

На правах рукописи

ВУ Вьет Зунг

**РОЛЬ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В МЕХАНИЗМАХ УСТОЙЧИВОСТИ
РАСТЕНИЙ АМАРАНТА
К ДЕЙСТВИЮ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ**

03.01.05 - физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Научный руководитель: **Осмоловская Наталия Глебовна,**
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты: **Гончарова Эльза Андреевна,**
доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной и экологической генетики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И.Вавилова»

Алексеева-Попова Наталия Вадимовна,
кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории экологии растительных сообществ ФГБУН Ботанический институт им. В.Л.Комарова РАН

Ведущая организация: Институт Биологии Карельского научного центра Российской академии наук

Защита состоится «__» _____ 2018 г. в _____ на заседании диссертационного совета Д 999.167.02 по защите кандидатских и докторских диссертаций при Санкт-Петербургском государственном университете по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9, СПбГУ, Биологический факультет, аудитория _____

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. М.Горького Санкт-Петербургского государственного университета и на сайте <http://spbu.ru>.

Автореферат разослан «_____» _____ 2018 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета

Шарова Елена Игоревна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами (ТМ) и их негативное действие на живые организмы, включая растения, является одной из актуальных проблем нашего времени. Опасность ТМ состоит в их высокой биологической активности и способности к биоаккумуляции. Растения, поглощающие ТМ непосредственно из почвы, играют важную роль в их аккумуляции и переносе по пищевым цепям, что может представлять серьезную угрозу для здоровья человека.

Кадмий и цинк входят в число широко распространенных загрязнителей среды. Несмотря на то, что ТМ могут оказывать на растения множественное повреждающее действие, растения в определенной степени способны противостоять ему с помощью различных адаптационных механизмов (Титов и др., 2014), в том числе, путем хелатирования ионов ТМ при участии ряда метаболитов, включая органические кислоты (Алексеева-Попова, 1991; Saber et al, 1999; Mnasi et al., 2015). Среди растений, проявляющих устойчивость к действию таких ТМ как Cd (Fan et al., 2009) и Zn (Kos et al., 2003), несомненный интерес представляют растения рода *Amaranthus*. С одной стороны, амарант позиционируется как высокопродуктивная пищевая и кормовая культура (Магомедов, Чиркова, 2015) с С₄-типом фотосинтеза (Магомедов, 1988), богатая биологически-активными веществами и антиоксидантами (Гинс, 2002; Jiménez-Aguilar, Grusak, 2017), с другой – рассматривается как перспективное растение для фиторемедиации среды, загрязненной тяжелыми металлами (Kos et al., 2003; Шевякова и др., 2011; Bosiacki et al., 2013; Watanabe et al., 2009; Ko et al., 2014). Однако данные, полученные в экспериментах на разных видах амаранта, неоднозначны и свидетельствуют как о способности отдельных видов амаранта к накоплению значительных количеств Cd в надземных органах без выраженных симптомов токсичности (Fan et al., 2009; Bosiacki et al., 2013), так и о повышенной Cd чувствительности растений (Chetan et al., 2015).

Важным свойством амаранта является аккумуляция в его надземных органах значительных количеств оксалата, играющих принципиальную роль в формировании ионного гомеостаза в листьях этого растения (Осмоловская и др., 2007; Попова, 2009). В то же время вопрос о возможности участия органических кислот в механизмах устойчивости и адаптации растений амаранта к действию тяжелых металлов остается мало изученным.

Цель исследования заключалась в изучении ответных реакций растений *Amaranthus cruentus* и *Amaranthus caudatus* на воздействие высоких концентраций кадмия и цинка и роли органических кислот в механизмах устойчивости амаранта к действию Cd и Zn.

В задачи исследования входило:

1. Изучить особенности роста и развития растений амаранта на среде с высокими концентрациями Cd и Zn.
2. Провести анализ содержания Cd и Zn в различных органах растений амаранта и оценить их локализацию в зависимости от условий культивирования растений и этапов онтогенеза.

3. Охарактеризовать участие оксалата в процессах детоксикации Zn и Cd в листьях амаранта
4. Исследовать метаболический отклик на действие высоких концентраций кадмия и цинка в органах растений *Amaranthus caudatus* и *Amaranthus cruentus*.
5. Оценить роль органических кислот в механизмах устойчивости растений амаранта к действию Zn и Cd.

Научная новизна исследования. Впервые с использованием методов электронной микроскопии и рентгенодифракционного анализа выявлено формирование кристаллов оксалата кадмия в листьях растений *A. caudatus* в присутствии высоких концентраций Cd в среде, что может играть принципиальную роль в детоксикации Cd в листьях амаранта. Установлено, что растения амаранта при выращивании на среде с рН 6,8 накапливают Cd и Zn преимущественно в апопласте клеток корня, что отвечает стратегии эксклюдера. Впервые показано, что рН 4,5 препятствует эффективному связыванию Cd и Zn в корнях *A. caudatus*, провоцируя повышенную аккумуляцию этих металлов в побеге. Впервые на основе анализа метаболитных профилей с использованием метода газовой хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией, проведена сравнительная оценка содержания низкомолекулярных метаболитов в листьях и корнях *A. cruentus* и *A. caudatus* в норме и при воздействии высоких концентраций Zn (300мкМ) и Cd (90мкМ). Показано, что ключевыми соединениями в метаболическом отклике корней амаранта на действие Cd и Zn являются сахара, а в листьях – органические кислоты. Впервые продемонстрирована зависимость метаболического отклика на Cd и Zn от возраста листа, выразившаяся в преимущественном приросте содержания сахаров в молодых листьях и превалирующем приросте оксалата и кислот цикла ДТК в зрелых листьях *A. caudatus*.

Теоретическая значимость работы состоит в установлении ключевой роли оксалата в механизмах детоксикации кадмия в листьях *A. caudatus* путем формирования в них кристаллов оксалата кадмия. Теоретически важно выявленное снижение эффективности иммобилизации Cd и Zn в корнях амаранта в условиях снижения рН среды. Теоретически значимы данные о зависимости метаболического отклика в листьях амаранта на действие Cd и Zn от возраста листа. Теоретически важен вывод об ориентированности биохимических перестроек листа в условиях Cd и Zn стресса на интенсификацию аккумуляции малата и оксалата, подтверждающий роль органических кислот в механизмах устойчивости растений амаранта к воздействию высоких концентраций Cd и Zn. цинка

Практически значим выбор объекта исследования - растений амаранта как ценной сельскохозяйственной культуры и выполнение сравнительного исследования метаболических ответов на действие высоких концентраций Cd и Zn в корнях и листьях 2-х видов амаранта. Такой подход открывает перспективы для скрининга видов культурных растений на их устойчивость к стрессовому действию ТМ. Результаты работы могут быть хорошим базисом для рассмотрения перспективности использования исследованных видов амаранта в технологиях фиторемедиации почв, загрязненных кадмием и цинком.

Основные положения, выносимые на защиту. 1. Устойчивость растений амаранта к высоким концентрациям Cd и Zn определяется эффективным связыванием металлов в корнях и хелатированием в листьях при участии органических кислот. 2. Малат и оксалат играют ключевую роль в метаболическом отклике растений *A. caudatus* на действие Cd и Zn. 3. Формирование кристаллов оксалата кадмия играет принципиальную роль в механизмах детоксикации Cd в листьях растений *A. caudatus*, произрастающих в присутствии высоких концентраций Cd в среде.

Апробация работы. Результаты исследований по теме докладывались на III (XI) Международной Ботанической Конференции молодых ученых (СПб, 2015), VIII съезде Общества физиологов растений России (Петрозаводск, 2015), IV Международном симпозиуме "Plant Signaling and Behavior" (Saint Petersburg, 2016), Годичном собрании ОФР России «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма» (СПб, 2016), Международной научной конференции, посвященной 85-летию Агрофизического НИИ (СПб, 2017), IV Вавиловской международной конференции «Идеи Н. И. Вавилова в современном мире» (СПб, 2017).

По материалам диссертации опубликовано 10 работ.

Объем и структура диссертационной работы. Диссертация изложена на 178 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы, который включает 362 источника, в том числе 225 на английском языке. Диссертация иллюстрирована 71 рисунком и 3 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования.

Объектом исследования являлись растения амаранта хвостатого *Amaranthus caudatus* L., сорт *Kawa dauta* (Индия) и амаранта метельчатого *Amaranthus cruentus* L. Семена были получены из отдела овощных культур «Федерального исследовательского центра Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И.Вавилова».

Исследования выполняли в водной культуре с использованием питательного раствора Чеснокова (Осмоловская и др., 2007). Семена стерилизовали в 3% H_2O_2 , промывали H_2O и проращивали в контейнерах с прокаленным кварцевым песком. Проростки поливали разбавленным в 5 раз питательным раствором, в возрасте 3-х недель растения переводили на полив полным раствором, в возрасте 4-х недель пересаживали в 3л сосуды, заполненные полным питательным раствором, по 3 растения на сосуд. Растворы в сосудах постоянно аэрировали и обновляли каждые 7 суток. Величину pH растворов поддерживали на уровне $5,8 \pm 0,1$, в отдельных опытах - на уровне $4,5 \pm 0,2$ или $6,8 \pm 0,2$. Растения выращивали в световой установке при освещенности на уровне верхнего листа $250 \text{ мкмоль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сек}^{-1}$, световой режим: 16 ч свет ($24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) / 8 ч темнота ($18^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$), относительная влажность 70-75%.

Опыты по воздействию Cd и Zn проводили на растениях 6-недельного возраста, продолжительность воздействия- 7 суток. Cd вносили в растворы в форме $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ в концентрациях 0 (контроль), 30 и 90 мкМ, Zn - в форме $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в концентрациях 0, 100 и 300 мкМ. Все опыты выполняли в 3-кратной повторности. По окончании опыта растения разделяли на корни, стебли, зрелые листья нижнего яруса и молодые (ювенильные) листья верхнего яруса. Корни в течение 5 мин отмывали последовательно в 0,1 мМ растворе CaCl_2 и в дистиллированной воде. В отдельной серии опытов корни разделяли на кончик корня, среднюю часть и основание корня. Сырую биомассу органов оценивали традиционно гравиметрическим методом. Растительный материал фиксировали при 105°C в течение 1 часа и высушивали при 70°C в течение 24 часов до абсолютно сухого веса.

Для определения содержания Cd, Zn, а также K, Ca и Mg сухой материал измельчали, отобранные пробы озоляли смесью концентрированных HNO_3 : HClO_4 в объемном отношении 4:1 при 160°C . Анализы выполняли в Образовательном РЦ по направлению химия СПбГУ. Содержание Cd и Zn определяли на атомно-абсорбционном спектрометре AA-7000 ("SHIMADZU", Япония). Содержание K, Ca и Mg -на оптическом эмиссионном спектрометре с индуктивно-связанной плазмой ICPE-9000 ("SHIMADZU", Япония). Содержание водо- и кислоторастворимой форм оксалата определяли в сухом материале путем экстракции водой или 1N HCl (1:100) и титрования оксалатов в кислой среде с использованием метода перманганатометрии согласно (Осмоловская и др., 2007).

Локализацию Cd в органах растений определяли с использованием гистохимического метода (Серегин и др., 2004). Исследование окрашенных срезов проводили с помощью светового микроскопа Leica DM 4500p (Германия) в РЦ "Хромас" СПбГУ. Локализацию Zn в органах амаранта определяли на сканирующем электронном микроскопе - микроанализаторе TM3000 (Hitachi, Япония) с использованием программы SwiftED300. Обнаружение кристаллов оксалата Cd, Zn и Ca во фракции из листьев амаранта выполняли на микроанализаторе TM3000 в РЦ микроскопии и микроанализа СПбГУ. Анализ фазового состава кристаллов оксалата Cd и Ca в органах амаранта проводили рентгенодифракционным методом в РЦ «Рентгенодифракционные методы исследования» СПбГУ на дифрактометре Bruker «D2 Phaser».

Анализ состава и определение концентраций метаболитов проводили в сухом материале с использованием метода газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС). Подготовка проб для анализа 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 по методике, описанной (Пожванов и др., 2017). Сбор данных осуществляли с помощью программного обеспечения Agilent ChemStation. Обработка и интерпретация данных проводилась с использованием программы AMDIS и стандартных библиотек масс-спектров NIST2005 и Wiley6. Количественная интерпретация хроматограмм проводилась

методом внутренней стандартизации по углеводороду C19 и C23 с помощью программы UniChrom. Статистическую обработку полученных данных выполняли методом главных компонент в программе Microsoft Excel 2010 с использованием программы Statistical analysis tool on Microsoft Excel (RIKEN Plant Science Center (Japan)). Анализ метаболитных профилей и построение теплокарт метаболитов были выполнены с использованием методов мультивариационной статистики с помощью программы MetaboAnalyst. Все данные, полученные в 3-х биологических и 3-х аналитических повторностях, обрабатывали статистически с использованием программы Excel XP Professional. В таблицах и на рисунках приведены средние арифметические трех биологических повторностей и их стандартные отклонения. Достоверность различий между средними значениями оценивали с учетом t-критерия Стьюдента при $p \leq 0.05$ и/или $p \leq 0.01$.

Результаты и обсуждение

Исследование влияния Cd и Zn на основные физиолого-биохимические показатели растений *Amaranthus cruentus* и *Amaranthus caudatus* и их устойчивость к действию металлов

Наши эксперименты показали, что 7 сут экспонирование растений на питательном растворе с внесением 90 мкМ Cd или 300 мкМ Zn вызывало торможение прироста сырой биомассы надземных органов у *A. caudatus* в среднем на 35%, а у *A. cruentus* на 45-55% к контролю. Еще сильнее (на 61-63%) под воздействием Cd и Zn у *A. cruentus* ингибировался прирост сырой биомассы корней, в то время как у *A. caudatus* отставание составило в среднем 28% (Рис.1А). В то же время прирост сухой биомассы у *A. caudatus* тормозился в значительно меньшей степени (в листьях - не более 10-18%) при отсутствии значимых различий в корнях (рис.1Б), тогда как у *A. cruentus* ингибирование прироста сухого вещества в листьях и корнях достигало соответственно 38% и 47% к контролю. Большее влияния Cd и Zn на прирост сырой, чем сухой биомассы, указывает на индуцируемые металлами нарушения водного обмена растений, что ранее отмечалось другими авторами (Vassilev et al., 1998; Poschenrieder, Barcelo, 1999). Полученные данные свидетельствовали в пользу большей устойчивости растений *A. caudatus* к действию Zn и Cd в сравнении с *A. cruentus*.

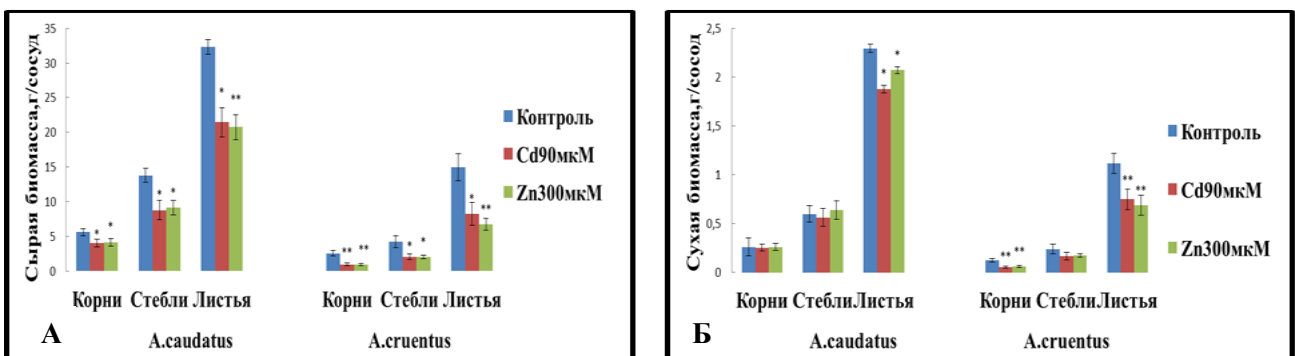


Рис.1. Влияние Cd и Zn на накопление сырой (А) и сухой (Б) биомассы растений амаранта (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Анализ содержания Cd и Zn в органах амаранта позволил установить, что оба металла активно поступали в растения и в наибольших концентрациях накапливались в корнях (Рис.2). Аккумуляция Cd в корнях *A.cruentus* оказалась в 1,4 раза выше, чем в корнях *A.caudatus*, однако перенос Cd в надземные органы был интенсивнее у *A.caudatus*. Цинк, напротив, предпочтительнее аккумулировался корнями *A.caudatus*, но более активно перемещался в побег у *A.cruentus*. Несмотря на высокое содержание металлов среде, концентрация Cd не превысила 90,6 мкг/г в листьях *A.caudatus* и 27,0 мкг/г в листьях *A.cruentus*, а концентрация Zn-соответственно 568 мкг/г и 215 мкг/г. Таким образом оба вида амаранта проявляли стратегию эксклюдера, аккумулируя Cd и Zn преимущественно на уровне корней.

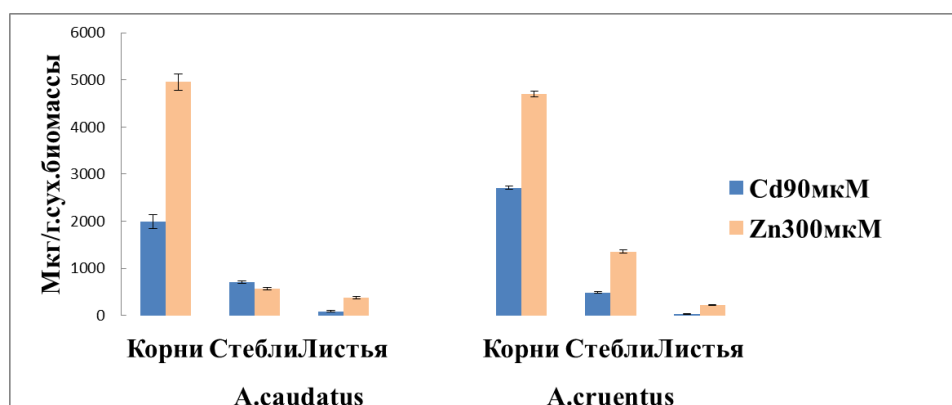


Рис. 2. Содержание кадмия и цинка в корнях и надземных органах растений амаранта

С целью оценки воздействия Cd и Zn на показатели минерального обмена растений было исследовано влияние этих металлов на содержание K, Ca, Mg в корнях и надземных органах амаранта. Внесение Zn и особенно Cd существенно снизило концентрации макроэлементов в корнях и листьях *A.cruentus*, тогда как у *A. caudatus* негативное воздействие металлов проявилось намного слабее (Рис.3). Особенно сильным (до 2,2 раз к контролю) оказалось снижение содержание K в корнях *A.cruentus* (Рис.3А), что согласуется с сообщениями (Беляева и Игошина, 2003; Li et al., 2012) об индукции кадмием утечки K из корней растений. Концентрации K, Ca и Mg снижались у *A.cruentus* до 1,5-2 раз не только в корнях, но и в листьях (Рис3Б), особенно в присутствии Cd. У *A. caudatus* негативное действие Cd и Zn проявилось слабее и в основном в отношении аккумуляции K и Mg, тогда как уровень Ca в корнях и листьях практически не менялся. Возможным механизмом нарушений ионного состава в органах амаранта может быть как блокирование кадмием ионных каналов, участвующих в поступлении K^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+} , обсуждаемое рядом авторов (Verbruggen et al., 2009; Lux et al., 2011), так и генерация конформационных изменений KOR каналов, ведущая к их открыванию (Liu et al., 2012). Полученные данные свидетельствуют в пользу большей металлоустойчивости *A. caudatus*, обусловленной, в том числе, более эффективным поддержанием ионного гомеостаза в корнях и листьях этого вида амаранта.

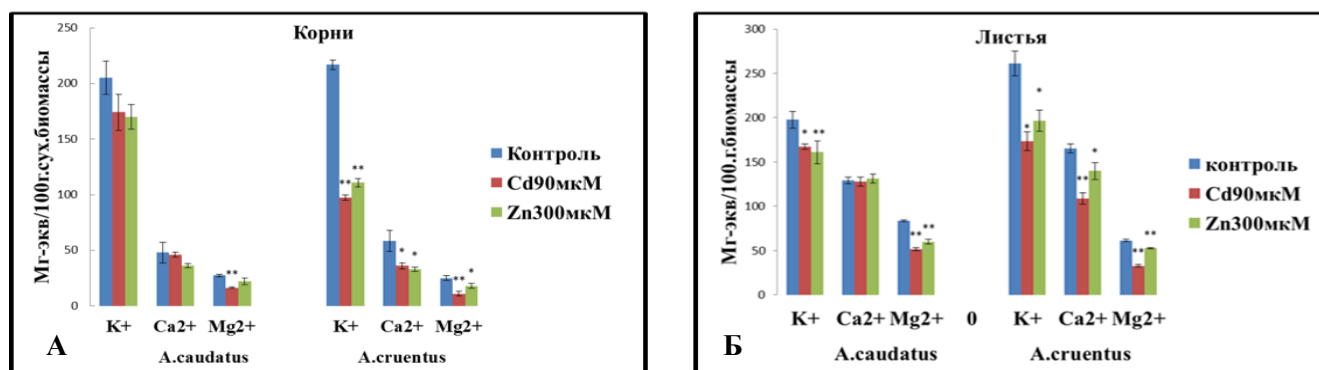


Рис. 3 Влияние кадмия и цинка на содержание макроэлементов в корнях (А) и листьях (Б) двух видов растений амаранта (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Оксалат является важной составляющей при формировании ионного баланса в листьях амаранта (Осмоловская и др., 2007). Результаты исследования показали, что Cd и Zn способствовали резкому сокращению фракции нерастворимого оксалата в листьях *A. caudatus* и *A. cruentus* (Рис.4А), и одновременному возрастанию содержания в них пулов водорастворимого оксалата (Рис 4Б). Эффект деградации пулов нерастворимого оксалата в условиях Cd и Zn стресса не сопровождался снижением концентрации Са в листьях более устойчивого *A. caudatus* (Рис.3Б), что аналогично эффекту, описанному для растений при воздействии стресса засухи (Тоoulakou et al., 2016), и позволяет полагать, что выявленные изменения в пулах оксалата могут быть адаптивной реакцией и частью метаболического отклика в листьях амаранта на Cd и Zn воздействие.

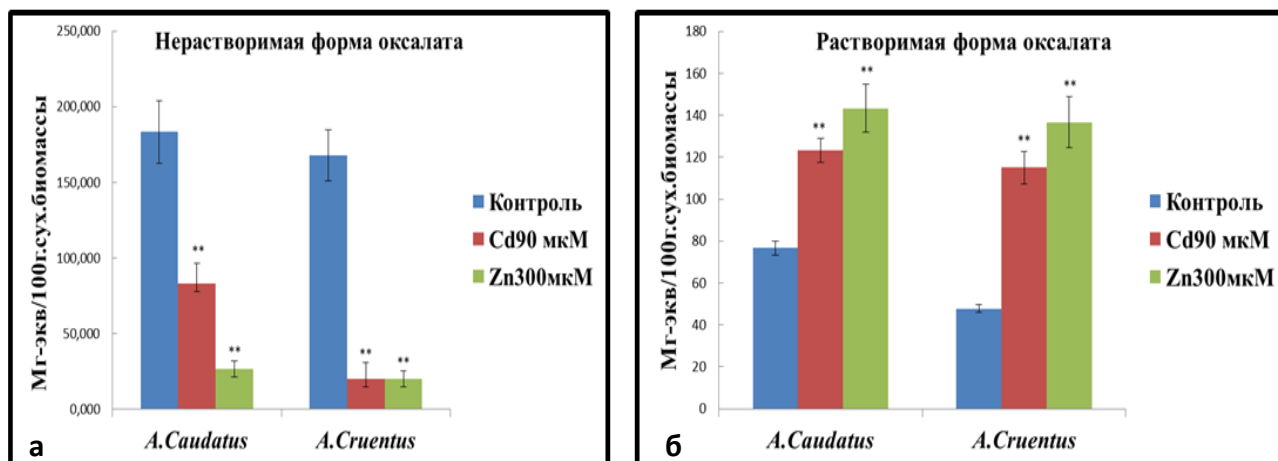


Рис. 4. Влияние Cd и Zn на содержание нерастворимой (а) и растворимой (б) фракций оксалата в листьях амаранта.

Роль условий минерального питания в ответных реакциях растений амаранта на действие тяжелых металлов.

Нами было исследовано влияние условий минерального питания, таких как форма источника азота и уровень pH среды, на показатели аккумуляции Cd и Zn в разных частях растений. Данные, полученные с экспериментов с созданием разных уровней pH среды ($4,5 \pm 0,2$ или $6,8 \pm 0,2$), свидетельствуют о несомненной

зависимости поступления и распределения Cd по органам амаранта от величины pH (Рис. 5). Было установлено, что концентрации Cd в кончике и в средней части корня *A. caudatus* при нейтральном pH вдвое превышали показатели, зафиксированные при pH 4,5, тогда как у основания корня концентрации выравнивались. В надземных органах наблюдалась прямо противоположная зависимость, а именно, концентрации Cd в стеблях и листьях амаранта при pH 4,5 возрастали в 3 - 4 раза по сравнению с pH 6,8 (рис. 5, а, б). При этом концентрация Cd в молодых листьях на фоне pH 4,5 достигла 650 мкг/г, однако это не привело к резкому торможению роста растений. Аккумуляция Zn при pH 6,8 возрастала только в кончике корня амаранта (Рис.5, в), тогда как в средней и базальной частях корня она оказалась выше при pH 4,5 (Рис. 5, в). Низкий уровень pH среды существенно стимулировал перенос Zn (как и Cd) в побег, в связи с чем концентрации Zn в зрелых и молодых листьях *A. caudatus* при pH 4,5 оказались в 2 и в 4 раза выше, чем при pH 6,8 (Рис.5, г).

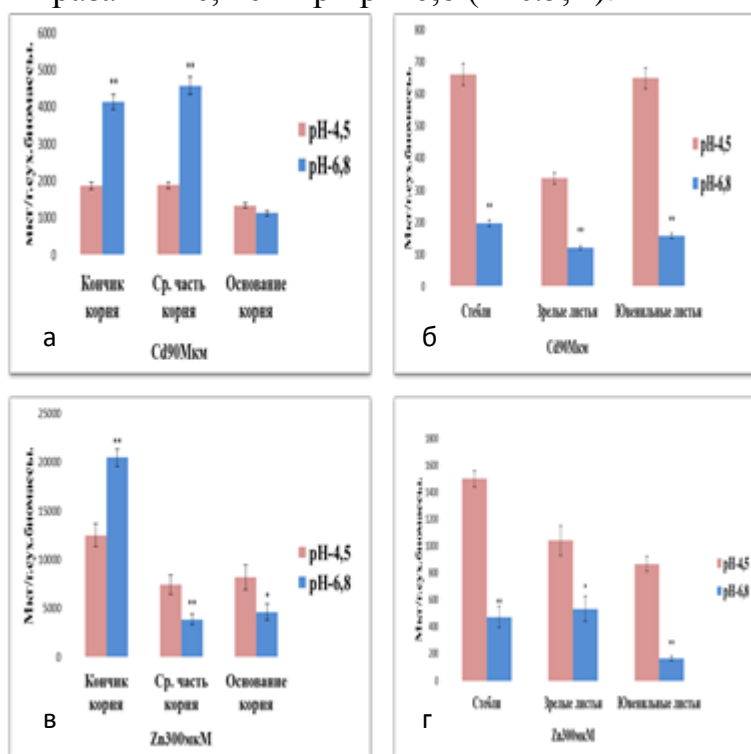


Рис. 5. Влияние pH питательного раствора на содержание Cd (а, б) и Zn (в, г) в корнях (а, в) и надземных органах (б, г) растений *A. caudatus* (* p < 0,05, **p < 0,01).

Расчет распределения Cd и Zn по органам амаранта в % от его общего содержания в растении, позволил установить, что при нейтральном pH среды корни амаранта аккумулировали 71% Cd и 65% Zn, поступивших в растения, и соответственно только 29% и 35% металлов перемещались в надземную часть (Рис.6), что отвечает стратегии эксклюдера. Однако при pH 4,5 показатель связывания металлов в корнях снизился до 23% (Cd) и 45% (Zn), а их перенос в побег достиг соответственно 73% и 55% от суммарного поступления. При этом Cd в большей степени задерживался на уровне стебля, чем Zn, и более интенсивно передвигался в молодые листья, где его аккумуляция составила 15% от суммы в растении (Рис.6). Т. о., при нейтральном pH среды создаются более благоприятные

условия для реализации стратегии эксклюдера путем связывания металлов в корнях и ограничения их переноса в метаболически активные фотосинтезирующие органы амаранта. В то же время, результаты исследования позволяют заключить, что в условиях повышенной кислотности среды барьерная функция корней *A. caudatus* более эффективно поддерживается в отношении Zn, чем Cd. Оценивая возможный механизм отмеченного эффекта pH, можно предположить, что в его основе лежит конкуренция ионов H^+ и Cd^{2+} (Zn^{2+}) за отрицательно заряженные сайты клеточной стенки, которая усиливается при pH 4,5 и может способствовать возрастанию трансмембранного переноса ионов металлов в клетки корня при участии постулируемых транспортеров или катионных каналов (Lux et al., 2011).

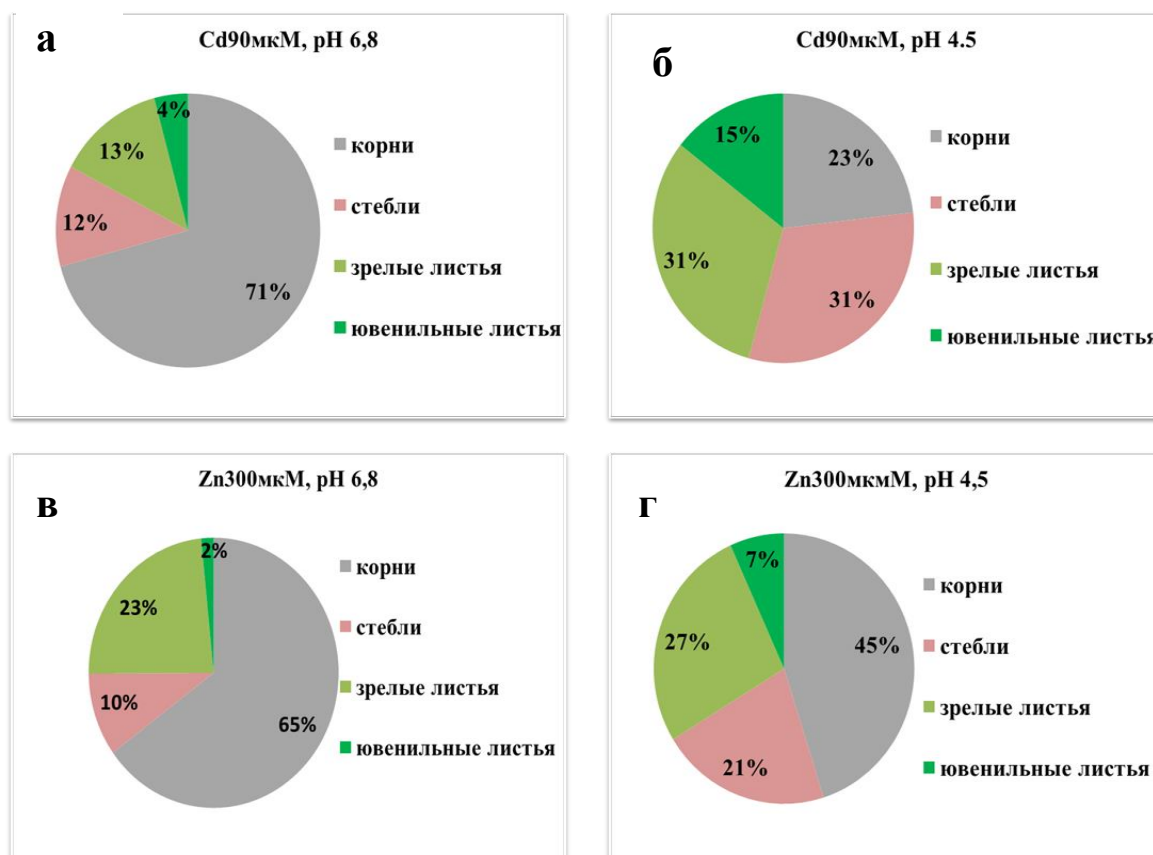


Рис.6. Распределение кадмия (а, б) и цинка (в, г) по органам растений *A. caudatus* при разных значениях pH среды (% от общего содержания металла в растении)

Анализ локализации кадмия и цинка в органах растений *Amaranthus caudatus*. Локализацию кадмия в корнях растений *A. caudatus* после 7 сут экспозиции на питательном растворе с pH 5,6 в присутствии 90 мкМ Cd определяли гистохимически путем окраски срезов корня дитизоном с последующим выявлением распределения Cd с использованием светового микроскопа. Как показали результаты анализа, в апикальной части корня наиболее интенсивно окрашивались клетки корневого чехлика с поверхностным слоем слизи (Рис. 7, а). Выше по главному корню в зоне дифференциации окрашенные комплексы кадмия

с дитизином выявлялись в клетках ризодермы, паренхимных клетках коры и клетках, окружающих сосуды (Рис. 7, б). Окраска была сосредоточена в апопласте по периметру клеток и не обнаруживалась в протопластах клеток. В центральной части корня интенсивность окраски повышалась в клетках, прилегающих к протоксилеме и метаксилеме, (Рис. 7, г), однако видимого присутствия Cd внутри сосудов установлено не было. В зоне проведения окрашивание было отмечено в просвете сосудов ксилемы, а также флоэмы (Рис. 7, в). Полученные данные, таким образом, подтверждают принципиальную роль апопласта клеток корней в связывании и детоксикации кадмия у растений *A.caudatus*, определяющую его барьерную функцию в ограничении переноса Cd в сосуды ксилемы.

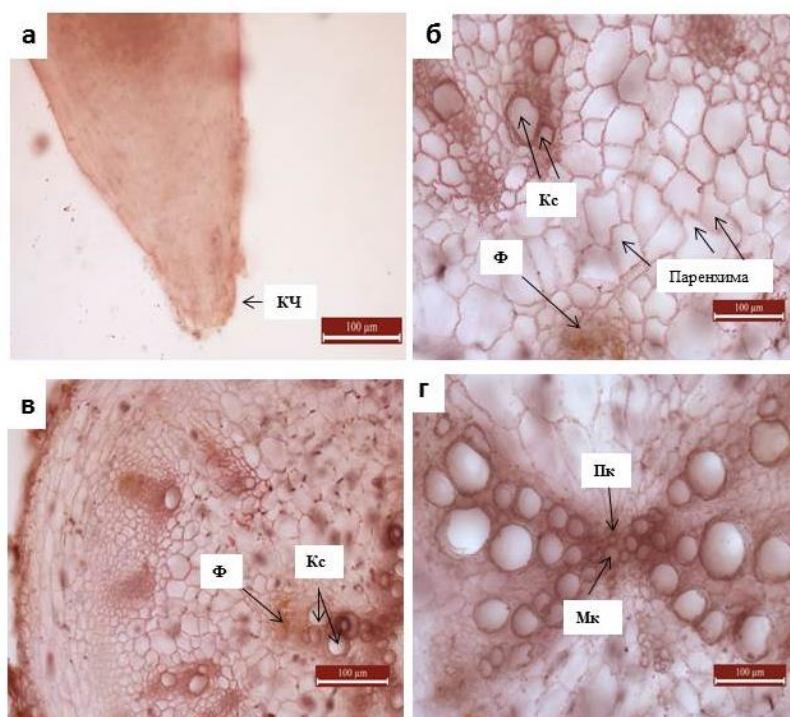


Рис.7. Локализация кадмия в корнях растений амаранта: (а) апикальная часть корня, (б, в, г) – главный корень. КЧ - корневой чехлик, сл-слизь, Ф-флоэма, Кс-ксилема, Мк-метаксилема, Пк-протоксилема.

Учитывая ранее установленный факт влияния Cd и Zn на пулы оксалата в листьях амаранта, было исследовано формирование кристаллов оксалата кадмия и цинка в листьях растений амаранта, экспонированных в присутствии этих металлов. Кристаллы оксалатов были выделены из зрелых листьев *A.caudatus* и спектры излучения входящих в их состав элементов исследовали с использованием метода энергодисперсионного анализа на растровом сканирующем электронном микроскопе. Результаты спектрального анализа, представленные на рис. 8, выявили присутствие в составе кристаллов оксалата помимо Ca, O и C также Cd и Zn. Как следует из полученных данных, доля Cd в выявленных кристаллах оксалата составила 0,102%, а доля Ca - 38,95% (Рис.8,а), что отвечает весовому соотношению Cd:Ca в кристаллах 1:390 и согласуется с результатами количественного анализа элементного состава зрелых листьев и позволяет полагать, что основная масса кадмия в зрелых листьях *A.caudatus* может находиться в форме оксалата. В отличие от этого доля Zn в кристаллах оксалата оказалась существенно ниже и составила 0,027% при 43.5% Ca (рис8, б). С учетом

более высоких концентраций Zn в сравнении с Cd в листьях амаранта (Рис 2), можно предположить, что степень участия Zn в кристаллах оксалата, в отличие от Cd, невелика и оксалат не является принципиальной кислотой, участвующей в детоксикации цинка в листьях амаранта.

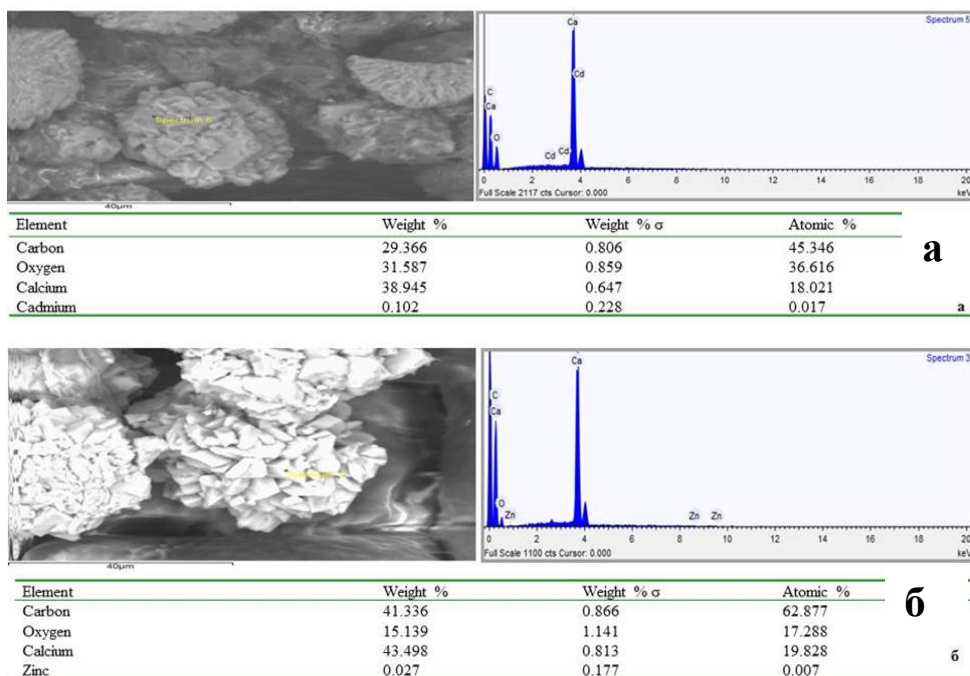


Рис.8. Энерго-дисперсионные спектры кристаллов оксалата кальция (а, б), оксалата кадмия (а) и оксалата цинка (б) в зрелых листьях *A. caudatus* после 7 суток экспонирования на растворе с 90мкМ Cd (а) и с 300мкМ Zn (б).

С

использованием метода рентгенодифракционного анализа был исследован фазовый состав кристаллов оксалата в органах растений амаранта (Рис.9)..

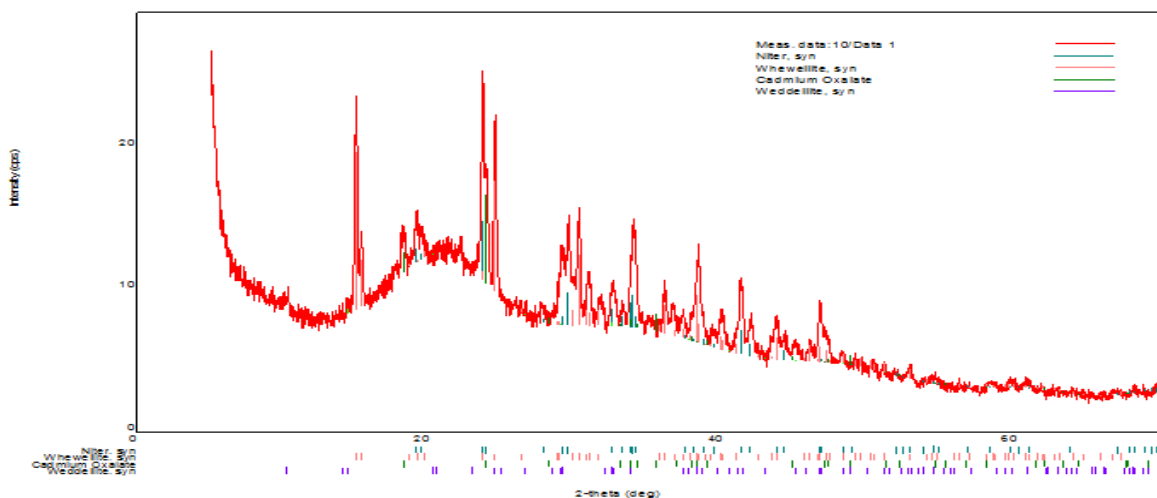


Рис. 9. Анализ фазового состава кристаллов оксалата в молодых листьях *A. caudatus* при 7 сут воздействии 90мкМ Cd на дифрактометре Bruker D2 Phaser .

Результаты исследования показали, что основной фазой оксалата в листьях амаранта является уэвеллит ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), на пороге обнаружения уэдделлит ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), а кадмий представлен в форме безводного оксалата кадмия

CdC_2O_4 , кристаллы которого в зрелых листьях обнаруживались уже на 3-и сутки воздействия Cd , а после 7 сут воздействия кристаллы оксалата кадмия были обнаружены не только в зрелых, но и в молодых листьях *A. caudatus* (Рис.9). Полученные данные впервые продемонстрировали присутствие кристаллов оксалата кадмия в листьях амаранта и позволяют заключить, что Cd , переносимый в листья *A. caudatus*, способен хелатироваться в них с образованием указанных кристаллов, что может быть принципиальным механизмом детоксикации Cd на уровне листа.

Исследование метаболического отклика на действие высоких концентраций кадмия и цинка в органах растений амаранта. Одним из актуальных приемов изучения устойчивости растений к действию стрессоров является исследование ответных реакций на уровне метаболома. Нами с использованием метода газовой хромато-масс-спектрометрии был проведен анализ метаболитных профилей в экстрактах из листьев и корней *A. cruentus* и *A. caudatus* в норме и при воздействии высоких концентраций Zn (300мкМ) и Cd (90мкМ). В исследуемых пробах было аннотировано от 64 до 76 метаболитов. Статистическая обработка массива данных с использованием метода главных компонент показала достоверность распределения точек, отвечающих вариантам контроля, 90мкМ и 300мкМ 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 1 (PC1) и от 17% до 39% для компоненты 2 (PC2).

Визуализация концентраций низкомолекулярных метаболитов, выделенных из листьев и корней амаранта, выполненная путем построения теплокарт, на которых относительное обилие аннотированных метаболитов в пробах отображено при помощи цвета, позволила выявить возрастание пулов одних и снижение пулов других метаболитов в органах растений относительно соответствующих контролей (Рис.10). Установлено, что в листьях растений при воздействии Cd и Zn повышалось содержание сахаров - глюкозы, фруктозы, сахарозы, маннозы и галактозы, особенно при воздействии Zn , а также органических кислот, в первую очередь, оксалата, малата и цитрата при воздействии Cd , тогда как содержание большинства аминокислот, напротив, снижалось. Только у *A. caudatus* в листьях был выявлен металл-индуцированный рост содержания ряда жирных и ароматических кислот, в частности, феруловой, азеалиновой и адипиновой, которые, по некоторым данным, могут выполнять антиоксидантную или сигнальную функцию в растениях (Voz, 2015; Wittek et al., 2014). В корнях, в отличие от листьев, прирост отмечался в основном среди сахаров, но не органических кислот, что, видимо, могло быть вызвано оттоком сахаров из листьев как важного энергетического и строительного ресурса при адаптации к стрессу. В корнях *A. caudatus* в ответ на внесение Cd и Zn в среду отмечалось увеличение содержания фосфорной и эритроновой кислот, аланина и мио-инозитола, тогда как в корнях *A. cruentus* пулы этих метаболитов снижались.

В отношении 14 наиболее значимых из аннотированных метаболитов дополнительно был проведен анализ их содержания в зрелых и ювенильных листьях и в корнях растений *A. caudatus*, с использованием метода калибровки по внешним стандартам, позволивший рассчитать их концентрации в мкмоль/г сухой биомассы и оценить их изменения при воздействии на растения Zn и Cd (Рис.11 и 12). Результаты анализа показали, что характер и степень метаболического отклика в листьях *A. caudatus* зависели от возраста листа. В молодых листьях, где преобладающими метаболитами в контроле были аланин и оксипролин, их уровни возросли в 1,2 и 1,5 раз при действии Zn и Cd, а содержание слабо представленных в контроле глюкозы и сахарозы возросло в присутствии Cd и Zn соответственно в 4 и 6 раз (Рис. 11, а, в). Изменения в содержании органических кислот в молодых листьях оказались незначительными. Принципиальным отличием зрелых листьев *A. caudatus* являлось преобладание в контроле оксалата среди всех исследованных метаболитов, прирост в содержании которого в ответ на внесение Cd достиг 1,7 раза, что хорошо коррелирует с выше приведенными данными о его участии в хелатировании Cd. Малат количественно значительно уступал оксалату в контроле, но в зрелом листе при действии Cd и Zn его концентрации возрастали в 2 и 4 раза. Прирост в содержании аминокислот был мало выражен, а уровни сахаров возросли в меньшей степени, чем в молодом листе, при этом более существенно (в 3 раза) - в ответ на воздействие Zn (Рис.11, б, г).

В корнях *A. caudatus* наиболее значимые изменения среди исследованных метаболитов в ответ на действие металлов произошли в содержании глюкозы (рост более, чем в 2 раза), тогда как в уровнях сахарозы, а также органических кислот существенных количественных изменений не наблюдалось (Рис.12, а, б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования показали, что устойчивость растений амаранта к действию высоких концентраций Cd и Zn определяется работой механизмов, функционирующих как в корнях, так и в листьях растений. Установлено, что в корнях амаранта приоритетным является иммобилизация металлов на уровне апопласта, тогда как в листьях принципиальным является метаболический отклик на действие ТМ, ключевая роль в котором принадлежит возрастанию пулов органических кислот. Данные исследования позволяют заключить, что органические кислоты могут участвовать в детоксикации ионов Cd^{2+} и Zn^{2+} на уровне листа *A. caudatus*, что сопровождалось формированием безводных кристаллов оксалата кадмия, и, в меньшей степени, оксалата цинка. Впервые показано, что характер метаболического отклика на ТМ стресс в листьях амаранта зависит от возраста листа, что выразилось в преобладании прироста малата и оксалата в зрелых листьях в сравнении с преобладанием прироста сахаров в ювенильном листе и максимально проявилось в ответе на воздействие Cd. Заключается, что в зрелых листьях происходит интенсификация цикла Кребса, способствующая в условиях стресса (Keunen et al., 2010; Xie et al., 2014) генерации восстановительных агентов, АТФ и продукции C скелетов для синтеза аминокислот.

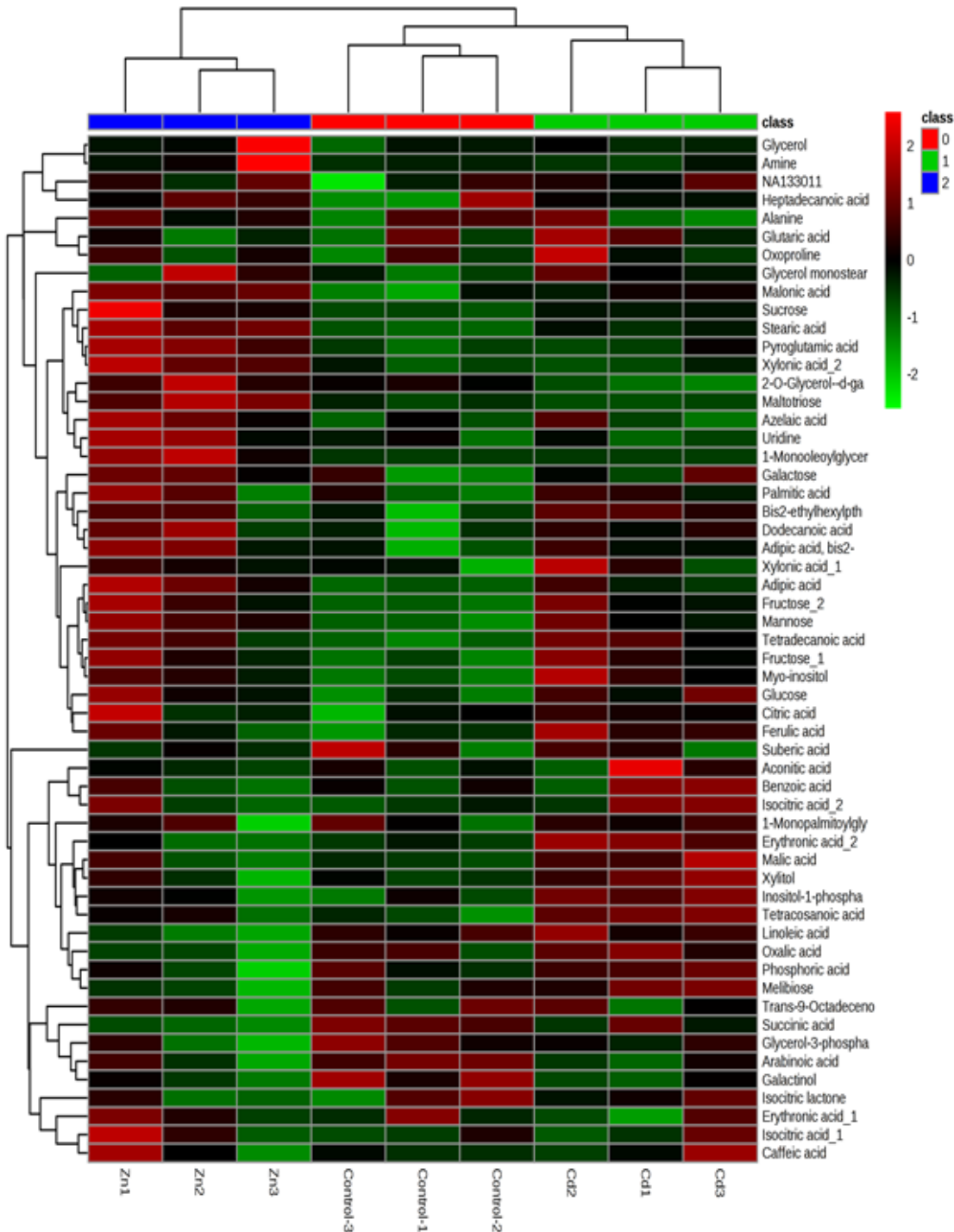


Рис.10. Визуализация концентраций низкомолекулярных метаболитов (теплокарта), выделенных из молодых листьев *A.caudatus*. Каждая строка на теплокарте представляет метаболит, а каждая колонка - анализируемую пробу: Zn 1-3 - Zn300 мкМ, Control 1-3 – контроль, Cd 1-3 - Cd90 мкМ. Зеленый цвет отвечает минимальной, красный - максимальной концентрации метаболита в сравниваемых пробах.

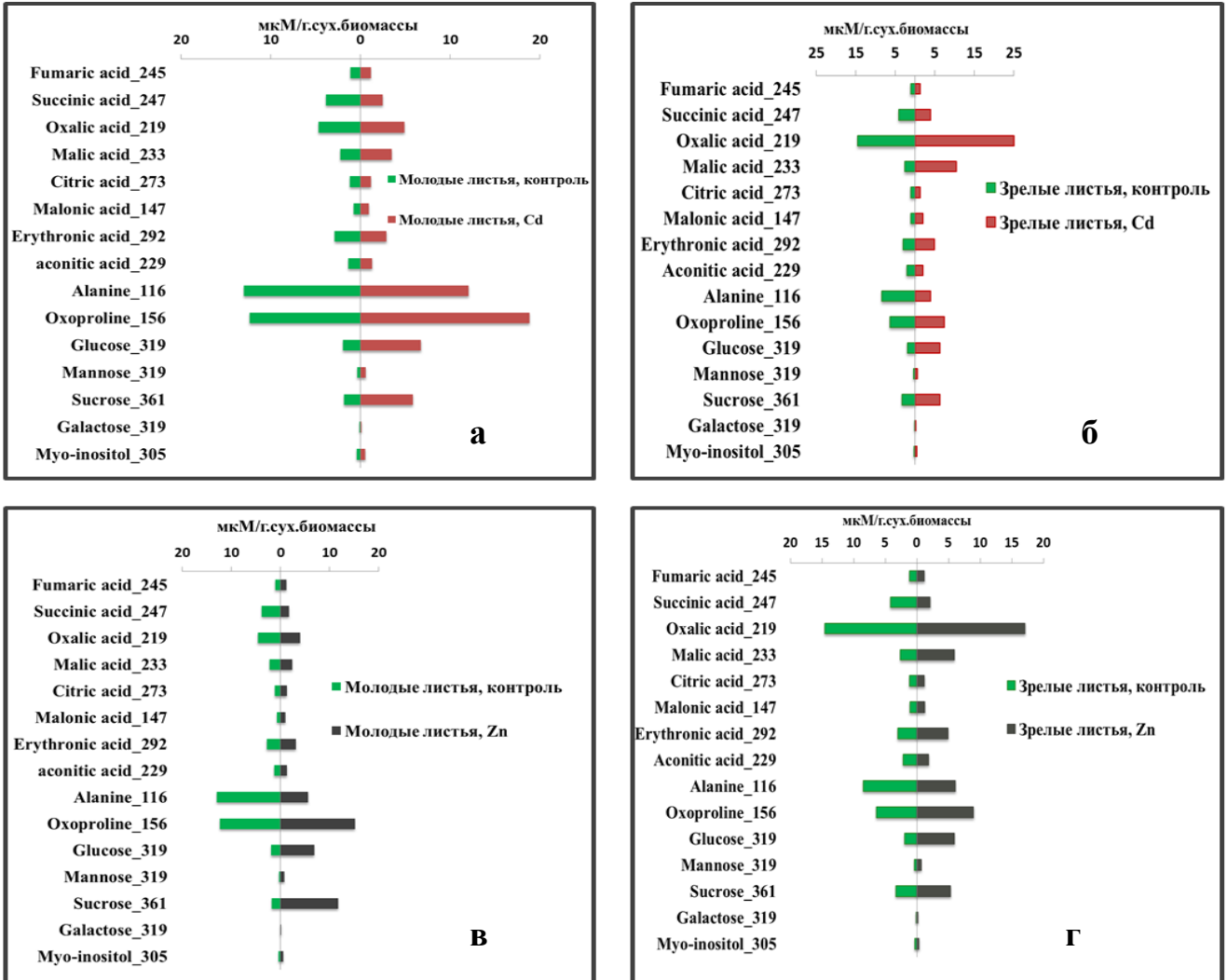


Рис.11. Содержание метаболитов в молодых (а, в) и зрелых (б, г) листьях растений *A. caudatus* в контроле и при воздействии 90 μM Cd (а, б) и 300 μM Zn (в, г).

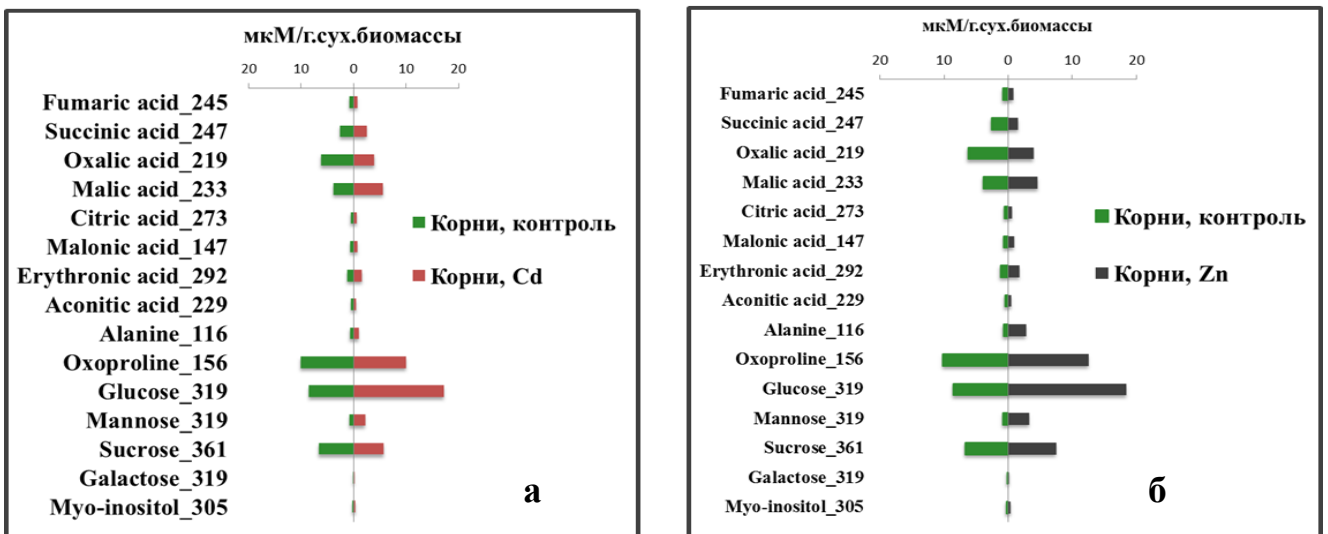


Рис.12. Содержание метаболитов в корнях растений *A. caudatus* в контроле и при воздействии 90 μM Cd (а) и 300 μM Zn (б).

ВЫВОДЫ

1. Анализ особенностей роста и развития растений амаранта на среде с высокими концентрациями Cd (90 мкМ) и Zn (300мкМ) показал, что растения *Amaranthus caudatus* более устойчивы к действию кадмия и цинка, чем *Amaranthus cruentus*.
2. При выращивании растений *A.caudatus* на среде с рН 6,8 кадмий и цинк накапливаются преимущественно в апопласте клеток корней. Впервые показано, что рН 4,5 препятствует эффективному связыванию Cd и Zn в корнях, в результате чего наблюдается повышенная аккумуляция этих металлов в побегах.
3. С использованием методов электронной микроскопии и рентгено-дифракционного анализа впервые продемонстрировано формирование кристаллов оксалата кадмия в листьях растений *A.caudatus*, выращенных на среде с высокими концентрациями Cd. Выдвинуто предположение, что связывание кадмия в виде кристаллов оксалата является одним из механизмов детоксикации этого металла в листьях амаранта.
4. Показано, что Cd и Zn инициируют изменения профилей низкомолекулярных метаболитов в корнях и листьях растений амаранта. Установлено, что ключевыми соединениями в метаболическом отклике корней на действие высоких концентраций Cd и Zn являются сахара, а в листьях – органические кислоты.
5. Впервые продемонстрирована зависимость метаболического отклика на Cd и Zn от возраста листа. В ответ на действие Cd и Zn в молодых листьях *A. caudatus* увеличивалось содержание сахаров, а в зрелых листьях - оксалата и кислот цикла Кребса.
6. Установлена принципиальная роль возрастания пулов малата и оксалата в зрелых листьях *A.caudatus* в ответ на действие Cd и Zn стресса, что, по-видимому, связано с их функциональным участием в хелатировании металлов как механизме обеспечения устойчивости растений амаранта при продолжительном воздействии тяжелых металлов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Осмоловская Н.Г., Кучаева Л.Н., Ву Вьет Зунг, Попова Н.Ф. Гидропонные технологии в управлении урожаем и качеством растительной продукции // Агрофизика. 2017. № 2. С.19-29.
2. Osmolovskaya N., Vu Viet Dung, Kuchaeva L. The role of organic acids in heavy metal tolerance in plants // Bio. Com. (Вестник Санкт-Петерб. Ун-та., Серия Биология). 2018. V. 63(1). P. 8-16.
3. Осмоловская Н.Г., Ву Вьет Зунг, Кудряшева З.К., Кучаева Л.Н., Попова Н.Ф.. Влияние кадмия на распределение калия, кальция, магния и аккумуляцию оксалата в растениях *Amaranthus cruentus* L. // Физиология растений. 2018. Т.65,№ 4 (в печати).

4. Ву Вьет Зунг, Сазанова К.В., Осмоловская Н.Г. Анализ устойчивости растений рода *Amarantus* в условиях стрессового воздействия цинка и кадмия // В книге: Тезисы докладов III (XI) Международной Ботанической Конференции молодых ученых в Санкт-Петербурге. Санкт-Петербург. 2015. С. 74.
5. Осмоловская Н.Г., Кучаева Л.Н., Ву Вьет Зунг. Функциональная роль органических кислот в системе ионного гомеостаза у гликофитов // В книге: «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий». Петрозаводск: Карельский НЦ РАН. 2015. С.410.
6. Кучаева Л.Н., Ву Вьет Зунг, Осмоловская Н.Г. Значение факторов минерального питания в обеспечении устойчивости растений к воздействию тяжелых металлов // В книге: «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий». Петрозаводск: Карельский НЦ РАН. 2015. С.299.
7. Ву Вьет Зунг, Кучаева Л.Н., Попова Н.Ф., Осмоловская Н.Г. Роль оксалата в механизмах адаптации растений рода *Amaranthus* к условиям Zn и Cd стресса // В книге: «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий». Петрозаводск: Карельский НЦ РАН. 2015. С.116
8. Osmolovskaya N.G., Vu Viet Dung, Kuchaeva L.N., Popova N.F. Cd induced growth and ion responses in leaves of amaranth plants// Proceedings of 4th International Symposium "Plant Signaling and Behavior". Saint Petersburg: SINEL. Co. Ltd. 2016. P. 51-52.
9. Осмоловская Н.Г., Ву Вьет Зунг, Кучаева Л.Н., Сазанова К.В. Метаболомный ответ на действие Cd в надземных органах растений *Amaranthus caudatus* // Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма. Материалы Годичного собрания ОФР России. СПб: СПбГУ. 2016. С.35-36.
10. Осмоловская Н.Г., Ву Вьет Зунг, Кучаева Л.Н., Попова Н.Ф. Метаболитный отклик в листьях *Amaranthus caudatus* L. и *Amaranthus cruentus* L. на сублетальное воздействие цинка и кадмия// IV Вавиловская международная конференция «Идеи Н. И. Вавилова в современном мире». Тезисы докладов. СПб: ВИР. 2017. С.195.