



DOI: 10.22620/agrisci.2009.01.005

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛНИ ПРОМЕНИ В ЛИСТАТА НА *LACTUCA SATIVA* L. И *PHASEOLUS VULGARIS* L. ПРИ НАРАСТВАНЕ НА НИВАТА НА ТЕЖКИ МЕТАЛИ В КОРЕНОВАТА СРЕДА
STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHANGES IN THE LEAVES OF *LACTUCA SATIVA* L. AND *PHASEOLUS VULGARIS* L. GROWN AT EXCESS OF HEAVY METALS IN THE ROOT AREA

Анна Николова*, Андон Василев
Anna Nikolova, Andon Vassilev

Аграрен университет – Пловдив
Agricultural University of Plovdiv

*E-mail: maksimova.anna@gmail.com

Резюме

Бяха проведени лабораторни експерименти с *Phaseolus vulgaris* L. и *Lactuca sativa* L. с цел да се проучи реакцията на младите растения към повишаването на нивото на тежките метали (Cd, Zn, Cu) в хранителния разтвор. Бяха измервани както промените в анатомията на листа, така и фотосинтетичните параметри. Наблюдаваха се различни промени в устройството на листата под влияние на излишъка от тежки метали при проучваните видове. При салатните растения бяха наблюдавани класически ксероморфни промени в структурата на листа, докато фасулът реагира с мезоморфни промени като увеличаване на размера на епидермалните клетки и увеличаване на дебелината на листната петура. Параметрите и на газообмена, и на хлорофилната флуоресценция, които са показателни за фотосинтезата, бяха потиснати в еднаква степен при двата вида от приложения излишък от тежки метали.

Abstract

Lab experiments with *Phaseolus vulgaris* L. and *Lactuca sativa* L. have been carried out with the purpose of studying the responses of young plants to increasing levels of heavy metals (Cd, Zn, Cu) in the root area. Both leaf anatomy and photosynthetic parameters were measured. Different responses of leaf structure to excess heavy metals were detected in the studied species. In the case of lettuce plants, classical xeromorphic changes in the leaf structure have been observed, whereas common bean plants responded by having mesomorphic changes, such as increased size of the epidermal cells and increased thickness of the leaf blade. Both leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters, characteristic of the photosynthetic performance, were inhibited similarly by the applied excess heavy metals in both species.

Ключови думи: тежки метали, Cu, Zn, Cd, листна структура, мезофил, епидермис, устица, фотосинтеза.

Key words: heavy metals, Cu, Zn, Cd, leaf structure, mesophyll, epidermis, stomata, photosynthesis.

УВОД

Растенията притежават способност за структурно-функционална адаптация към стресови въздействия, в това число и към високи концентрации на тежки метали (ТМ) в средата. Излишъкът на ТМ в почвата предизвиква нарушения в кореновата система, които повлияват негативно водния режим и минералното хранене на растенията (Barcelo and Poschenrieder, 1990; Krupa et al., 2002). Отговорът на растенията включва механизми за съхраняване на оводнеността на тъканите като намаляване на транспирацията (Vassilev et al., 1998), анатомични изменения в листата и др. Израз на анатомична адаптация могат да бъдат: (1) уплътнената структура на листата, ограничаваща листния газов обмен в резултат на намаляване на размерите на клетките и

междуклетъчните пространства (Merakchiyska-Nikolova et al., 1990); (2) увеличеният брой на устицата с намалени размери за по-ефективен контрол върху транспирацията (Димитрова и съавт., 2001); (3) увеличените размери на клетките от гъбчестата паренхима за съхраняване на повече вода във вакуолите им (Papou-Filotheou et al., 2001) и др.

С придвижването си към надземните органи ТМ предизвикват индиректни и директни негативни ефекти върху фотосинтетичния процес (Krupa and Baszynski, 1995). Известно е, че ТМ понижават скоростта на CO₂ фиксацията поради повишаване на устичното лимитиране и за сметка на мезофилни нарушения, свързани с пигментния апарат, фотосинтетичния електронен транспорт и въглеродната асимилация (Vassilev and Yordanov, 1997).

Хроничното токсично въздействие на ТМ се проявява и върху други процеси при растенията и в крайна сметка потиска растежа, който е интегрален физиологичен процес (Breckle, 1991). Степента на отклонение от нормалното физиологично състояние зависи както от силата на приложения метален стрес, така и от структурно-функционалната пластичност на растителния вид. Във всички случаи обаче намалява продуктивността на растенията, което е изключително важно за адаптивното земеделие върху замърсени с ТМ почви. Това налага провеждането на изследвания върху структурно-функционалната адаптация на конкретни растителни видове към хронична метална фитотоксичност.

Целта на настоящото изследване е да се проучи реакцията на млади растения от видовете *Lactuca sativa* L. и *Phaseolus vulgaris* L. към токсични нива на тежките метали Cd, Cu и Zn в кореновата среда чрез проследяване на структурно-функционалните промени във фотосинтетичния им апарат.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Опитите са проведени със салатни (*Lactuca sativa* L., сорт "Жълта красавица") и фасулеви растения (*Phaseolus vulgaris* L., сорт "Лоди") при контролирани условия на средата, както е описано по-рано (Vassilev et al., 2007). Растенията от двата вида са отгледани като хидропонна култура върху перлит, в който ежедневно е внасян 1/2 хранителен разтвор на Хогланд. След първоначално развитие на растенията е заложена опитна постановка, включваща четири варианта: (1) контрола - хранителен разтвор без включване на ТМ; (2) хранителен разтвор с добавка на Cd, Cu и Zn в концентрации 50 µM, 20 µM и 500 µM, наречен *i ūēī à āī çà Ò*; (3) хранителен разтвор с добавка на 1/2 от пълната доза ТМ; (4) хранителен разтвор с 1/4 от пълната доза ТМ.

Третирането на растенията с ТМ продължава 8 дни, след което са определени: (1) свежата маса и площта на листата, (2) скоростта на фотосинтезата и интензивността на транспирацията чрез системата LCA-4 (ADC, England), (3) параметри на хлорофилната флуоресценция с апарата MINI-PAM (H. Walz, Germany) и (4) анатомични параметри на листната петура. Анатомичните и физиологичните анализи са правени върху първия същински лист при фасула и върху четвъртия лист при салатата.

Данните са обработени статистически чрез програмата ANOVA и достоверността на разликите е преценена чрез теста на Дънкан при $P=0,05$.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Приложеното комплексно замърсяване с нарастващи дози на Cd, Cu и Zn (1/4, 1/2 и пълна доза)

предизвиква прояви на хронична токсичност при салатните и фасулевите растения (Vassilev et al., 2007). Листната площ на третираните с ТМ растения намалява, като при пълната доза ТМ тя представлява 62 и 56% от контролите съответно за салатните и за фасулевите растения. По листата на салатните растения се наблюдава хлороза, която отсъства в първичните листа на фасулевите растения и е слабо проявена върху първия сложен лист.

Третирането с пълна доза ТМ предизвиква съществени промени в анатомичния строеж на листната петура при двата вида растения (табл. 1). В третираните салатни растения се наблюдава редуциране на дебелината на листната петура с 23%, което е резултат от намаляването на обема на листния мезофил. При стоматалния апарат на салатните растения е налице статистически доказано намаляване на широчината и дължината на устицата и по двете повърхности на листа. Броят на устицата обаче не се повлиява еднопосочно. Наблюдава се увеличаване на броя на устицата от долната повърхност с 29% и намаляване на броя им по горната повърхност на листа също с 29%. Това е съчетано и със статистически доказано увеличаване на броя на основните епидермални клетки по горната и по долната повърхност на листната петура, съответно с 31% и с 44%. Достоверно намаляват и размерите на устицата по двете повърхности.

Намаляването на дебелината на листната петура, увеличаването на броя на епидермалните клетки в съчетание с намаляване на броя и размерите на устицата по горната повърхност са класически пример за адаптация към стрес с развитие на ксероморфни признаци. Такава адаптация е наблюдавана и при третираните с ТМ растения (Merakchiyska-Nikolova et al., 1990; Димитрова и съавт., 2001). Според Barcelo and Poschenrieder (1990) развитието на ксероморфна структура в третираните с ТМ растения може в определена степен да се дължи на намалена еластичност на клетъчните стени поради отлагане на феноли, калоза, както и на повишена активност на йонно-свързаните пероксидази.

Третирането с ТМ предизвиква различна анатомична адаптация в листата на фасулевите растения. За разлика от салатните растения третирането с пълна доза ТМ при тях води до увеличаване на дебелината на листната петура с 37%. Налице е и различна насока на промяна в броя на основните епидермални клетки, които намалява и за двете повърхности на листа съответно с 44% за горната и с 8% за долната. Броят на устицата по горната повърхност намалява почти наполовина, докато по долната повърхност се повишава с 9%. Размерите на устицата не се изменят съществено. Подобен тип анатомична адаптация е наблюдаван при растенията от

Таблица 1. Анатомични показатели на листната петура на контролните и третираните с Cd, Cu и Zn салатни и фасулеви растения

Table 1. Anatomical parameters of the *Lactuca* and *Phaseolus* leaves - control and treated with Cd, Cu and Zn

Варианти Treatments	Дебелина на петурата (μm) Leaf thickness (μm)	Листна повърхност Leaf surface	Брой основни епидермални клетки (mm^2) Epidermal cells (mm^2)	Брой устица (mm^2) Stomata frequency (mm^2)	Дължина на устицата (μm) Stomata length (μm)	Широчина на устицата (μm) Stomata width (μm)
<i>Lactuca sativa</i> L.						
Контрола Control	212,6 ^a (100)	Горна/Upper Долна/Lower	798 ^a (100) 715 ^a (100)	412 ^a (100) 278 ^a (100)	28,0 ^a (100) 29,5 ^a (100)	22,6 ^a (100) 22,6 ^a (100)
Пълна доза ТМ Full dose HM	163,5 ^b (77)	Горна/Upper Долна/Lower	1046 ^b (131) 1032 ^b (144)	291 ^b (71) 359 ^b (129)	25,4 ^b (91) 25,4 ^b (86)	21,7 ^b (96) 21,5 ^b (95)
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.						
Контрола Control	191,1 ^a (100)	Горна/Upper Долна/Lower	487 ^a (100) 1116 ^a (100)	78 ^a (100) 394 ^a (100)	31,7 ^a (100) 25,3 ^a (100)	20,5 ^a (100) 17,9 ^a (100)
Пълна доза ТМ Full dose HM	262,4 ^b (137)	Горна/Upper Долна/Lower	323 ^b (66) 1031 ^b (92)	38 ^b (49) 431 ^b (109)	31,4 ^a (99) 23,5 ^a (93)	21,9 ^a (107) 18,3 ^a (102)

Представени са средни стойности на анализирания параметри. В скобите са посочени процентните стойности спрямо съответните контроли (100%) за долната и за горната повърхност на листната петура на двата вида. Стойностите, отбелязани с буква "b", се различават достоверно от съответните контроли при $P=0,05$.

The above represent the average values of the analyzed parameters. The brackets contain percentage values in relation to the relevant controls (100%) for the upper and lower surfaces of the leaves for both plant species. The values that are marked with the letter 'b', significantly differ from the relevant controls in the event where $P=0.05$.

риган, отглеждани в среда с излишък на Cu. Авторите Raouf-Filothou et al. (2001) установяват в своето изследване, че увеличената дебелина на листната петура се дължи на уголемяване на клетките на гъбчестата паренхима.

Различният характер на анатомичната адаптация в листата при двата растителни вида към въздействие с ТМ показва наличие на видова специфичност. Вероятно при листата на фасула увеличаването на дебелината на листната петура в конкретните условия е по-ефективният начин за съхраняване на оводнеността в сравнение със засилването на ксероморфизма, наблюдаван при салатните растения.

Третирането на растенията с ТМ предизвиква и функционални промени във фотосинтетичния апарат. Приведените в таблица 2 данни показват, че фотосинтетичната скорост (A) в третираните с 1/2 и с пълна доза ТМ растения от двата вида намалява

значително и статистически доказано. По-значително е потискането на фотосинтезата при салатните растения, където скоростта на CO_2 фиксацията при варианта с пълна доза ТМ е 46% от контролата, докато при съответния вариант от фасулевите растения е 37%. Третирането с ТМ намалява и интензивността на транспирацията (E) в салатните и фасулевите растения. С нарастване на нивата на ТМ в средата се наблюдава постепенно намаляване на транспирацията, което при салатните растения е в границите от 6 до 30%, а при фасулевите - от 11 до 26%. Намалените стойности на транспирацията кореспондират с установените анатомични промени в листата и са част от причините, водещи до потискане на фотосинтетичната скорост поради устично лимитиране на дифузията на CO_2 . Наред с това по-значителното инхибиране на фотосинтезата в сравнение с транспирацията дава известно основание да допуснем наличие и на мезофилни лимитации.

Таблица 2. Фотосинтетични параметри на контролните и на третираните с Cd, Cu и Zn салатни и фасулеви растения

Table 2. Photosynthetic parameters of the *Lactuca* and *Phaseolus* plants – control and treatment with Cd, Cu and Zn

A - скорост на нето фотосинтезата ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); E - интензивност на транспирацията ($\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); F_v/F_m - максимална ефективност на ФС2; ETR - скорост на фотосинтетичния електронен транспорт ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

A, net photosynthetic rate ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); E, transpiration rate ($\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); F_v/F_m , maximal capacity of FS2; ETR, apparent photosynthetic electron transport rate ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Варианти Treatments	A	E	F_v/F_m	ETR
<i>Lactuca sativa</i> L.				
Контрола/Control	14,12 ^a (100)	1,78 ^a (100)	0,82 ^a (100)	56 ^a (100)
¼ ТМ / ¼ НМ	12,28 ^b (87)	1,67 ^a (94)	0,77 ^a (94)	52 ^a (93)
½ ТМ / ½ НМ	10,56 ^{bc} (73)	1,39 ^b (78)	0,79 ^a (96)	41 ^b (73)
ТМ / НМ	7,56 ^c (54)	1,25 ^b (70)	0,68 ^b (83)	34 ^c (61)
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.				
Контрола/Control	12,06 ^a (100)	2,11 ^a (100)	0,81 ^a (100)	42 ^a (100)
¼ ТМ / ¼ НМ	11,54 ^a (96)	1,87 ^b (89)	0,79 ^{ab} (98)	38 ^b (90)
½ ТМ / ½ НМ	10,11 ^b (84)	1,76 ^b (83)	0,76 ^b (94)	28 ^c (67)
ТМ / НМ	8,14 ^c (67)	1,56 ^c (74)	0,71 ^c (88)	24 ^c (57)

Представени са средни стойности на анализирани параметри. В скобите са посочени процентните стойности на параметрите спрямо съответните контроли (100%) за двата вида. Стойностите, последвани от различни букви (a, b, c), се различават достоверно при $P=0,05$.

The above represent the average values of the analyzed parameters. The brackets contain percentage values in relation to the relevant controls (100%) for both plant species. The values that are marked with the letters 'a', 'b' and 'c' significantly differ from the relevant controls in the event where $P=0.05$.

Отношението вариабилна/максимална (F_v/F_m) флуоресценция характеризира функционалния потенциал на фотосистема 2, която е чувствителна към стресови въздействия. Прието е, че това отношение в неувредени листа е в границите 0,75–0,82 (Bolhar-Nordenkampf and Oquist, 1993). Данните за стойността на F_v/F_m (табл. 2) показват, че третирането с ТМ предизвиква отклонение от нормата само при варианта с пълна доза. Скоростта на фотосинтетичния електронен транспорт (ETR) е критерий за преценка на квантовата ефективност на фотосинтезата *in vivo* (Hetherington et al., 1998). В конкретния случай третирането с ТМ намалява съществено ETR на двата вида, с едно изключение при варианта с 1/4 доза ТМ при *Lactuca sativa*. При отсъствие на значителни промени в F_v/F_m в растенията от вариантите с 1/4 и с 1/2 доза ТМ намаляването на ETR в тях се дължи или на директни нарушения във фотохимичните процеси, или е резултат от инхибиране по пътя на обратната връзка, както посочват в обзора си Krupa and Baszynski (1995).

ИЗВОДИ

Високите концентрации на Cd, Cu и Zn в хранителната среда предизвикват анатомични и функционални промени в листата на салатните и фасулевите растения. Те са израз на адаптация на растенията към отрицателното въздействие на ТМ върху физиологичното състояние на растенията, но водят до потискане на растежа. Растенията от двата вида показват различна анатомична адаптация на листата към приложеното въздействие с ТМ, а инхибицията на функционалните фотосинтетични параметри и редукцията на растежа е сходна.

ЛИТЕРАТУРА

Димитрова, И., К. Ст. Коев, Н. А. Христовска, 2001. Изследвания върху *Linum usitatissimum* L. при култивиране върху замърсени с тежки метали почви. II. Морфологичен и анатомичен анализ на вегетативните органи. – В: Научни трудове на Пловдивския университет, 37 (6), 25-34.



- Barcelo, J., Ch. Poschenrieder*, 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. – In: *J. Plant Nutrition*, 13 (1), 1-37.
- Bolhar-Nordenkamp, H. R., G. Oquist*, 1993. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. – In: *Photosynthesis and Production in a changing environment: a field and laboratory manual*. Hall, D. O., J. M. O. Scurlock, H. R. Bolhar-Nordenkamp, R. C. Leegood and S. P. Long, Eds., Chapman and Hall, London, 193-205.
- Hetherington, S. E., R. M. Smille, W. J. Davies*, 1998. Photosynthetic activities of vegetative and fruiting tissues of tomato. – *J. Experim. Botany*, Vol. 49, № 234, 1173-1181.
- Krupa, Z., A. Siedleska, E. Skorzyńska-Polit, W. Maksymiec*, 2002. Heavy metal interactions with plant nutrients. – In: *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. M.N.V. Prasad, K. StrzaJka (Eds). 149-177, Kluwer Acad. Publishers, 287-301.
- Krupa, Z., T. Baszynski*, 1995. Some aspects of heavy metals toxicity towards photosynthetic apparatus - direct and indirect effects on light and dark reactions. – *Acta Physiologiae Plantarum* 7: 55-64.
- Merakchiyska-Nikolova, M., E. Stoyanova, E. Chakalova*, 1990. Certain changes in leaf anatomy and mesophilic chloroplast ultrastructure of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) under the effect of various PbCl₂ concentrations. – *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, 39 (7), 99-101.
- Panou-Filotheou, H., A. M. Bosabaldis, S. Karataglis*, 2001. Effects of copper toxicity on leaves of oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). – *Annals of Botany*, 88, 207-214.
- Vassilev, A., I. Yordanov*, 1997. Reductive analysis of factors limiting growth of Cd-treated plants: a review. – *Bulg. J. Plant Physiol.*, 23 (3-4), 114-133.
- Vassilev, A., L. Koleva, M. Berova, N. Stoeva*, 2007. Development of a plant test system for metal toxicity evaluation. I. Sensitivity of plant species to heavy metal stress. – *J. Central European Agriculture*, 8 (2), 135-140.
- Vassilev, A., M. Berova, Z. Zlatev*, 1998. Influence of Cd²⁺ on growth, chlorophyll content, and water relations in young barley plants. – *Biol. Plant.*, 41 (4), 601-606.

Статията е приета на 27.02.2009 г.
Рецензент - проф. дсн Дияна Светлева
e-mail: svetleva@yahoo.com