

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ОТКЛИК В ОРГАНАХ РАСТЕНИЙ АМАРАНТА НА ДЕЙСТВИЕ ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ КАДМИЯ И ЦИНКА В СРЕДЕ

Н.Г. Осмоловская, В.З. Ву, Т.Е. Билова, Л.Н. Кучаева, Н.Ф. Попова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия, natalia_osm@mail.ru

Аннотация. С использованием метода ГХ-МС исследован метаболический отклик в органах 42-дневных растений амаранта хвостатого *Amaranthus caudatus* L. на воздействие 90 мкМ Cd и 300 мкМ Zn в условиях водной культуры. Показана зависимость метаболического отклика в листьях амаранта от возраста листа. Ключевыми метаболитами в отклике на Cd и Zn в корнях и молодых листьях явились сахара, а в зрелых листьях органические кислоты - оксалат и малат, что свидетельствует об их функциональной роли в механизмах устойчивости амаранта к стрессовому действию Cd и Zn.

Ключевые слова: амарант, кадмий, цинк, органические кислоты, метаболический отклик, металлоустойчивость

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1099-1102

Кадмий и цинк входят в число широко распространенных загрязнителей среды и в высоких концентрациях могут оказать множественное повреждающее действие на растительный организм. Однако растения способны в определенной степени противостоять ему с помощью разнообразных адаптационных механизмов [Титов и др., 2014], что определяет важность изучения ответных реакций растений, вовлекаемых в формирование их устойчивости стрессовому действию тяжелых металлов. В последние годы одним из актуальных подходов к изучению стрессоустойчивости растений становится исследование ответных реакций растений на уровне метаболома. Наиболее широко для целей анализа растительных метаболитов используется метод газовой хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией (ГХ-МС) [Kim et al., 2011].

В нашей работе объектом для исследования метаболического отклика растений на действие Cd и Zn были выбраны растения амаранта, проявляющего, согласно [Fan et al., 2009], устойчивость к действию этих металлов. Важным свойством амаранта является аккумуляция в надземных органах значительных количеств оксалата, играющего принципиальную роль в формировании ионного гомеостаза в листьях этого растения [Осмоловская и др., 2007]. Однако возможность участия оксалата и других органических кислот в механизмах устойчивости амаранта к действию тяжелых металлов остается мало изученной. В этой связи нами был проведен анализ метаболитных профилей в экстрактах из зрелых и молодых листьев и из корней 42-дневных растений амаранта хвостатого *Amaranthus caudatus* L., сорт Kawa dauta, выращенных в водной культуре и подвергнутых 7-суточному воздействию высоких концентраций Cd (90 мкМ) и Zn (300 мкМ) в среде. Отмечено, что внесение металлов затормозило прирост сырой биомассы растений, однако значительного ингибирования прироста сухой биомассы не наблюдалось.

Подготовка проб для анализа состава и определения концентраций метаболитов включала получение метанольных экстрактов, их высушивание, растворение в пиридине, силилирование и анализ триметилсилильных производных с помощью газового хроматографа Agilent 6850GC с масс-селективным детектором 5975C (США) и на газовом хромато масс-спектрометре GCMS-QP2010 Plus фирмы SHIMADZU. В исследуемых пробах растений было аннотировано от 64 до 76 метаболитов, среди которых углеводы, органические и аминокислоты, жирные кислоты и ряд других

низкомолекулярных метаболитов. Статистическая обработка массива полученных данных, выполненная с использованием метода главных компонент, показала достоверность распределения точек, отвечающих вариантам контроля, 90 мкМ Cd и 300 мкМ Zn, по 3-м классам для каждого органа, что свидетельствовало о значимости происходящих в них биохимических перестроек. Для всех построенных моделей отмечен высокий процент объясненной дисперсии, составивший в разных органах от 38% до 65% для компоненты PC1 и от 24% до 39% для компоненты PC2. Визуализация концентраций низкомолекулярных метаболитов, выделенных из листьев и корней *A. caudatus*, выполненная с использованием методов мультивариационной статистики и с помощью построения теплокарт, позволила выявить увеличение уровней одних и снижение уровней других метаболитов в органах амаранта относительно контроля под влиянием 7 сут экспонирования растений в присутствии Zn и Cd. Анализ метаболитных профилей позволил выявить различия в характере биохимических перестроек, происходящих в корнях и надземных органах растений амаранта в ответ на действие ТМ стресса, и показать их сопряженность с природой механизмов, функционирующих на уровне корней и листьев для обеспечения металлоустойчивости растений. Количественная оценка содержания 14 принципиально значимых метаболитов в экстрактах из органов *A. caudatus* позволила выявить ключевые соединения, внесшие максимальный вклад в метаболический отклик этого растения на стрессовое действие Cd и Zn (рисунок). Согласно результатам исследования, основная роль в метаболическом отклике корней *A. caudatus* принадлежит сахарам, тогда как в листьях приоритет принадлежит органическим кислотам.

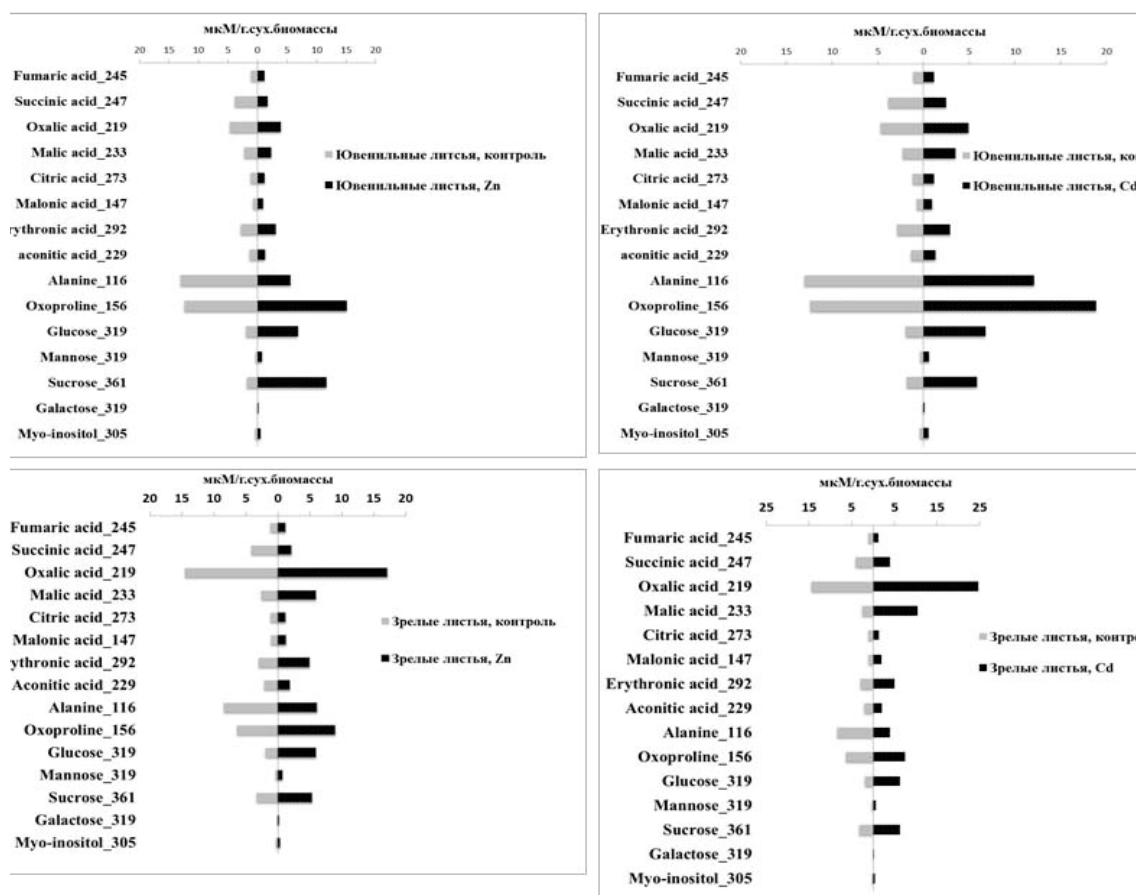


Рисунок. Содержание ключевых метаболитов в молодых и зрелых листьях

Реакция на воздействие металлов со стороны углеводов в целом оказалась универсальной в листьях обоих возрастов и проявилась в виде возрастания уровней глюкозы, фруктозы, сахарозы, а также маннозы и галактозы, причем содержание сахарозы и галактозы в молодых листьях амаранта возрастало сильнее на фоне Zn, чем Cd. Вместе с тем было установлено, что относительный прирост пулов глюкозы и сахарозы в ювенильных листьях амаранта оказался выше, чем в зрелых листьях, и достигал 4-6 раз к контролю. Повышение уровней осмотически активных сахаров в ответ на стрессовое действие абиотических факторов связывают с усилением глюконеогенеза и рассматривают как результат активной метаболической регуляции [Rodziewicz et al., 2014]. Выявленное существенное увеличение пулов сахаров в метаболизме ювенильного листа амаранта, скорее всего, обусловлено усилением их переноса из зрелых донорных в акцепторные ювенильные листья для обеспечения их развития и функционирования в условиях стресса. Повышение уровня сахаров при воздействии цинка и кадмия было установлено также в корнях *A. caudatus*, что, скорее всего, явилось следствием усиления их оттока из листьев как важного энергетического и строительного ресурса для вовлечения в механизмы адаптации к стрессу. Наряду с сахарами в корнях *A. caudatus* в ответ на внесение Cd и Zn в среду отмечалось увеличение содержания фосфорной и эритроновой кислот, аланина и мио-инозитола.

Данные метаболического анализа показали, что среди изученных метаболитов в ювенильных листьях *A. caudatus* в количественном отношении преобладают аминокислоты аланин и оксипролин, при этом уровень последней в условиях действия Cd и Zn возрастал в 1,5 и в 1,2 раза. Учитывая осмопротекторную роль пролина в механизмах стрессовой устойчивости растений [Титов и др., 2014], увеличение концентрации оксипролина в ювенильном листе можно рассматривать как важный адаптационный признак.

Было установлено, что концентрации отдельных метаболитов в листьях амаранта сильно изменяются с возрастом и в зрелом листе приоритет переходит от аминокислот к органическим кислотам. Показано, что при воздействии Cd и Zn содержание органических кислот, в первую очередь, оксалата и малата, существенно повышалось в листьях амаранта, при этом стимулирующий эффект металлов в зрелых листьях был намного выше, чем в ювенильных (рисунок). Наибольший по величине пул оксалата в зрелом листе возрос в присутствии Cd в 1,7 раза, а Zn - в 1, 2 раза, тогда как пулы малата возросли в 4 и в 2 раза соответственно. Данный факт можно трактовать как показатель интенсификации цикла Кребса в зрелых листьях, способствующей генерированию восстановительных агентов и АТФ, а также углеродных скелетов для синтеза аминокислот и белка, на что указывали авторы некоторых работ [Keunen et al., 2010; Xie et al., 2014]. Выявленное количественное доминирование оксалата среди всех аннотированных метаболитов в зрелых листьях амаранта свидетельствует в пользу ранее установленной нами принципиальной роли этой кислоты в поддержании ионного баланса в листьях амаранта [Осмоловская и др., 2007] и позволяет говорить о важности оксалата как детоксикатора, прежде всего, кадмия, в листьях *A. caudatus*.

Среди метаболитов, содержание которых, согласно данным метаболического анализа, заметно возрастало под воздействием Cd и Zn, следует отметить также повышение концентраций ряда жирных и ароматических кислот в листьях *A. caudatus*, в частности, феруловой, азеалиновой и адипиновой кислот, которые, по некоторым данным, могут выполнять антиоксидантную или сигнальную функцию в растениях [Boz, 2015].

Обобщая результаты проведенного исследования, можно заключить, что различия в направленности биохимических перестроек в корнях и листьях растений амаранта, выявленные в ответ на стрессовое действие высоких концентраций Cd и Zn, очевидно,

во многом обусловлены спецификой процессов, участвующих в детоксикации этих металлов, и вовлечением исследуемых метаболитов в различные пути адаптации растений к Cd и Zn стрессу. Усиление притока сахаров в корни может способствовать поддержанию структуры и катионообменных свойств апопласта, что является принципиально важным для обеспечения эффективного связывания и детоксикации ионов ТМ на уровне клеток корней и реализации ими стратегии эксклюдера. Установленная ориентированность биохимических перестроек, происходящих в зрелых листьях, на интенсификацию обмена органических кислот и преимущественную аккумуляцию в них малата и оксалата, сопряжена с их очевидным участием в хелатировании и детоксикации ионов Cd^{2+} и Zn^{2+} на уровне листа и подтверждает принципиальную роль органических кислот в механизмах устойчивости растений амаранта к стрессовому воздействию кадмия и цинка.

Литература

Осмоловская Н.Г., Кучаева Л.Н., Новак В.А. Роль органических кислот при формировании ионного состава листьев гликофитов в онтогенезе // Физиология растений. – 2007. – Т. 54, № 3. – С. 381–388.

Титов А.Ф., Казнина Н.М., Таланова В.В. Тяжелые металлы и растения. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2014. – 194 с.

Boz H. Ferulic acid in cereals (Review// Czech J. Food Sci. – 2015. –V. 33, No.1. – P. 1–7.

Fan H., Zhou W. Screening of Amaranth cultivars (*Amaranthus mangostanus* L.) for cadmium hyperaccumulation // Agricultural Sciences in China. – 2009. – V. 8. – P. 342–351.

Keunen E. et al. Metabolic responses of *Arabidopsis thaliana* roots and leaves to sublethal cadmium exposure are differentially influenced by alternative oxidase1a // Environ. Exp. Bot. – 2016. – V. 124. – P.64–78.

Kim S., Fang A., Wang B., Jeong J., Zhang X. An optimal peak alignment for comprehensive two-dimensional gas chromatography mass spectrometry using mixture similarity measure // Bioinformatics. – 2011. – V. 27. – P. 1660–1666.

Rodziewicz P., Swarczewicz B. et al. Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes //Acta Physiol. Plant. – 2014. – V. 36. – P. 1–19

Xie Y. et al. Effects of cadmium exposure on growth and metabolite profile of Bermudagrass // PLoS ONE. – 2014. – V. 9, No. 12. – P. 1–20.

METABOLIC RESPONSE IN PLANT ORGANS OF AMARANTH TO THE EFFECT OF HIGH CONCENTRATIONS OF CADMIUM AND ZINC IN THE ENVIRONMENT

N.G. Osmolovskaya, V.D. Vu, T.E. Bilova, L.N. Kuchaeva, N.F. Popova

Saint-Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia, natalia_osm@mail.ru

Abstract. The metabolic responses in the organs of 42-day-old *Amaranthus caudatus* L. plants to the effect of 90 μM Cd and 300 μM Zn in water culture were studied using GC-MS method. It was shown that metabolic response in amaranth leaves depends on the leaf age. The key metabolites in the response to Cd and Zn in the roots and young leaves were sugars, and in the mature leaves organic acids - oxalate and malate, which indicates their functional role in the mechanisms of amaranth tolerance to the stress effect of Cd and Zn.

Keywords: *amaranth, cadmium, zinc, organic acids, metabolic response, metal tolerance*