

УДК 581.1

СОДЕРЖАНИЕ НЕПРОТЕИНОВЫХ ТИОЛОВ
В РАСТЕНИЯХ *SETARIA VIRIDIS* ПРИ ДЕЙСТВИИ КАДМИЯ

Н.М. Казнина, А.Ф. Титов, Ю.В. Батова, Г.Ф. Лайдинен

THE CONTENT OF NON-PROTEIN THIOLS IN *SETARIA VIRIDIS*
TO CADMIUM ACTION

N.M. Kaznina, A.F. Titov, Y.V. Batova, G.F. Laidinen

В условиях вегетационного опыта изучено влияние кадмия (100 мкМ) на рост щетинника зеленого (*Setaria viridis* L. (Beauv.)), а также на содержание непротеиновых тиолов в клетках корня и листа растений. Определена концентрация металла в органах растений. Проведенные исследования выявили высокую устойчивость щетинника к кадмию, ингибирующего действия металла в отношении накопления растениями биомассы не наблюдалось, индекс устойчивости был равен 0.91. При этом содержание кадмия в органах растений оказалось относительно высоким, причем не только в корне, но и в листе. Устойчивость растений к металлу обеспечивается действием клеточных механизмов детоксикации, в частности, связыванием токсичных ионов непротеиновыми тиолами. Нами обнаружено снижение в присутствии кадмия уровня восстановленного глутатиона (GSH) и одновременно с этим резкое увеличение количества фитохелатинов. Наиболее ярко выраженные изменения концентрации непротеиновых тиолов отмечены в листе, несмотря на меньшее содержание в нем кадмия. Предполагается, что высокий уровень фитохелатинов в листе является важным механизмом устойчивости растений к кадмию, обеспечивающим защиту клеток мезофилла от токсичных ионов и позволяющим поддерживать работу фотосинтетического аппарата на необходимом уровне.

Setaria viridis L. (Beauv.), кадмий, восстановленный глутатион, фитохелатины

In vegetation conditions the effect of cadmium (100 mcM) on the growth of green foxtail (*Setaria viridis* L. (Beauv.)) and also on the content of non-protein thiols in root and leaf cells were studied. The concentration of metal in bodies of plants was defined. The researches revealed high resistance of a foxtail to cadmium, inhibiting the effect of metal concerning accumulation by plants of biomass wasn't observed, the stability index was equal 0.91. Thus the content of cadmium in plant organs was relatively high, and not only in a root, but also in a leaf. Plants resistance to metal provided by cellular detoxification mechanisms, in particular, the binding of toxic ions by non-protein thiols. We have found the decrease of the reduced glutathione (GSH) level and at the same time the sharp increase in the amount of phytochelatins. The most clearly changes marked in a leaf despite the minimal content of cadmium. It is assumed that the high level of the phytochelatins in the leaves is an important mechanism of plant tolerance to cadmium, with the protect of mesofyll cells from the toxic ions and allows to support work of the photosynthesis apparatus at a high level.

Setaria viridis L. (Beauv.), cadmium, reduced glutathione, phytochelatins

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее эффективных и экономически выгодных методов, обеспечивающих очистку почв от загрязнения тяжелыми металлами, является фиторемедиация. Но для успешного ее применения на практике необходим поиск и изучение видов растений, способных произрастать на почвах, загрязненных тяжелыми металлами, накапливать их в значительном количестве в своих органах и формировать при этом большую биомассу. Одним из таких видов, как показали наши предыдущие исследования, является щетинник зеленый (сем. Poaceae), который успешно растет и развивается в присутствии довольно высоких концентраций тяжелых металлов в почве [1, 2]. Однако механизмы металлоустойчивости этого вида пока практически не изучены.

Учитывая, что наиболее важным механизмом устойчивости растений к кадмию является его детоксикация в цитоплазме клеток непротеиновыми тиолами [3], цель данной работы заключалась в изучении влияния этого металла на содержание GSH и фитохелатинов в корнях и листьях растений щетинника зеленого (*Setaria viridis* L. (Beauv.)).

МЕТОДЫ

Растения щетинника зеленого выращивали в песчаном субстрате до фазы 3-трех листьев, после чего их помещали на питательный раствор (контроль) или на питательный раствор с добавлением 100 мкМ кадмия в форме сульфата (опыт). Через 4 сут экспозиции в корне и листе, сформированном за это время, определяли концентрацию кадмия и содержание GSH и фитохелатинов, а также оценивали влияние металла на накопление биомассы растениями и рассчитывали индекс устойчивости.

Содержание кадмия в корнях и листьях растений определяли методом инверсионной вольтамперометрии с использованием полярографа АВС-1.1 (Вольта, Россия). Разложение растительных образцов проводили в смеси HNO_3 и H_2O_2 в соотношении 4:1 с использованием микроволновой системы пробоподготовки МС-6 (Вольта, Россия). Индекс устойчивости (I_i) вычисляли по формуле: $I_i = I_{Me}/I_k$, где I_{Me} – биомасса растений опытного варианта; I_k – биомасса растений контрольного варианта. Количество GSH и фитохелатинов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с предколоночной дериватизацией с монобромобиманом согласно методике Снеллера [4] по стандарту GSH (“Sigma”). Расчет площадей пиков осуществляли с помощью компьютерной программы МультиХром (Версия 1,5X).

Биологическая повторность в пределах каждого варианта опыта варьировала в зависимости от изучаемого показателя от 6 до 20 растений. Аналитическая повторность при проведении химических анализов была 3-5-кратной. Весь опыт повторяли дважды. О достоверности различий судили по критерию Стьюдента при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что щетинник зеленый способен накапливать в корнях и листьях довольно большое количество кадмия (табл. 1). Только за 4 дня экспозиции на растворе с металлом его содержание в корнях и в листьях резко возрастало.

Таблица 1. Содержание кадмия (мг/кг сырого веса) в органах растений *Setaria viridis* после 4-дневной экспозиции на растворе с металлом (100 мкМ)

Table 1. The content of cadmium (mg/g fw) in root and shoot of *Setaria viridis* after 4-days exposure to the Cd²⁺ (100 мкМ)

Вариант	Орган растения	
	корень	лист
Контроль	0.3 ± 0.01	< 0.01
Cd ²⁺	49.99 ± 7.0	4.74 ± 0.01

Тем не менее негативное влияние кадмия на рост растений нами не зафиксировано. В частности, накопление сырой и сухой биомассы растениями в опыте и контроле практически не отличалось между собой (табл. 2). Индекс устойчивости при этом оказался равным 0.91. Для примера, при этих же условиях у растений ячменя содержание металла в корнях и листьях было равным 20.5 и 2.4 мкг/г сырого веса, соответственно, а индекс устойчивости составлял 0.71 [5].

Как уже отмечалось во введении, и GSH, и фитохелатины участвуют в связывании токсичных ионов в цитоплазме клеток, обеспечивая тем самым устойчивость растений к кадмию [3; 6-8]. При этом GSH является предшественником фитохелатинов, а также может сам участвовать в хелатировании ионов металлов [9]. В наших исследованиях в присутствии кадмия количество GSH в клетках растений заметно снижалось, причем более сильно

Таблица 2. Влияние кадмия на накопление биомассы растениями *Setaria viridis* после 4-дневной экспозиции на растворе с металлом (100 мкМ)

Table 2. Effect of cadmium on biomass accumulation of *Setaria viridis* after 4-days exposure to the Cd²⁺ (100 мкМ)

Вариант	Биомасса растений, мг	
	сырая	сухая
Контроль	220.7 ± 7.3	11.9 ± 0.7
Cd ²⁺	212.6 ± 6.8	10.4 ± 1.0

(в 2.4 раза) в листе, что, вероятнее всего, связано с расходом его молекул на синтез фитохелатинов (рис. 1). Тем не менее его содержание в листьях оставалось более высоким (почти в 2 раза) по сравнению с корнями.

Полученный результат можно, очевидно, объяснить тем, что в нормальных условиях среды листья синтезируют GSH в избытке, экспортируя его в другие ткани. В условиях же повышенных концентраций тяжелых металлов во внешней среде и в самом растении экспорт GSH сокращается, сохраняя его относительно высокое содержание в листе [10].

Одновременно со снижением уровня GSH в клетках растений в присутствии кадмия резко возрастало содержание фитохелатинов (рис. 2). Причем в листе их количество оказалось выше, чем в корне.

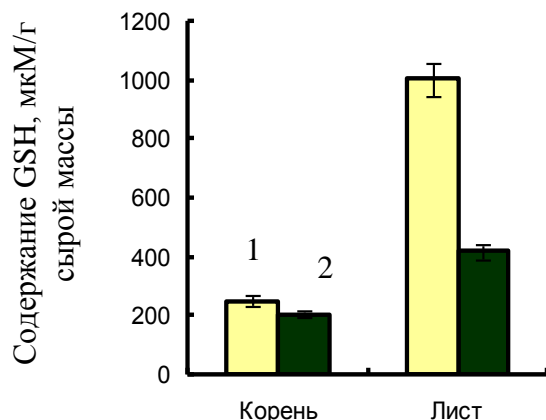


Рис. 1. Содержание GSH в клетках корня и листа растений *Setaria viridis* после 4-дневной экспозиции на растворе с Cd²⁺ (100 мкМ). 1 – контроль, 2 – опыт
 Fig. 1. The content of GSH in root and leaf of *Setaria viridis* after 4-days exposure to the Cd²⁺ (100 мкМ). 1 – control; 2 – Cd²⁺.

Увеличение содержания фитохелатинов в клетках растений под влиянием кадмия отмечено во многих исследованиях [11-13]. При этом более заметное повышение их концентрации в листьях по сравнению с корнями (несмотря на меньшее содержание в них кадмия) отмечено у кукурузы [14], ячменя [15] и табака [16]. Авторы полагают, что это является важным механизмом металлоустойчивости растений, обеспечивающим защиту клеток мезофилла от токсичных ионов и позволяющим поддерживать работу фотосинтетического аппарата на высоком уровне.

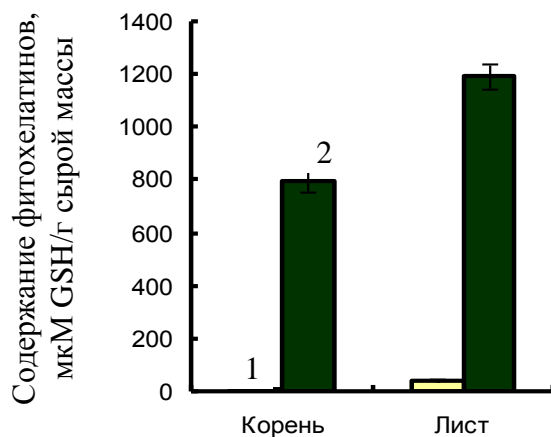


Рис. 2. Содержание фитохелатинов в клетках корня и листа растений *Setaria viridis* после 4-дневной экспозиции на растворе с Cd²⁺ (100 мкМ). 1 – контроль, 2 – опыт

Fig. 2. The content of phytochelatin in root and leaf of *Setaria viridis* after 4-days exposure to the Cd²⁺ (100 мкМ). 1 – control; 2 – Cd²⁺

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование подтвердило, что щетинник зеленый обладает способностью успешно расти и развиваться в условиях повышенного содержания в почве кадмия, формируя при этом большую биомассу и, что особенно важно для фиторемедиации, накапливает этот металл в своих органах в значительных количествах. Судя по полученным данным, важную роль в устойчивости щетинника к кадмию играют фитохелатины, содержание которых в корнях и листьях растений при действии металла существенно возрастает. Особенно резкое (почти на порядок) повышение уровня фитохелатинов происходит в листе, что, очевидно, способствует активному связыванию ионов кадмия и тем самым защите клеток мезофилла от его токсического действия.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития».

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Лайдинен, Г.Ф. Влияние свинца на рост и развитие *Setaria viridis* L. (Beauv.) / Г.Ф. Лайдинен [и др.]. // Растительные ресурсы. – 2004. – Т. 40. – Вып. 3. – С. 53-59.
2. Казнина, Н.М. Устойчивость щетинника зеленого к повышенным концентрациям цинка / Н.М. Казнина [и др.]. // Известия РАН. Серия биологическая. – 2009. – № 6. – С. 677-684.
3. Cobbett, C.S. Phytochelatins and Their Roles in Heavy Metal Detoxification // Plant Physiol. – 2000. – V. 123. – P. 825-832.
4. Sneller, F.E.S. / Derivatization on Phytochelatins from *Silene vulgaris*, Induced upon Exposure to Arsenate and Cadmium: Comparison of Derivatization with Ellman's Reagent and Monobrombimane // F.E.S. Sneller [et al.]. // J. Agric. Food Chem. – 2000. – V. 48. – P. 4014-4019.
5. Казнина, Н.М. Влияние возрастных различий на устойчивость растений ячменя к кадмию / Н.М. Казнина [и др.]. // Физиология растений. – 2012. – № 1. – С. 74-79.
6. Sanità di Toppi, L. Response to Cadmium in Higher Plants / L. Sanità di Toppi, R. Gabbrielli // Environ. Exp. Bot. – 1999. – V. 41. – P. 105-130.
7. Mendoza-Cózatl, D.G. Long-distance Transport, Vacuolar Sequestration, Tolerance, and Transcriptional Responses Induced by Cadmium and Arsenic / D.G. Mendoza-Cózatl [et al.]. // Curr. Opin. Plant Biol. – 2011. – V. 14. – P. 554-562.
8. Cobbett, C. Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis / C. Cobbett, P. Goldsbrough // Annu. Rev. Plant. – Biol. – 2002. – V. 53. – P. 159-182.
9. Hall J.L. Cellular Mechanisms for Heavy Metal Detoxification and Tolerance / J.L. Hall // J. Exp. Bot. – 2002. – V. 53. – P. 1-11.
10. Heiss, S. Phytochelatin Synthase (PCS) Protein is Induced in *Brassica juncea* Leaves after Prolonged Cd Exposure / S. Heiss [et al.]. // J. Exp. Bot. – 2003. – V. 54. – P. 1833-1839.
11. Clemens S., Simm C. *Schizosaccharomyces pombe* as a Model for Metal Homeostasis in Plant Cell: Phytochelatin-dependent Payway Is the Main Cadmium

Detoxification Mechanism / S., Clemens, C., Simm // *New Phytol.* – 2003. – V. 159. – P. 323–330.

12. Seregin, I.V. Effect of Cadmium and Lead on Phytochelatin Accumulation in Maize Shoots and Different Root Parts / I.V. Seregin [et al.] // *Dokl. Biol. Sci.* – 2007. – V. 415. – P. 304-306.

13. Souza, J.F., Rauser W.E. Maize and radish sequester excess cadmium and zinc in different ways / J.F. Souza, W.E. Rauser // *Plant Sci.* 2003. V. 165. P. 1009–1022.

14. Wójcik, M., Tukiendorf A. Cadmium Uptake, Localization and Detoxification in *Zea mays* / M. Wójcik, A. Tukiendorf // *Biol. Plant.* – 2005. – V. 49, N 2. – P. 237–245.

15. Wójcik, M. Cd-tolerance of Maize, Rye and Wheat Seedlings / M. Wójcik, A. Tukiendorf // *Acta Physiol. Plant.* – 1999. – V. 21, № 2. – P. 99-107.

16. Akhter, M.F. Reduced Translocation of Cadmium from Roots is Associated with Increased Production of Phytochelatins and their Precursors / M.F. Akhter, B. McGarvey, S.M. Macfie // *J. Plant Physiol.* – 2012. – V. 169. – P. 1821-1829.

17. Wojas, S. Overexpression of Phytochelatin Synthase in Tobacco: Distinctive Effects of *AtPCS1* and *CePCS* genes on Plant Response to Cadmium / S. Wojas [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2008. – V. 59. – P. 2205-2219.

REFERENCES

1. Lajdinen G.F. Vlijanie svinca na rost i razvitie *Setaria viridis* L. (Beauv.) [Lead influence on the growth and the evolution of *Setaria viridis* L. (Beauv.)]. *Rastitel'nye resursy* [Plant resources]. 2004, vol. 40, no. 3, pp. 53-59.

2. Kaznina N.M. Ustojchivost' shhetinnika zelenogo k povyshennym koncentracijam cinka [The resistance of green foxtail to zinc increased concentrations]. *Izvestija RAN. Serija biologicheskaja* [The news of RAS. The biological series]. 2009, no. 6, pp. 677-684.

3. Cobbett C.S. Phytochelatins and Their Roles in Heavy Metal Detoxification. *Plant Physiol*, 2000, vol. 123, pp. 825-832.

4. Sneller F.E.S [et al.]. Derivatization on Phytochelatins from *Silene vulgaris*, Induced upon Exposure to Arsenate and Cadmium: Comparison of Derivatization with Ellman's Reagent and Monobrombimane. *J. Agric. Food Chem*, 2000, vol. 48, pp. 4014-4019.

5. Kaznina N.M. [i dr.]. Vlijanie vozrastnyh razlichij na ustojchivost' rastenij jachmenja k kadmiju [Age-specific differences influence on the resistance of plants to cadmium. *Fiziologija rastenij* [The vegetable physiology]. 2012, no. 1, pp. 74-79.

6. Sanità di Toppi L., Gabbriellini R. *Response to Cadmium in Higher Plants*. *Environ. Exp. Bot.* 1999, vol. 41, pp. 105-130.

7. Mendoza-Cózatl D.G. [et al.]. *Long-distance Transport, Vacuolar Sequestration, Tolerance, and Transcriptional Responses Induced by Cadmium and Arsenic*. *Curr. Opin. Plant Biol*, 2011, vol. 14, pp. 554–562.

8. Cobbett C., Goldsbrough P. *Phytochelatin and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis*. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 2002, vol. 53, pp. 159-182.

9. Hall J.L. *Cellular Mechanisms for Heavy Metal Detoxification and Tolerance*. *J. Exp. Bot.* 2002, vol. 53, pp. 1-11.

10. Heiss S. [et al.]. *Phytochelatin Synthase (PCS) Protein is Induced in Brassica juncea Leaves after Prolonged Cd Exposure*. J. Exp. Bot. 2003, vol. 54, pp. 1833-1839.
11. Clemens S., Simm C. *Schizosaccharomyces pombe as a Model for Metal Homeostasis in Plant Cell: Phytochelatin-dependent Payway Is the Main Cadmium Detoxification Mechanism*. New Phytol, 2003, vol. 159, pp. 323-330.
12. Seregin I.V. [et al.]. *Effect of Cadmium and Lead on Phytochelatin Accumulation in Maize Shoots and Different Root Parts*. Dokl. Biol. Sci. 2007, vol. 415, pp. 304-306.
13. Souza J.F., Rauser W.E. *Maize and radish sequester excess cadmium and zinc in different ways*. Plant Sci. 2003, vol. 165, pp. 1009-1022.
14. Wójcik M., Tukiendorf A. *Cadmium Uptake, Localization and Detoxification in Zea mays*. Biol. Plant. 2005, vol. 49, no. 2, pp. 237-245.
15. Wójcik M., Tukiendorf A. *Cd-tolerance of Maize, Rye and Wheat Seedlings*. Acta Physiol. Plant. 1999, vol. 21, no. 2, pp. 99-107.
16. Akhter M.F., McGarvey B., Macfie S.M. *Reduced Translocation of Cadmium from Roots is Associated with Increased Production of Phytichelatins and their Precursors* J. Plant Physiol. 2012, vol. 169, pp. 1821-1829.
17. Wojas S. [et al.]. *Overexpression of Phytochelatin Synthase in Tobacco: Distinctive Effects of AtPCS1 and CePCS genes on Plant Response to Cadmium*. J. Exp. Bot. 2008, vol. 59, pp. 2205-2219.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Казнина Наталья Мстиславовна – Институт биологии Карельского научного центра РАН, к.б.н., ст. научный сотрудник, E-mail: kaznina@krc.karelia.ru

Kaznina Natalia Mstislavovna – Institute of Biology, Karelian Research Centre RAS, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, E-mail: kaznina@krc.karelia.ru

Титов Александр Федорович – Институт биологии Карельского научного центра РАН, д.б.н., профессор, E-mail: titov@krc.karelia.ru

Titov Aleksandr Fyodorovich – Institute of Biology, Karelian Research Centre RAS, Doctor of Biology, Professor, E-mail: titov@krc.karelia.ru

Батова Юлия Валерьевна – Институт биологии Карельского научного центра РАН, к.б.н., ст. научный сотрудник, E-mail: batova@krc.karelia.ru

Batova Julia Valeryevna – Institute of Biology, Karelian Research Centre RAS, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, E-mail: batova@krc.karelia.ru

Лайдинен Галина Федоровна – Институт биологии Карельского научного центра РАН, к.б.н., ст. научный сотрудник, E-mail: laidinen@krc.karelia.ru

Laidinen Galina Fyodorovna – Institute of Biology, Karelian Research Centre RAS, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, E-mail: laidinen@krc.karelia.ru