ИЗМЕНЕНИЕ КОМПОЗИЦИОННОГО СОСТАВА КОРНЕВЫХ ЭКССУДАТОВ У РАСТЕНИЙ ГОРОХА ПОСЕВНОГО ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Я.В. Пухальский, А.И. Шапошников, С.И. Лоскутов, Т.С. Азарова, А.А. Белимов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия, *puhalskyyan@gmail.com*

Аннотация. В условиях стерильной гидропонной культуры, и при интродукции токсичных концентраций тяжелых металлов, изучен состав корневых экзометаболитов (органических кислот и сахаров) у дикой линии гороха посевного – SGE и полученного на её основе генетического модификанта – SGECDt, обладающего повышенной устойчивостью и аккумуляцией кадмия и кобальта. Мутант выделял суммарно большее количество экссудатов в обеих фракциях. Установлены также и качественные различия в компонентах вышеназванных веществ.

Ключевые слова: *Pisum sativum, тяжелые металлы, органические кислоты, сахара, гидропоника*

Введение. Одними из главных компонентов корневых экссудатов являются сахара, аминокислоты и органические (алифатические карбоновые) кислоты [Битюцкий, 2014; Шапошников и др., 2016; Kuang et al., 2003]. Органические кислоты и аминокислоты относятся к конститутивным веществам, постоянно образующиеся и присутствующие в ризосфере при нормальном развитии растений.

При воздействии на растения токсичных концентраций тяжелых металлов (ТМ), синтез экзометаболитов корнями увеличивается, что направлено на устранение возникшего стресса, с помощью образования коньюгатов (хелатов), инактивирующих металлы в труднодоступные комплексы или осаждающие их на поверхности корня [Чиркова, 2002; Dong et al., 2007]. Органические кислоты при этом обладают более сильным сродством с ТМ в процессах мобилизации (комплексообразования), чем аминокислоты или сахара [Chen et al., 2007; Nigam et al., 2000].

Корневые экссудаты, являясь легкодоступными источниками питания для почвенных микробов, имеют немаловажное значение для взаимодействия с последними, поскольку они также участвуют в процессах биосорбции поллютантов, за счет продуцирования собственных соединений, способных мобилизовывать ТМ в результате подкисления среды [Кравченко и др., 2011; Белимов и Тихонович, 2011; Kuang et al., 2003; Badri and Vivanco, 2009].

Из всего вышесказанного, целью нашего эксперимента было изучить изменение качественного и количественного состава низкомолекулярных фракций корневых экзометаболитов у двух генотипов зернобобовой культуры, в условиях моно- и биэлементной интродукции токсичных концентраций ТМ**.**

Объекты и методика исследования. Объектами для исследования послужили дикая линия гороха посевного (*Pisum sativum L.*) – SGE, и созданный на ее основе устойчивый к кадмию и кобальту мутант – SGECdt [Tsyganov et al., 2007; Belimov et al., 2016]. Механизм его устойчивости к кадмию не связан с биосинтезом глутатиона и фитохелатинов.

Эксперименты проводили в пластиковых гнотобиотических системах, содержащих стерильный питательный раствор, следующего состава: $MgSO_4$ (400 мкМ), KCl (100 мкМ), KNO_3 (2 М), KH_2PO4 (600 мкМ), $CaCl_2$ (100 мкМ), $Ca(NO_3)_2$ (100 мкМ), Fe-тартрат (20 мкМ), смесь микроэлементов, pH=6,0. ТМ вносили в среду в виде

растворов солей: $CdCl_2$ в концентрации 4 мкМ и/или $CoCl_2$ в концентрации 40 мкМ. Контролем служили пластиковые сосуды с растениями без добавления ТМ.

Анализ экссудатов проводили с использованием сверхпроизводительной жидкостной хроматографии высокого давления Acquity UPLC H-class (Waters, США) согласно разработанной ранее методике [Шапошников, 2015].

Обработку экспериментальных данных проводили с помощью статистических программ Statistica v.6 (StatSoft, США) и Excel 2007 (Microsoft Corp., США).

Результаты. Установлено, что корневая экссудация органических кислот у SGECdt значительно выше по сравнению с исходной линией SGE в отсутствии и присутствии токсичных концентраций кадмия и/или кобальта (рисунок). В процентном соотношении, преобладающим компонентом данной фракции во всех вариантах и у обоих генотипов являлась пировиноградная кислота (66-99%).

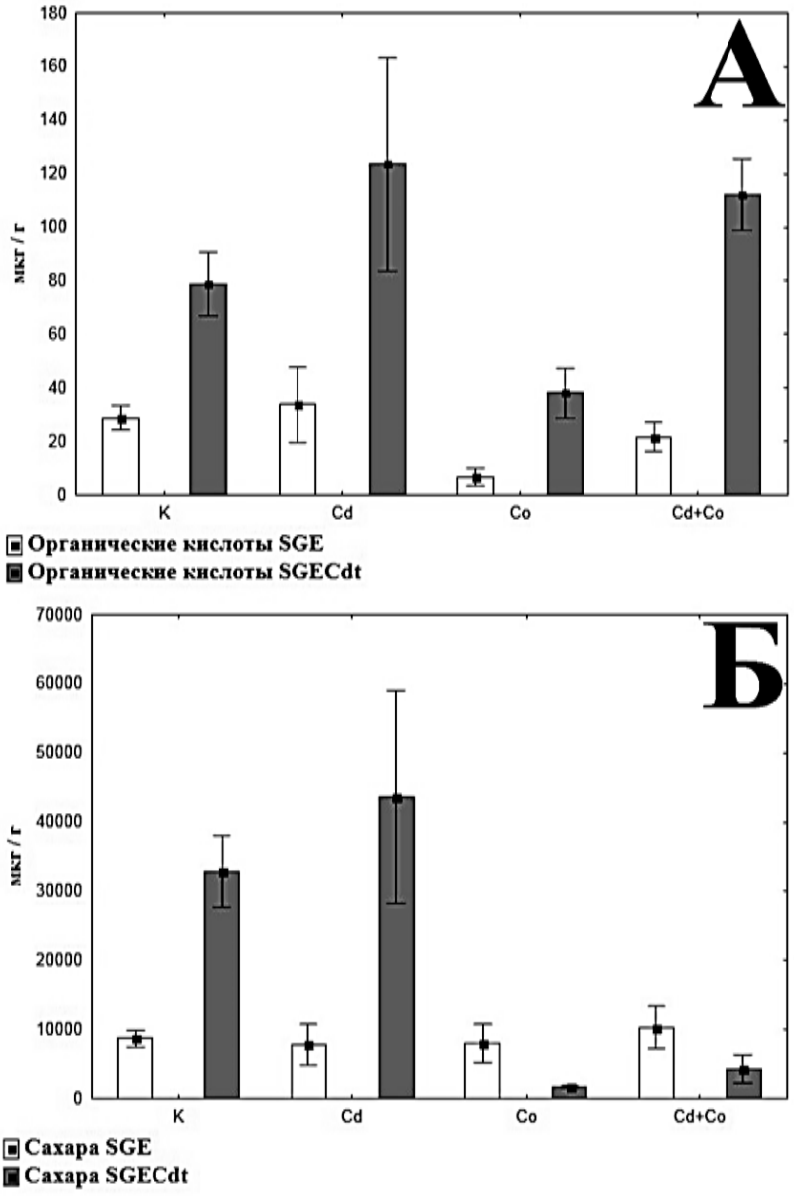

Рисунок. Суммарное содержание отдельных фракций корневых экссудатов в корневой зоне генотипов гороха SGE и SGECdt в гнотобиотичеких условиях в присутствии токсичной концентрации тяжелых металлов. А - органические кислоты, Б - сахара. Вертикальные отрезки обозначают ошибки средних.

Суммарные показатели по экссудации сахаров у мутанта также были значительно выше в контроле и при интродукции кадмия. Однако, в вариантах с отдельным и/или комбинированным внесением кобальта в раствор, значения корневых выделений снижались по сравнению с дикой линией. Фракция была представлена в основном фруктозой (80-90%). Также присутствовали глюкоза и рибоза. Причем, по содержанию фруктозы и рибозы в контроле и при внесении кадмия, мутант характеризовался более активной экссудацией последних. Напротив, уровень глюкозы заметно снижался в вариантах с добавлением ТМ.

Результаты по весовым и морфометрическим показателям в опыте приведены в нашей ранней работе [Шапошников и др., 2017].

Выводы. Роль пировиноградной кислоты в симбиотических взаимодействиях остается неизученной. Хотя уже точно известно, что она входит в цепочку промежуточных продуктов при синтезе фитогормона-ауксина в растениях и микробах [Cook et al., 2016; Sardar and Kempken, 2018; Mano and Nemoto, 2012; Zhao, 2013], способных также влиять друг на друга [Dodd et al., 2010, 2013]. При этом пировиноградная кислота образуется при расщеплении глюкозы в процессе гликолиза. Снижение уровня данного углевода и увеличение выхода кислоты у SGECdt может означать возрастание биосинтеза ауксинов в растениях, в ответ на толерантную устойчивость мутанта при введении в раствор ТМ. Имеются также свидетельства того, что сахара могут контролировать уровни ауксина в растениях [LeClere et al., 2010; Sairanen et al., 2012]. Глюкоза может модулировать степень регуляции почти 63% генов, индуцирующих или подавляющих синтез ауксина [Gupta et al., 2009]. Далее они могут быть преобразованы в сложные эфиры с сахарами [Müller, 2011].

Так как, практически всегда ауксины действуют во взаимодействии с другими фитогормонами, главным образом, с цитокининами и гиббереллинами, то изменение уровня качественного и количественного состава низкомолекулярных фракций корневых экзометаболитов говорит о большой доле вероятности участия в этом процессе иммунной системы растений и именно она заслуживает особый интерес в дальнейших исследованиях.

Работа проводилась в рамках проекта Минобрнауки (ГК № 16.512.11.2162), а также при содействии гранта РНФ 14-16-00137.

Литература

Белимов А.А., Тихонович И.А. Микробиологические аспекты устойчивости и аккумуляции тяжелых металлов у растений (обзор) // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – № 3. – С. 10–15.

Битюцкий Н.П. Минеральное питание растений. – Спб.: Изд-во СПбГУ, 2014. – 540 с.

Кравченко Л.В. Методика изучения корневой экссудации для оценки эффективного функционирования и интеграции микроорганизмов с растениями. – СПб.: Информнавигатор, 2015. – 32 с.

Кравченко Л.В., Шапошников А.И., Макарова Н.М., Азарова Т.С., Львова К.А., Костюк И.И., Тихонович И.А. Видовые особенности состава корневых выделений растений и его изменение в ризосфере под влиянием почвенной микрофлоры // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – № 3. – С. 71–75.

Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. – СПб.: СПбГУ, 2002. – 244 с.

Шапошников А.И., Пухальский Я.В., Кравченко Л.В., Белимов А.А. Роль корневой экссудации в трофических взаимодействиях растений с ризосферными микроорганизмами. – СПб: Информнавигатор, 2016. – 104 с.

Шапошников А.И., Пухальский Я.В., Лоскутов С.И., Белимов А.А. Анализ ростовых показателей различных сортов гороха при воздействии кадмия и кобальта в начальный период онтогенеза // Коллективная монография «Реализация методологических и методических идей профессора Б.А. Доспехова в совершенствовании адаптивно-ландшафтных систем земледелия» Том. 2. – 2017. – С. 70–76.

Badri D.V., Vivanco J.V. Regulation and function of root exudates // Plant, Cell & Environment. – 2009. – No. 32. – P. 666–681.

Belimov A.A., Malkov N.V., Puhalsky J.V., Safronova V.I., Tikhonovich I.A. High specificity in response of pea mutant SGECdt to toxic metals: Growth and element composition // Environmental and Experimental Botany. – 2016. – V. 128. – P. 91–98.

Chen S., Sun L.N., Chao L., Zhou Q.X., Sun T.H. Influence of organic acid and amino acid on cadmium and lead desorption from soil // Australian Journal of Soil Research. – 2007. – V. 45 (7). – P. 554–558.

Cook S.D., Nichols D.S., Smith J., Chourey P.S., McAdam E.L., Quittenden L., Ross J.J. Auxin biosynthesis: are the indole-3-acetic acid and phenylacetic acid biosynthesis pathways mirror images? // Plant Physiology. – 2016. – V. 171 (2). – P. 1230–1241.

Dodd I.C., Belimov A.A., Elphinstone E.D., Chen L., Teijeiro R.G., Kemp C., Fielding H., Wright H. Exploiting Rhizobacteria that mediate plant hormone status // Aspects of Applied Biology. – 2013. – V. 120. – P. 29–34.

Dodd I.C., Zinovkina N.Y., Safronova V.I., Belimov A.A. Rhizobacterial mediation of plant hormone status // Annals of Applied Biology. – 2010. – V. 157. – P. 361–379.

Dong J., Mao H., Zhang G.P., Wu F.B., Cai Y. Root excretion and plant tolerance to cadmium toxicity – a review // Plant, Soil and Environment. – 2007. – V. 53 (5). – P. 193–200.

Gupta A., Singh M., Mishra B.S., Kushwah S., Laxmi A. Role of glucose in spatial distribution of auxin regulated genes // Plant Signal Behavior. – 2009. – V. 4 (9). – P. 862–863.

Kuang Y.W., Wen D.Z., Zhong C.W., Zhou G.Y. Root exudates and their roles in phytoremediation // Acta Phytoecology. – 2003. – V. 27. – P. 709–717.

LeClere S., Schmelz E.A., Chourey P.S. Sugar levels regulate tryptophan-dependent auxin biosynthesis in developing maize kernels // Plant Physiology. – 2010. – V. 153. – P. 306–318.

Mano Y., Nemoto K. The pathway of auxin biosynthesis in plant // Journal of Experimental Botany. – V. 63 (8). – 2012. – P. 2853–2872.

Müller J. L. Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants // Journal of Experimental Botany. – 2011. – V. 62 (6). – P. 1757–1773.

Nigam R., Srivastava S., Prakash S., Srivastava M.M. Effect of organic acids on the availability of cadmium in wheat // Chemical Speciation & Bioavailability. – 2000. – V. 12 (4). – P. 125–132.

Sairanen I., Novák O., Pencík A., Ikeda Y., Jones B., Sandberg G. Soluble carbohydrates regulate auxin biosynthesis via PIF proteins in *Arabidopsis* // Plant Cell. – 2012. – V. 24. – P. 4907–4916.

Sardar P., Kempken F. Characterization of indole-3-pyruvic acid pathway-mediated biosynthesis of auxin in *Neurospora crassa* // PLoS ONE. – 2018. – V. 13 (2). – e0192293.

Tsyganov V.E., Belimov A.A., Borisov A.Y., Safronova V.I., Georgi M., Dietz K.-J., Tikhonovich I.A. A chemically induced new pea (*Pisum sativum L.*) mutant SGECdt with increased tolerance to and accumulation of cadmium // Annals of Botany. – 2007. – V. 99. – P. 227–237.

Zhao Y. Auxin Biosynthesis: A Simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants // Molecular Plant. – 2013. – V. 5. – P. 334–338.

CHANGE OF COMPOSITION COMPOSITION OF ROOT EXUDATES IN PEA PLANT PLANTS UNDER EXPOSURE TO HEAVY METALS

Ya.V. Pukhalsky, A.I. Shaposhnikov, S.I. Loskutov, T.S. Azarova, A.A. Belimov

All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg-Pushkin, Russia, *puhalskyyan@gmail.com*

Abstract. Under the conditions of a sterile hydroponic culture, and the introduction of toxic heavy metal concentrates was study the composition of root exometabolites (organic acids and sugars) from the wild line of pea – SGE and on its basis a genetic modifier – SGECDt, increased stability and accumulation of cadmium and cobalt. The mutant releases a larger amount of exudates in both fractions. Qualitative differences in the components of the above substances were also established.

Keywords: *Pisum sativum L., heavy metals, organic acids, sugars, hydroponics*