
ДИНАМИКА АККУМУЛЯЦИИ НИКЕЛЯ И ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ ДЕФИЦИТА ЖЕЛЕЗА В ЛИСТЯХ ГИБРИДНОЙ ФОРМЫ АМАРАНТА

А.И. Черемисина¹, Н.И. Шевякова¹,
Вл.В. Кузнецов^{1,2}

¹Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
ул. Ботаническая, 35, Москва, Россия, 127276

²Кафедра ботаники, физиологии растений и агробиотехнологии
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198

Растения амаранта гибридной формы *Amaranthus paniculatus f. cruentus* (Вишневый джем) выращивали в камере фитотрона на питательной среде Джонсона с добавлением 2 мкМ Fe³⁺-ЭДТА. В возрасте 6 недель в среду однократно вносили NiCl₂. Присутствие в среде выращивания растений 100 и 200 мкМ NiCl₂ резко тормозило поступление Fe в стареющие и особенно молодые листья. В статье обсуждаются возможные механизмы конкуренции Ni и Fe и роль этого явления в определении уровня фиторемедиационного потенциала растений амаранта.

Ключевые слова: окислительный стресс, накопление никеля, дефицит железа, *Amaranthus L.*, фиторемедиация.

Никель (Ni) — тяжелый металл (ТМ) с высокой токсичностью, загрязнение которым городских экосистем в последние годы принимает угрожающие размеры [1]. Концентрация Ni в атмосфере города значительно возрастает вблизи металлургических и электрогальванических предприятий и колеблется от 3 до 100 мкг/л воздуха.

Для очистки территорий, загрязненных ТМ, большую актуальность приобретает использование технологии фиторемедиации [2], эффективность применения которой зависит от подбора устойчивых к ТМ видов растений, способных аккумулировать их в наземной биомассе.

Весьма перспективными видами растений, широко используемыми для озеленения городов, могут быть представители рода *Amaranthus L.*, урожайность зеленой массы которых достигает 100 т/га.

На почвах, загрязненных ТМ, несмотря на пониженный урожай зеленой биомассы (55 т/га), культивируемые сорта амаранта отличаются высоким выносом Cd, Pb, Cu, что делает растения этого рода весьма многообещающими для очистки техногенных почв.

Ранее нами было установлено, что гибридные формы амаранта относительно устойчивы к избытку Ni, но при этом они испытывали дефицит Fe из-за Ni/Fe антагонизма [3].

Нарушение гомеостаза Fe в значительной степени зависело от содержания Ni и Fe в среде. При высоких концентрациях Ni его межорганый транспорт осуществляется при помощи так называемого масс-переноса [4], тогда как при низких концентрациях происходит его активный транспорт [5].

В отличие от Ni Fe поступает в клетки корня в окисленной форме, а его активный транспорт осуществляется лишь после восстановления в апопласте [6].

Ранее было показано [3], что Ni ингибировал в Fe-дефицитных корнях амаранта активность Fe³⁺-хелатредуктазы, катализирующей восстановление Fe³⁺ до Fe²⁺.

Это означает, что при накоплении Ni в клетках может нарушаться не только восстановление Fe³⁺, но и активный транспорт его восстановленной формы через плазмалемму с помощью различных хелаторов и специфичных белков-переносчиков NRAMP, YSL и ZIP [6].

Существует точка зрения, что процесс поглощения растениями Fe и других эссенциальных металлов (Cu²⁺ и Zn²⁺) конкурентно ингибируются никелем [4], поскольку Ni может использовать переносчики этих металлов.

Цель настоящей работы заключалась в том, чтобы исследовать:

- дозозависимую динамику поступления Ni в растения амаранта,
- диапазон его концентраций, вызывающих развитие дефицита Fe,
- предельное накопление Ni в надземной массе растений, что важно для оценки их фиторемедиационного потенциала.

Методика и условия проведения исследований. В качестве объекта исследования использовали гибридную форму растений рода *Amaranthus L.*: *A. paniculatus f. cruentus* (Вишневый джем).

Растения до 6-недельного возраста (5—6 настоящих листьев) выращивали в камере фитотрона в водной культуре на питательной среде Джонсона на фоне 2 мкМ Fe⁺³-ЭДТА, после чего в среду однократно вносили NiCl₂ до конечных концентраций: 0 (контроль), 50, 100 и 200 мкМ и оценивали содержание Ni и Fe в корнях, нижних (1—3-й ярус) и верхних (4—6 ярусов) листьях через 52, 56, 60 и 100 часов произрастания растений в присутствии NiCl₂. Для биохимических анализов пробы листьев и корней отбирали утром через 4 часа после включения света. Пробы фиксировали в жидком азоте и хранили при –70 °С.

Содержание МДА как индикатора развития окислительного стресса измеряли по методу Heath и Parker [14], основанному на образовании окрашенного комплекса МДА с тиобарбитуровой кислотой при нагревании.

Содержание пролина определяли по Bates et al. [16].

Экстракцию из растительного материала и определение активности общей СОД проводили согласно прописи [17].

Определение Ni и валового Fe в растительном материале проводили после мокрого озоления образцов тканей на атомно-абсорбционном спектрофотометре Лабист («Лабист», Россия), значения рассчитывали в мкг/г сухой массы листьев или корней.

Данные получены в 3 биологических повторностях, в каждой из которых было по 2 аналитических повторности. На рис. 1—5 представлены средние значения при 95%-м уровне вероятности.

Результаты и их обсуждение. Сравнительную динамику поступления Ni и Fe в корни растений амаранта и их транслокацию в листья изучали во временном интервале от 52 до 100 часов культивирования растений в присутствии в среде 50, 100 и 200 мкМ NiCl₂.

Интенсивность поступления Ni^{2+} в корни и листья. Как видно из рис. 1, уже через 52 часа после внесения в среду практически всех доз $NiCl_2$ содержание Ni^{2+} в корнях по сравнению с листьями было значительно выше (рис. 2, 3).

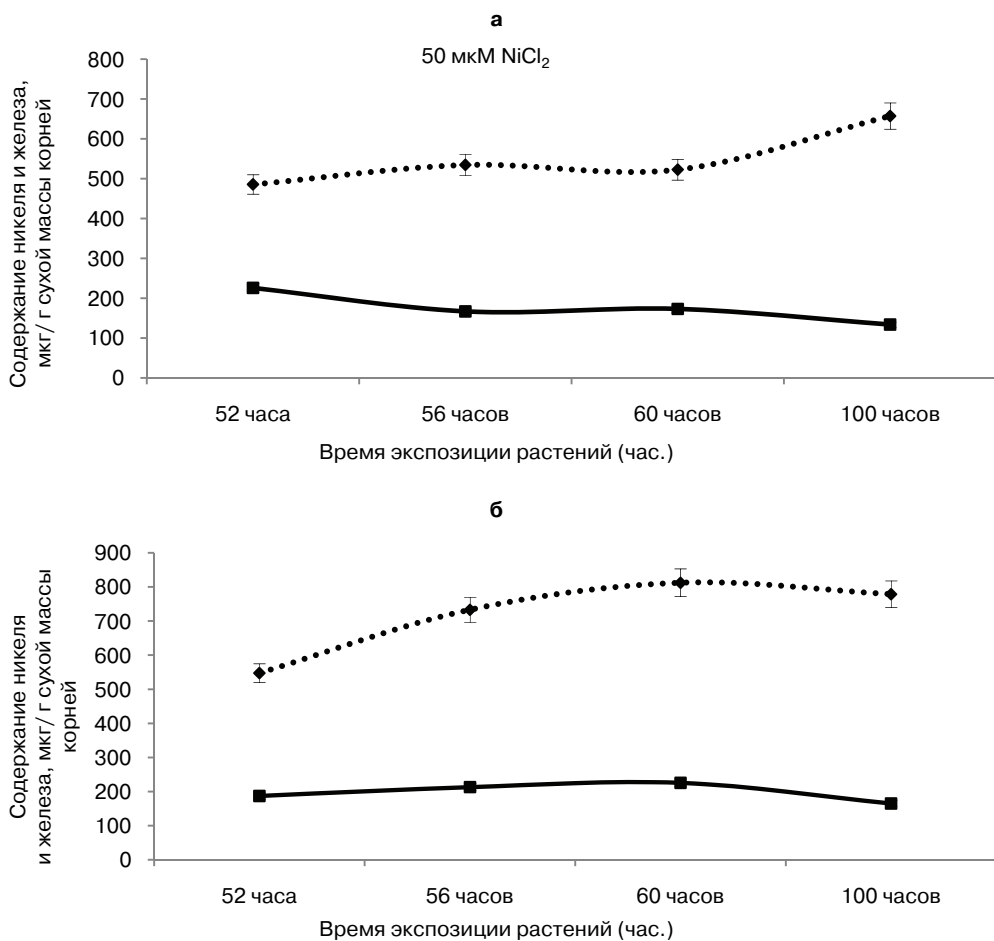


Рис. 1. Содержание Ni^{2+} (пунктирная линия) и валового Fe (сплошная линия) в корнях при 50 (а) и 100 (б) мкМ $NiCl_2$ в питательной среде

Так, при 50 мкМ $NiCl_2$ содержание этого металла в корнях через 52 часа экспозиции растений составляло 486 мкг/г сухой массы и поддерживалось на этом уровне в последующие 56 и 60 часов. Максимальный уровень накопления Ni^{2+} в корнях в этих условиях (657 мкг/г сухой массы) был отмечен в самом конце опыта. В присутствии в среде 100 мкМ $NiCl_2$ его содержание в корнях уже через 52 часа достигало 547, а через 100 ч — 779 мкг/г сухой массы. Подобная же временная зависимость накопления Ni^{2+} в корнях, но на более высоком уровне (883 и 1120 мкг/г сухой массы), наблюдалась в присутствии в среде 200 мкМ $NiCl_2$ (данные не приведены).

В отличие от корней накопления Ni^{2+} в листьях нижних ярусов (рис. 2) после 52 часов произрастания растений в присутствии всех использованных концентраций $NiCl_2$ было небольшим.

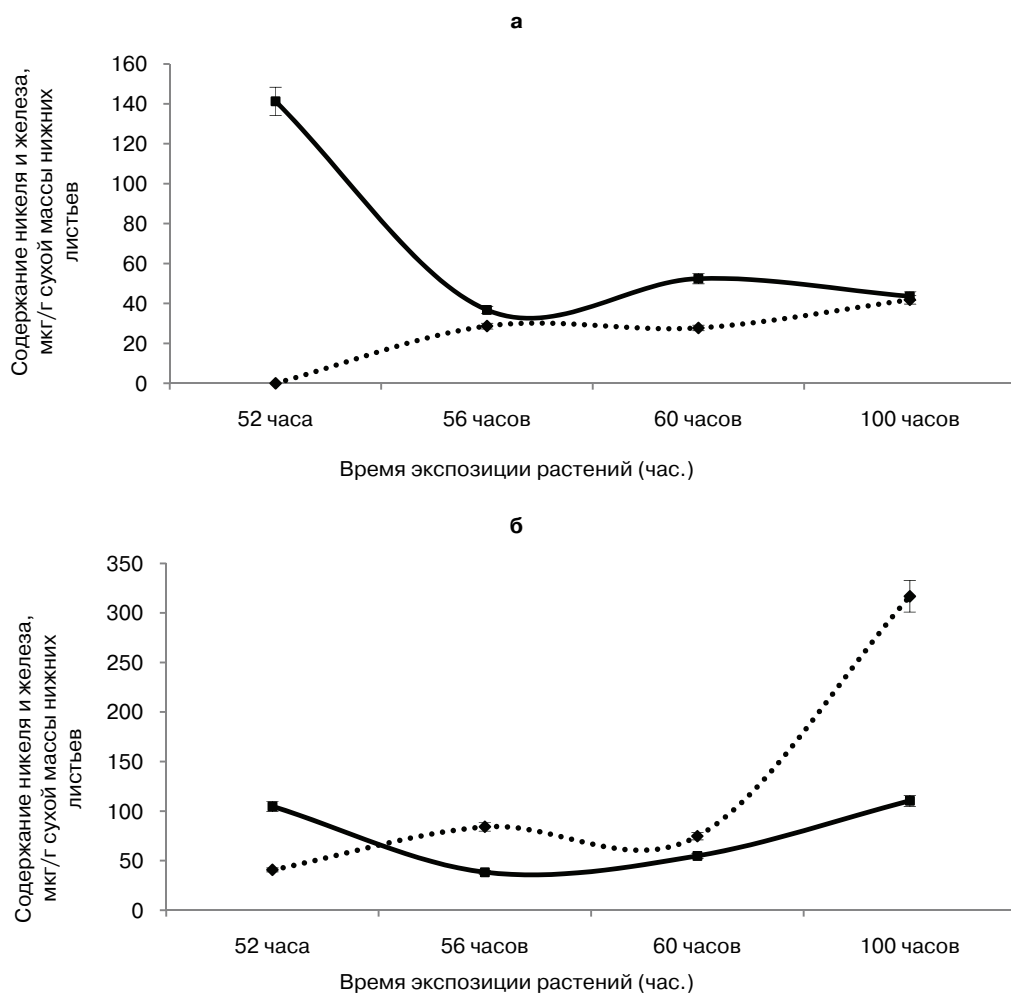


Рис. 2. Временная зависимость содержания Ni²⁺ (пунктирная линия) и валового Fe (сплошная линия) в листьях нижнего яруса при 50 (а) и 100 (б) мкМ NiCl₂ в питательной среде

Начиная с 56 часов экспозиции поступление Ni²⁺ возрастало в присутствии 50 и 100 мкМ NiCl₂ в среде, а на фоне 100 мкМ NiCl₂ к концу опыта резко увеличивалось, достигая 316 мг/кг сухой массы (рис. 2б). В присутствии 200 мкМ NiCl₂ в среде содержание Ni²⁺ в нижних листьях составляло 600 мг/кг сухой массы (данные не приведены).

Содержание Ni²⁺ в молодых листьях при всех использованных концентрациях NiCl₂ было значительно выше, чем в старых (рис. 3). Более того, при 50 мкМ NiCl₂ в среде динамика поступления Ni²⁺ имела два хорошо выраженных максимума (56 и 100 часов экспозиции, рис. 3а).

В присутствии 200 мкМ NiCl₂ в среде молодые листья аккумулировали в конце опыта максимальное содержание Ni²⁺ (970 мкг/г сухой массы), приближающееся к содержанию этого металла в корнях.

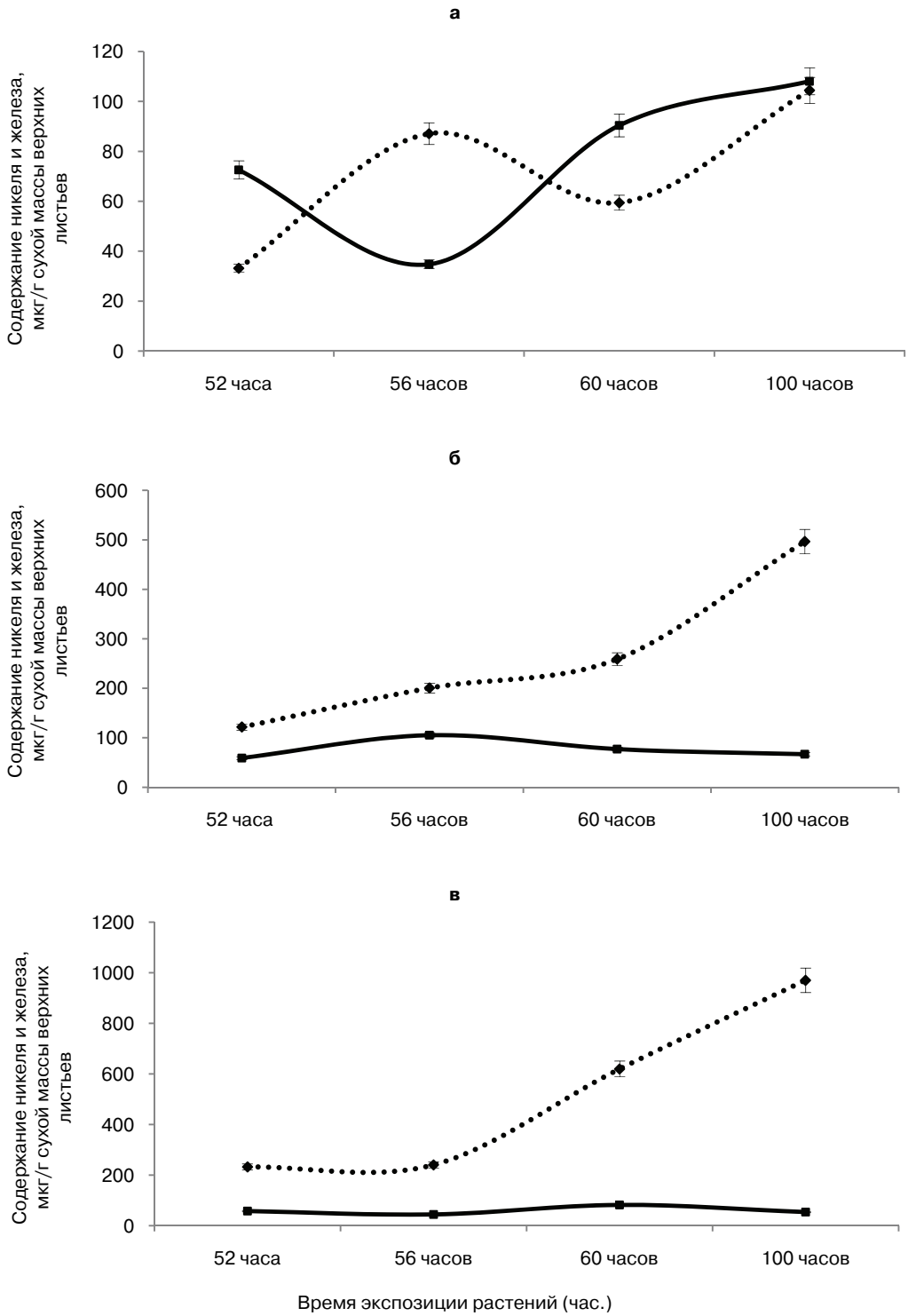


Рис. 3. Изменение содержания во времени Ni^{2+} (пунктирная линия) и валового Fe (сплошная линия) в молодых листьях при 50 (а), 100 (б) и 200 (в) мкМ NiCl_2 в питательной среде

Большее накопление Ni^{2+} в молодых листьях по сравнению со старыми могло быть связано с более высокой интенсивностью их транспирации.

Проведенный расчет показал, что общий вынос Ni^{2+} растениями амаранта (надземная часть и корень) составил 1592 и 2689 г Ni^{2+} /кг сухой биомассы, тогда как его вынос надземной биомассой был несколько ниже (813 и 1569 г Ni^{2+} /кг сухой биомассы при 100 и 200 мкМ $NiCl_2$ в питательной среде соответственно).

Интенсивность поступления Fe в корни и листья. Особый интерес представляют результаты о проявлении Ni/Fe антагонизма, прежде всего в молодых листьях.

Для того чтобы уловить появление признаков дефицита Fe в течение достаточно короткого времени экспозиции растений на растворе $NiCl_2$, содержание Fe в питательной среде поддерживали на низком уровне (2 мкМ).

В этих условиях содержание общего Fe в корнях через 52 часа после внесения в питательную среду $NiCl_2$ было весьма высоким (~200 мкг/г сухой массы), несмотря на то, что корни содержали много не только железа, но и Ni^{2+} (486—883 мкг/г сухой массы). Более того, с увеличением времени экспозиции растений и содержания никеля в среде изменения уровня содержания общего железа в корнях были минимальны, хотя имели слабую тенденцию к снижению в конце опыта.

Следует учитывать, что общее содержание Fe в корнях включает окисленную и восстановленную формы. При этом образующееся в апопласте Fe^{2+} является основной его транспортной формой. В области низких концентраций Ni^{2+} , как эссенциальный элемент, может поступать в растения активным путем, используя переносчики других металлов, в том числе и Fe^{2+} [6].

Как можно видеть из представленных на рис. 2 и 3 данных по содержанию общего Fe в нижних и верхних листьях, интенсивность поступления Fe явно превосходила интенсивность поступления в них Ni^{2+} .

Так, через 52 часа экспозиции растений при 50 мкМ $NiCl_2$ в среде содержание общего Fe в листьях нижних ярусов достигало 141 мкг/г сухой массы при практически полном отсутствии поступления в листья Ni^{2+} (рис. 2а).

Однако при повышении концентрации этого металла в листьях до 41 мкг/г сухой массы (100 мкМ $NiCl_2$ в среде) содержание Fe в старых листьях снижалось до 105 мкг/г сухой массы (рис. 2б). Подобное же соотношение между содержанием Ni^{2+} и Fe наблюдалось также и в молодых листьях (рис. 3а).

Расчет относительного коэффициента транслокации Ni и Fe в молодые листья, о котором судили по изменению отношения содержания каждого металла в листьях к его содержанию в корнях, показал явное проявление антагонизма при поступлении в надземную массу двух металлов преимущественно на фоне низких концентраций в среде $NiCl_2$ (рис. 4а).

Однако при 100 и 200 мкМ $NiCl_2$ в молодых листьях был отмечен дефицит Fe, который сопровождался развитием визуальных признаков хлороза.

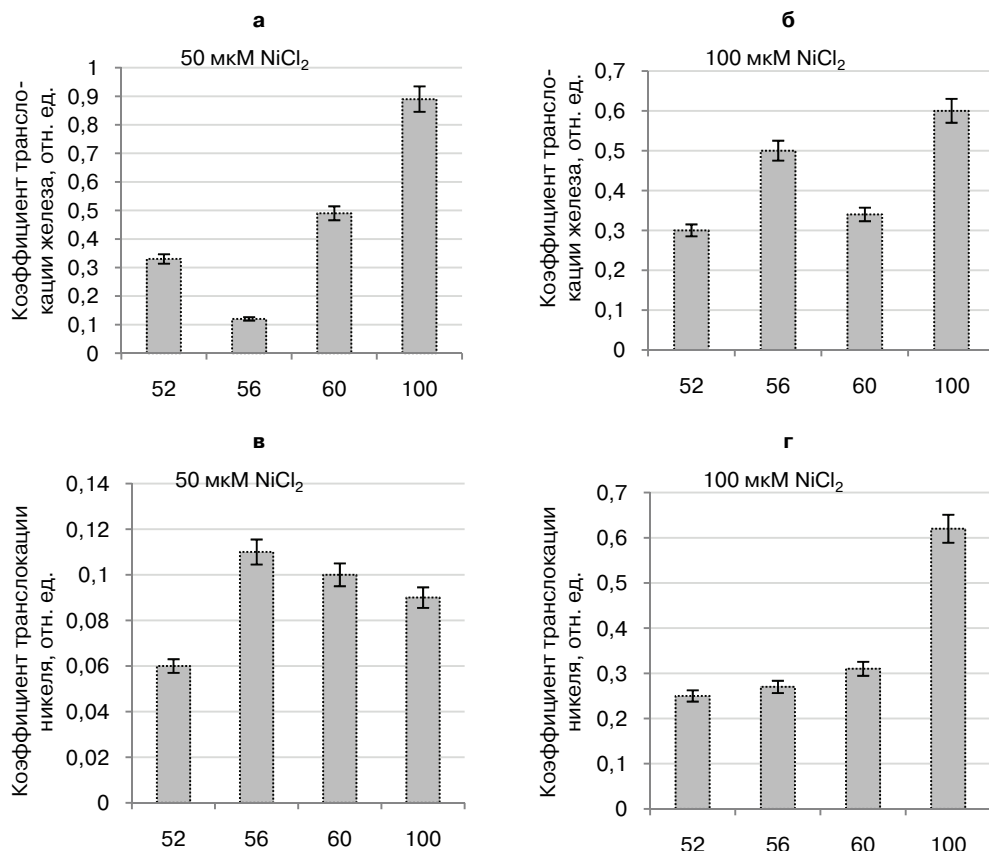


Рис. 4. Изменения коэффициентов транслокации Fe (а, б) и Ni²⁺ (в, г) (молодые листья/корни) при 50 и 100 мкМ NiCl₂ в питательной среде; по горизонтальной оси показано время экспозиции растений (час.)

Оценка состояния окислительного стресса в молодых листьях в период проявления антагонизма Ni²⁺ и Fe²⁺. Как следует из литературы [1; 4], индукция никелем окислительного стресса — одна из возможных причин проявления его токсического действия.

В условиях окислительного стресса, как было показано нами ранее [3], могло наблюдаться ингибирование Ni²⁺ восстановления Fe³⁺ в апопласте клеток корня, а также при поступлении восстановленной формы железа в надземные органы. В связи с этим представлялось важным выяснить состояние перекисного окисления липидов мембран (ПОЛ) как наиболее общего критерия интенсивности окислительного стресса на фоне избыточной концентрации Ni²⁺ в питательной среде.

Данные, представленные на рис. 5, свидетельствуют о том, что в молодых листьях, демонстрирующих реципрокную зависимость между содержанием в них Ni²⁺ и Fe²⁺ (в присутствии 50 мкМ NiCl₂ в среде), не обнаруживалось ни повышения содержания МДА — индикатора перекисного окисления мембран, ни накопления антиоксиданта пролина. Повышение содержания МДА и пролина наблюдалось лишь в самом конце опыта, хотя антагонизм Ni/Fe в данном случае не был выражен (рис. 3а, 4а, 4в).

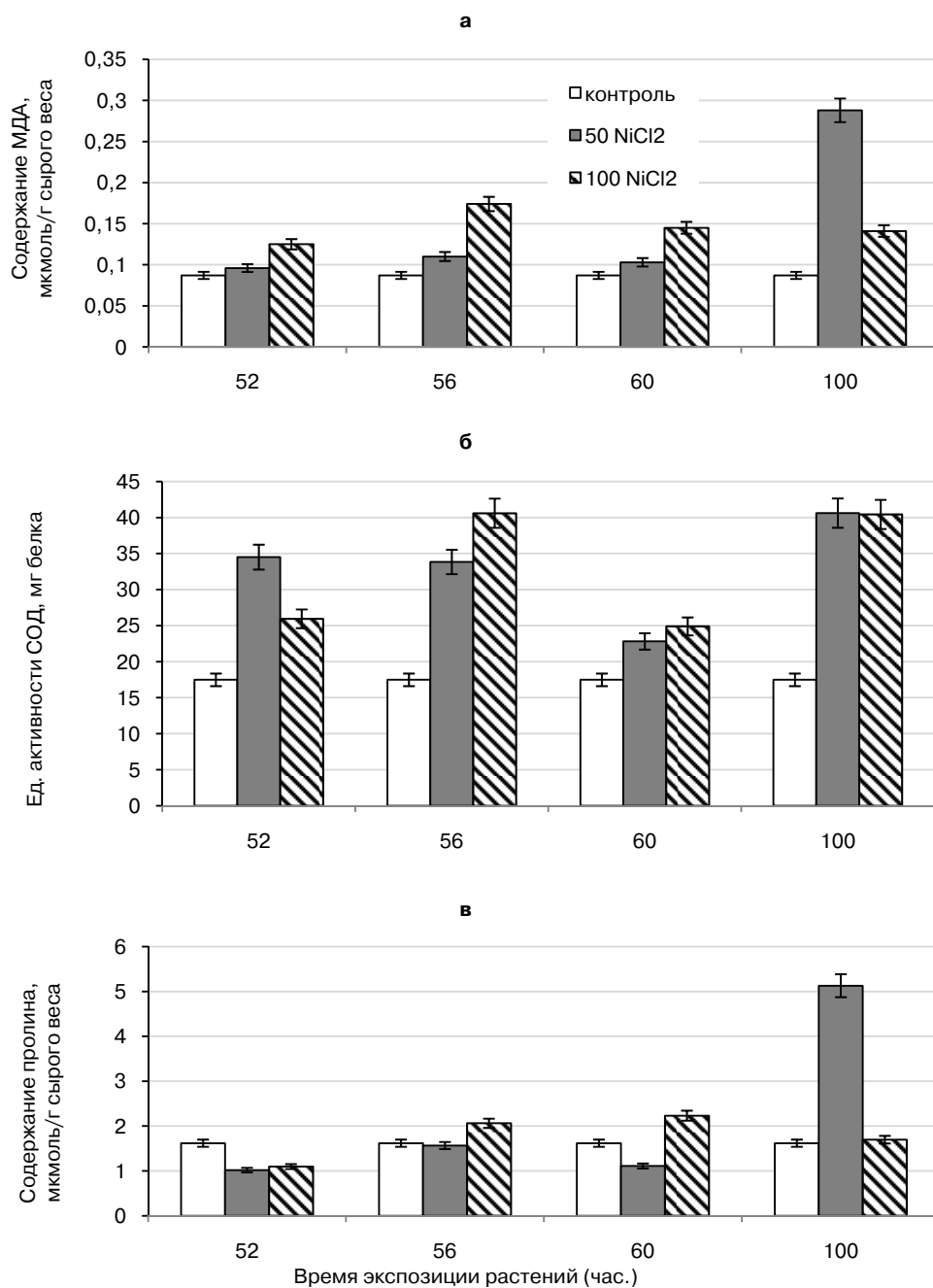


Рис. 5. Временные изменения содержания МДА (а), общей активности СОД (б) и пролина (в) в молодых листьях амаранта в присутствии 50 и 100 мкМ NiCl₂ в питательной среде

Возможной причиной поддержания нормального уровня ПОЛ могла быть активация супероксиддисмутазы (СОД) (рис. 5б).

Таким образом, проявление антагонизма Ni/Fe в молодых листьях при культивировании растений в присутствии 50 мкМ NiCl₂ в среде не могло быть обусловлено окислительным стрессом, вызываемым ТМ.

Не исключено, что подавление окислительным стрессом, индуцированным никелем, поступления Fe^{2+} как в молодые, так и в старые листья в полной мере проявлялось лишь при 100 и 200 мкМ NiCl_2 .

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в присутствии в среде 50 мкМ NiCl_2 процессы накопления Ni^{2+} и Fe в молодых листьях амаранта носили конкурентный характер. На фоне 100 и 200 мкМ NiCl_2 поступление Fe в старые и особенно молодые листья резко ингибировалось, что сопровождалось массивной аккумуляцией в них Ni^{2+} , содержание которого в молодых листьях было сопоставимо с его содержанием в корнях и составляло (при 200 мкМ NiCl_2 в среде в конце опыта) 970 мкг Ni^{2+} /г сухой массы).

Оценка состояния окислительного стресса (МДА, пролин, активность СОД) показала, что конкурентный характер поступления Ni^{2+} и Fe (50 мкМ NiCl_2 в среде) в молодые листья не был обусловлен Ni^{2+} -индуцированным окислительным стрессом, тогда как при 100 и 200 мкМ NiCl_2 массивное поступление Ni^{2+} в надземные органы амаранта и подавление дальнего транспорта Fe могло быть вызвано нарушением проницаемости мембран вследствие развития окислительного стресса.

Несмотря на проявление антагонизма между Ni^{2+} и Fe при поступлении их в листья и снижение биомассы надземных органов растения амаранта сохраняли жизнеспособность и достаточно высокий фиторемедиационный потенциал, что позволяет рекомендовать данный гибрид для очистки почв от загрязнения их никелем.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Yusuf M., Fariduddin Q., Hayat S., Ahmad A. Nickel: an overview of uptake, essentiality and toxicity in plants // Bull Environ Contam Toxicol. — 2011. — Vol. 86. — P. 1—17.
- [2] Прасад М.Н. Практическое использование растений для восстановления экосистем, загрязненных металлами // Физиология растений. — 2003. — Т. 50. — С. 764—780.
- [3] Шевякова Н.И., Черемисина А.И., Кузнецов Вл. В. Фиторемедиационный потенциал гибридов рода *Amaranthus*, антагонизм никеля и железа и хелатирующая роль полиаминов // Физиология растений. — 2011. — Т. 58. — С. 547—557.
- [4] Chen C., Huang D., Liu J. Functions and toxicity of nickel in plants // Clean. — 2009. — V. 37. — P. 304—313.
- [5] Серегин И.В., Кожевникова А.Д. Физиологическая роль никеля и его токсическое действие на высшие растения // Физиология растений. — 2006. — Т. 53. — С. 285—308.
- [6] Vert G., Grotz N., Dédaldéchamp F., Gaymard F., Guerinot M.L., Briat J.F., Curie C. IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth // The Plant Cell. — 2002. — Vol. 14. — P. 1223—1233.
- [7] Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // Arch. Biochem. Biophys. — 1968. — V. 55. — P. 355—361.
- [8] Bates L.S., Walgren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water — stress studies // Plant Soil. — 1973. — V. 39. — P. 205—207.
- [9] Beauchamp Ch., Fridovich I. Superoxide dismutase improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Analytical Biochemistry. — 1971. — V. 44. — P. 276—287.
- [10] Голубкина Н.А. Флуорометрический метод определения селена // Журн. аналит. химии. — 1995. — Т. 50. — С. 492—497.

DYNAMICS OF NI ACCUMULATION AND POSSIBLE CAUSES OF Fe DEFICIENCY IN AMARANTHUS HYBRIDS LEAVES

**A.I. Cheremisina¹, N.I. Shevyakova¹,
V.I.V. Kuznetsov^{1,2}**

¹Timirjazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Science
Botanicheskaya str., 35, Moscow, Russia, 127276

²Department of botany, plant physiology and agrobiotechnology
Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklay str., 8/2, Moscow, Russia, 117198

Amaranthus paniculatus f. cruentus (Cherry jam) were grown in the phytotron on Johnson nutrient solution with 2 mM Fe³⁺-EDTA. Six weeks plants were treated with NiCl₂. In the presence of 100 and 200 μM NiCl₂ uptake of Fe in mature and especially young leaves sharply inhibited. Possible mechanisms of Ni and Fe competition and the role of this phenomenon in determining the level of phytoremediation potential of amaranthus plants are discussed.

Key words: oxidative stress, Ni²⁺ accumulation, Fe deficiency, *Amaranthus L.*, phytoremediation.