумуляторов в транспорте и накоплении никеля // ДАН. 2007. Т. 415. № 3. С. 422–424.
7. Леонтьева Л.И., Корнилов Б.Б., Прудников П.С., Леоничева Е.В. Накопление цинка и меди в органах и тканях малины (*Rubus idaeus* L.) при разном уровне минерального питания // Вестник Орловского государственного аграрного университета. 2015. Т. 57. №. 6. С. 65–71.
8. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids, pigments of photosynthetic biomembranes // *Methods in Enz.* 1987. V. 148. P. 350–382.

Поступила после доработки 10 июня 2017 г.

THE INFLUENCE OF COPPER ON THE GROWTH OF *CALENDULA OFFICINALIS* L. AND THE FEATURES OF THE ACCUMULATION IT IN THE PLANT ORGANS IN THE CONDITIONS OF WATER CULTURE

© L.A. Stetsenko, 2017

L.A. Stetsenko

Ph.D. (Biol.), Senior Research Scientist, Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS (Moscow)

E-mail: larstet@mail.ru

The effect of copper (50–300 μM) on the biomass of the aerial part of plants and roots, the content of water and photosynthetic pigments in the leaves of *Calendula officinalis* L. under the conditions of aquatic culture has been studied. The accumulation of copper in the roots, leaves and flowers of calendula has been determined. It is established that the calendula is quite resistant to the action of copper, and the accumulation of Cu in the plant is organospecific. In all variants of the experiments performed the content of copper in the roots was higher than in the plant aerial part. The highest level of copper accumulation was observed in the middle tiers of the leaves; in the leaves of the shoot tip, the copper content decreased and the most noticeable decrease was observed in the flowers.

Key words: *Calendula officinalis* L., copper accumulation, distribution of Cu in plant organs.

REFERENCES

1. Kurkin V.A., Sharova O.V., Afanas'eva P.V. i dr. Perspektivy sozdaniya vysokoproduktivnoj syr'evoj bazy kalenduly lekarstvennoj // *Izvestija Samarskogo nauchnogo centra RAN.* 2012. T. 14. № 1(9). S. 2249–2252.
2. Doklad o sostojanii okruzhajushhej sredy v Moskve v 2012 godu. Pravitel'stvo Moskvy, Departament prirodnopol'zovanija i ohrany okruzhajushhej sredy goroda Moskvy / Pod obshh. red. A.O. Kul'bachevskogo). M.: Speckniga. 2012. 178 s.
3. Kulikova A. L., Kuznecova N. A., Holodova V. P. Vlijanie izbytochnogo sodержaniya medi v srede na zhiznesposobnost' i morfologiju kornej soi // *Fiziologija rastenij.* 2011. T. 58. № 5. S. 719–727.
4. Lovkova M.Ja., Buzuk G.N. Lekarstvennye rastenija-koncentraty i sverhkoncentraty medi i ee rol' v metabolizme jetih vidov // *Prikladnaja biohimija i mikrobiologija.* 2011. T. 47. № 2. S. 209–216.
5. Demidchik V.V., Sokolik A.I., Jurin V.M. Toksichnost' izbytki medi i tolerantnost' k nemu rastenij // *Uspehi sovremennoj biologii.* 2001. T. 121. № 5. S. 511–525.
6. Serjogin I.V., Kozhevnikova A.D., Davydova M.A., Bystrova E.I., Schat N., Ivanov V.B. Rol' tkanej kornja i pobega rastenij isključatelej i giperakкумуляторов в транспорте и накоплении никеля // ДАН. 2007. Т. 415. № 3. С. 422–424.
7. Leont'eva L.I., Kornilov B.B., Prudnikov P.S., Leonicheva E.V. Nakoplenie cinka i medi v organah i tkanjah maliny (*Rubus idaeus* L.) pri raznom urovne mineral'nogo pitaniya // *Vestnik Orlovskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta.* 2015. T. 57. №. 6. S. 65–71.
8. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids, pigments of photosynthetic biomembranes // *Methods in Enz.* 1987. V. 148. P. 350–382.