

УДК 518.192: 518.143.6

Содержание эссенциальных элементов у теллунгиеллы (*Thellungiella salsa* (Pallas) O.E. Schltz) и арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. при моделировании условий засоления

Ю.М. Константинов, Г.А. Белоголова,

Г.В. Матяшенко, В.Н. Шмаков

Сибирский институт физиологии и биологии растений СО РАН, г. Иркутск

Институт геохимии им. А.П. Виноградова СО РАН, г. Иркутск

Во всем мире уделяется большое внимание работам по биологическим механизмам солеустойчивости у различных видов растений в связи со значительным распространением естественных засоленных почв и их засолением за счет мелиоративных мероприятий [2, 4, 6, 8, 9].

Основная задача исследования заключалась в выявлении закономерностей накопления химических элементов в клеточных культурах двух видов растений: теллунгиеллы и арабидопсиса. Теллунгиелла солонцовая (*Thellungiella salsa* (Pallas) O.E. Schltz), недавно объединенная с *Thellungiella halohpila* (C.A. Mey.) O.E. Schltz), является однолетним или двулетним растением 10-30 см высотой, произрастающим на солончаках, в солонцовых степях и солонцеватых лугах. Близкородственный ей вид арабидопсис или резушка Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) - однолетнее или двулетнее растение 10-40 см высотой. Произрастает в степях и степных лугах. Теллунгиелла из этих двух видов считается более устойчивым к различным видам абиотического стресса, в том числе к засолению [6, 9].

С использованием химического анализа исследованы закономерности изменений содержания K, Na, P, Si, Mn, Fe, Ca, Mg, Zn, Cu, Pb в каллусных и суспензионных культурах двух контрастных по солеустойчивости видов высших растений при действии различных концентраций хлорида натрия.

Материалы и методы исследований

В качестве растительного материала использовали каллусную и суспензионную культуры арабидопсиса и теллунгиеллы. Выращивание каллусных и суспензионных культур двух видов растений проводили на модифицированной среде Мурашиге и Скуга [7] с добавлением тиамин – 1,0 мг/л, пиридоксина – 0,5 мг/л, никотиновой кислоты – 0,5 мг/л, 2,4 дихлорфеноксиуксусной кислоты – 0,3 мг/л, сахарозы – 30 г/л, хлорида натрия – 0; 1,78 (30 mM) или 5,85 (100 mM) г/л. При выборе используемых в работе концентраций хлорида натрия основывались на литературных данных [4, 6, 8-10].

Измерения массовой доли Mn, Fe, Ca, Mg, Zn, Cu, Pb в пробах осуществляли атомно-абсорбционным методом, который основан на измерении резонансного поглощения света нейтральными атомами определяемого элемента при прохождении света через атомный пар исследуемой пробы. Все измерения проведены на атомно-абсорбционных спектрометрах модели 403 и 503 фирмы Perkin-Elmer (США). Для перевода пробы в атомный пар использован графитовый атомизатор HGA-72. 20-50 мкл. Ошибка определения не превышала 5-30 %. Основные метрологические характеристики атомно-абсорбционного анализа для указанной группы элементов приведены в табл. 1.

Таблица 1

Метрологические характеристики атомно-абсорбционного анализа химических элементов

Элемент	Предел обнаружения, мг/кг	Относительное стандартное отклонение, S_r , %
Ca	0,01	1,0-10,0
Mg	0,005	1,0-10,0
Zn	0,005	5,0-15,0
Fe	0,05	5,0-20,0
Mn	0,02	3,0-15,0
Cu	0,05	5,0-10,0
Pb	0,002	10,0-30,0

Определение щелочных элементов K, Na выполняли методом фотометрии на пламенном фотометре, собранном на основе спектрометра ДФС-12. Для проведения оперативного контроля в каждую партию проб включали стандартный образец ГСОПМ-27, который проходит все стадии анализа, как и анализируемые пробы. Предел обнаружения для K, Na - 0,01 мг/кг, $S_r=1-10\%$.

Определение фосфора и кремния. Методика основана на фотометрическом измерении концентрации фосфора в растворе в виде восстановленной молибденофосфорной гетерокислоты (для фосфора) и кремниймолибденовой гетерополиокислоты, окрашенной в желтый цвет, и дальнейшем восстановлении ее до молибденовой сини (для кремния). Измерения выполнены методом спектрофотометрии, основанным на способности окрашенных растворов поглощать излучение в видимой области электромагнитного спектра. В работе использовали спектрофотометр СФ-46. Предел обнаружения - 0,002 мг/кг, $S_r=1-10\%$ (для фосфора), 0,005 мг/кг, $S_r=5-20\%$ (для кремния).

Результаты исследований

Общие закономерности распределения изученных химических элементов приведены в табл. 2, в которой рассматривается содержание элементов в каллусных и суспензионных культурах *Theilungiella salsuginea* и *Arabidopsis thaliana*. Здесь же представлены результаты анализа для суспензионных культур двух видов растений, выращенных на основной среде культивирования (контроль) и в присутствии 30 mM NaCl и 100 mM NaCl.

Таблица 2

Распределение химических элементов в пробах каллусных и суспензионных культур

Пробы растений и растворов	Химические элементы										
	K	Na	P	Si	Mn	Zn	Cu	Pb	Fe	Ca	Mg
Каллусная культура, мг/л											
Арабидопсис 1	2303	112,4	385,5	8,7	10,7	4,3	0,76	0,053	11,9	284	85,9
Арабидопсис 2	1260	71,1	181,8	3,9	7,8	2,5	0,12	0,029	10,5	198	48,0
Теллунгиелла 1	1731	101,1	264,4	10,2	12,8	5,1	0,49	0,036	13,2	533	121,5
Теллунгиелла 2	498	61	83,5	не обн.	12,8	3,7	1,39	0,364	38,5	524,6	39,6
Арабидопсис, суспензионная культура, мг/л											
Контроль	1427	24,1	376,5	6,9	6,6	3,2	0,39	0,031	14,6	178,0	65,7
30 mM NaCl	898,2	213,4	220,6	3,1	6,5	2,7	0,19	0,018	12,5	182,2	47,0
100 mM NaCl	606,4	518,6	512,3	5,2	6,7	4,0	0,37	0,033	20,3	198,7	46,0
Теллунгиелла, суспензионная культура, мг/л											
Контроль	757,1	16,18	133,6	2,9	8,2	2,1	0,25	0,020	4,6	181,8	54,5
30 mM NaCl	1077,5	420	212,5	5,1	9,6	3,0	0,10	0,022	7,9	206,3	75,0
100 mM NaCl	639,7	438,5	290,2	4,8	5,5	2,8	0,18	0,028	7,6	133,2	58,0
Питательные среды для суспензионных культур, мг/л											
Основная среда	1128,9	17,1	60,7	1,6	6,3	2,5	0,15	0,043	8,1	153,8	36,9
Осн. среда + 30 mM NaCl	1115,1	396,2	61,2	1,1	5,4	2,0	0,15	0,048	7,4	304,5	35,4
Осн. среда + 100 mM NaCl	1089,7	1309,8	57,1	2,3	5,4	2,0	0,26	0,041	7,2	144,6	33,8

В табл. 3 и 4 показаны статистические параметры содержания химических элементов, рассчитанные отдельно для каллусных культур изучаемых растений и для суспензионных культур этих же растений, выращенных в среде культивирования с различной концентрацией NaCl.

Таблица 3

Статистические параметры распределения химических элементов в каллусных культурах теллунгиеллы и арабидопсиса (количество проб - 4)

Элемент, мг/кг	макс.	мин.	средн.	дисп.
K	2303	497,8	1257,5	1,4
Na	112,4	61,0	83,8	1,06
P	385,5	83,5	198,3	1,4

P	0,99	0,97	1								
Si	0,88	0,94	0,85	1							
Mn	-0,16	0,13	-0,1	0,18	1						
Zn	0,44	0,67	0,46	0,74	0,8	1					
Cu	-0,45	-0,26	-0,34	-0,4	0,72	0,27	1				
Pb	0,66	0,73	0,75	0,47	0,27	0,5	0,34	1			
Fe	-0,81	-0,65	-0,73	-0,7	0,57	-0,03	0,89	-0,11	1		
Ca	-0,37	-0,09	-0,34	0,06	0,95	0,68	0,61	-0,05	0,61	1	
Mg	0,71	0,83	0,68	0,96	0,38	0,84	-0,3	0,34	-0,54	0,31	1

Примечание: Значимые величины **r** выделены с вероятностью $P > 0,05$.

Характерной особенностью корреляционного анализа химических элементов в каллусных культурах (табл. 5) является то, что К и Na имеют прямую корреляционную зависимость, а также они образуют связи с основными биофильными химическими элементами с P, Mg, Si, что обычно характерно для растений в целом.

В другой же выборке, для суспензионных культур, (табл. 6) эта закономерность не прослеживается, а между К и Na появляется отрицательная зависимость. Характерной особенностью этой выборки является наличие тесных связей между фосфором и тяжелыми металлами Fe, Pb, Cu, Zn, которые также имеют между собой прямые корреляционные связи.

Таблица 6

Корреляционная зависимость между химическими элементами в суспензионных культурах теллунгиеллы и арабидопсиса, выращенных в питательных средах с добавлением различных концентраций NaCl

	K	Na	P	Si	Mn	Zn	Cu	Pb	Fe	Ca	Mg
K	1										
Na	-0,54	1									
P	-0,05	0,44	1								
Si	0,57	0,12	0,66	1							
Mn	0,24	-0,06	-0,46	-0,15	1						
Zn	0,02	0,58	0,94	0,66	-0,2	1					
Cu	0,16	-0,28	0,71	0,48	-0,43	0,5	1				
Pb	0,01	0,36	0,92	0,8	-0,42	0,81	0,69	1			
Fe	0,04	0,31	0,91	0,48	-0,39	0,89	0,69	0,68	1		
Ca	0,25	0,02	0,09	0,02	0,72	0,33	0,07	-0,09	0,32	1	
Mg	0,64	-0,07	-0,27	0,49	0,57	-0,1	-0,36	-0,02	-0,41	0,12	1

Примечание: Значимые величины **r** выделены с вероятностью $P > 0,05$.

Более детально рассмотрены закономерности распределения химических элементов в суспензионных культурах теллунгиеллы и арабидопсиса, выращенных в питательных средах с добавлением различных концентраций NaCl. На рис. 1, 2 показана зависимость содержания химических элементов в суспензионных культурах от состава питательной среды (содержания хлорида натрия).

Натрий. На графике четко прослеживается тенденция накопления содержания Na в арабидопсисе с увеличением в растворах NaCl (рис. 1, табл. 2). В теллунгиелле эта закономерность отсутствует. График распределения Na в этом случае имеет вид параболы, что указывает на интенсивное накопление Na при низких концентрациях NaCl (30 mM) и резкое снижение интенсивности поступления Na при внесении в среду больших концентраций NaCl (100 mM). Такое распределение Na в теллунгиелле указывает на барьерный тип его распределения, что характерно для растений, устойчивых к соленакоплению.

Калий. Содержание этого элемента в клетках суспензионных культур, выращенных в различных средах, мало отличается между собой (табл. 2). Тем не менее распределение калия в теллунгиелле подобно Na, оно представляет собой параболическое распределение.

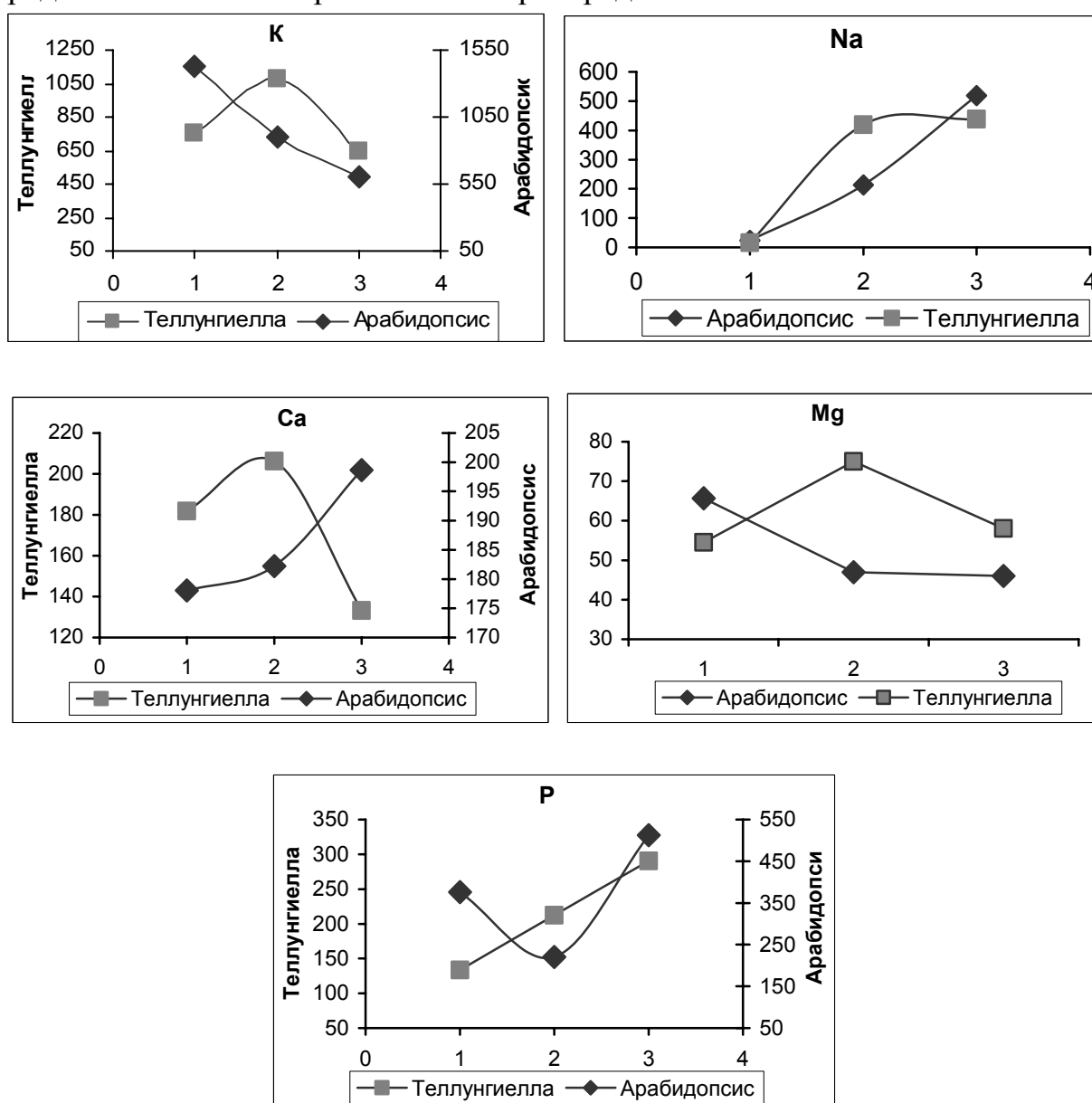


Рис. 1. Зависимость концентрации K, Na, Ca, Mg, P (мг/кг) от питательной среды в клетках изученных растений: 1- суспензионные культуры, растущие на основной питательной

среде; 2 – суспензионные культуры, растущие на среде с добавлением 30 mM NaCl; 3 – суспензионные культуры, растущие на среде с добавлением 100 mM NaCl

В арабидопсисе содержания К имеют обратную зависимость относительно Na. По-видимому, это связано с осмотическими процессами в растительной клетке, которые способны за счет увеличения Na и, возможно, других микроэлементов приводить к уменьшению концентраций К. Подобная закономерность наблюдается для многих растений, произрастающих в техногенных условиях, где происходит интенсивное накопление ксенобиотиков, представленных главным образом тяжелыми металлами [1]. Для теллунгиеллы данная тенденция проявлена в меньшей степени и прослеживается лишь в случае выращивания клеток в питательной среде с максимальным добавлением NaCl. Таким образом, видно, что К и Na являются антагонистами при максимальном соленакоплении в клетках растений.

Кальций, магний. Кальций распределяется подобно Na, но содержания Са в теллунгиелле имеют прямую зависимость от его содержания в питательной среде (табл. 2, рис. 1). В арабидопсисе такая зависимость отсутствует. Максимальное накопление Са в клетках этого растения установлено в случае выращивания культуры в среде с максимальной концентрацией хлорида натрия. График имеет такую же тенденцию, что и у Na. Магний может являться антагонистом кальция. Так же, как и в случае с калием, график по Mg в арабидопсисе имеет обратную зависимость относительно Са, что указывает на антагонистическое поведение этих двух элементов.

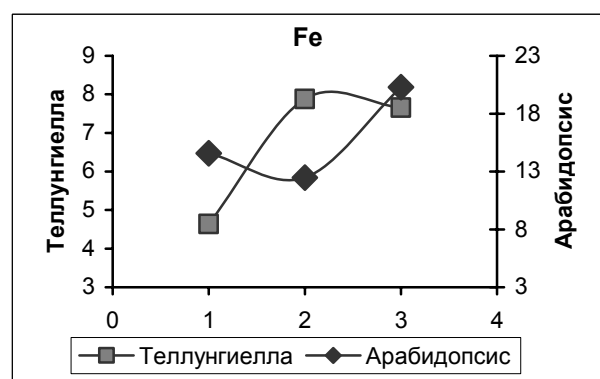
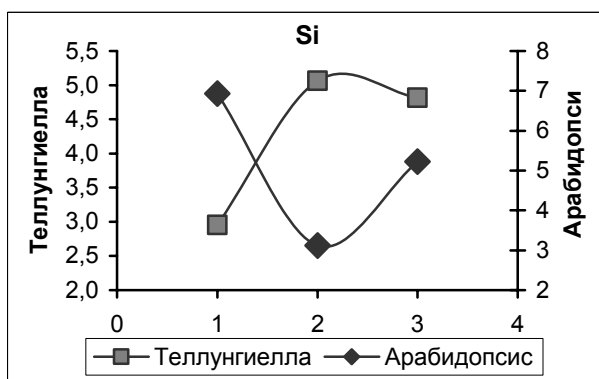
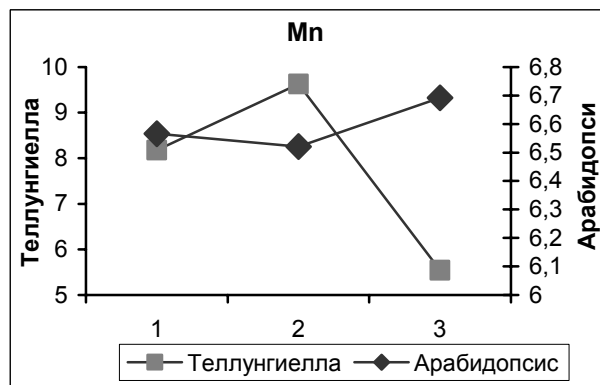
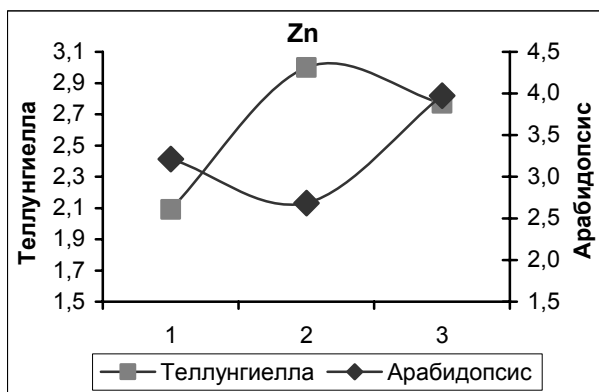
Фосфор. Содержание этого элемента в питательных средах имеет очень низкие значения и незначительные вариации (табл. 2). Таким образом, состав сред не мог особо влиять на накопление этого элемента в растениях. Фосфор единственный среди биофильных элементов, который распределяется по безбарьерному типу и имеет тенденцию плавно накапливаться в теллунгиелле в зависимости от среды культивирования. Распределение этого элемента в большей мере, по-видимому, регулируется самим растением и мало зависит от питательной среды. Известны факты усиления поглощения фосфора под влиянием некоторых тяжелых металлов и микроэлементов [3]. И, по-видимому, не случайно, что лишь только этот один биофильный элемент имеет положительные корреляционные связи с Fe (0,91), Pb (0,92), Cu (0,71), Zn (0,94) в суспензионных культурах (табл. 5). Для этой группы элементов, включая P, характерны одинаковые виды графиков по арабидопсису (рис. 1, 2).

Марганец. По своим содержаниям Mn в арабидопсисе изменяется мало, так же, как и в питательных средах. Концентрация его в арабидопсисе, выращенном в присутствии 100 mM NaCl значительно выше, чем в теллунгиелле, это косвенным образом может указывать на антагонистическое его поведение относительно накопления Na в клетках этого растения. Марганец играет большую роль в физиологических процессах растений. В

данном случае поведение его подобно Ca (рис.1, 2). При марганцевой недостаточности может снижаться и содержание Ca в растительной клетке [3].

Цинк. Это один из тяжелых металлов, который относится к жизненно необходимым (эссенциальным) элементам. Разные виды растений сильно отличаются по своей способности поглощать Zn из питательной среды (почвы). Больше всего его находится в клеточном соке. На графике видно, что Zn имеет относительно низкие содержания в теллунгиелле и распределяется в этом растении по барьерному типу. Арабидопсис способен больше накапливать этот элемент (рис. 2).

Кремний является важным структурным биофильным элементом, который обычно в больших количествах содержится в клеточных стенках многих растений. Кремний в растениях может увеличивать содержание органических соединений фосфора. В нашем случае P и Si имеют положительную корреляцию (табл. 5, 6). Однако пути метаболизма P и Si часто бывают различны. По графикам Si наблюдается распределение, подобное цинку. Кремний также в больших количествах накапливается в арабидопсисе.



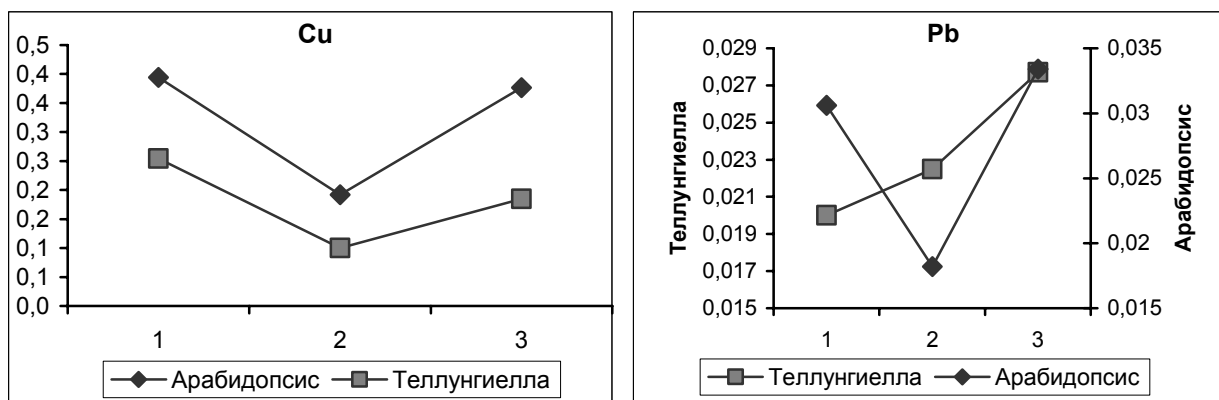


Рис. 2. Зависимость концентрации Zn, Mn, Si, Fe, Cu, Pb (мг/кг) от питательной среды в клетках изученных растений: 1- суспензионные культуры, растущие на основной питательной среде; 2 – суспензионные культуры, растущие на среде с добавлением 30 mM NaCl; 3 – суспензионные культуры, растущие на среде с добавлением 100 mM NaCl

Железо. Вид графиков, построенных для Fe, подобен Si, Zn. Содержание железа в арабидопсисе значительно выше, чем в теллунгиелле, что указывает на способность арабидопсиса накапливать этот элемент. Основные биофильные элементы K и P имеют отрицательные корреляционные связи с Fe в арабидопсисе. В то же время в теллунгиелле железо имеет положительную корреляцию с фосфором.

Медь относится к разряду тяжелых металлов, но так же, как и Zn, играет большую роль в физиологии растений. Медь подобно Mn, Fe принимает участие в процессах фотосинтеза у растений. Содержание этого элемента в арабидопсисе выше, чем в теллунгиелле. Графики содержания меди в изученных растениях хорошо согласуются с концентрациями этого элемента в питательном растворе (рис. 2, табл.2).

Свинец является элементом - токсикантом. Содержание свинца в изученных растительных клетках очень низкое, так же, как и в питательных средах. Арабидопсис накапливает свинец в бóльших количествах, чем теллунгиелла, что указывает на барьерный тип его распределения в этом растении (рис.2, табл. 2).

Заключение

Для клеток теллунгиеллы характерен барьерный тип накопления не только для Na, но и для большинства изученных химических элементов. Клеточная культура теллунгиеллы в целом обладает меньшей способностью накапливать химические элементы, особенно тяжелые металлы. Содержание натрия резко повышается при концентрации 30 mM NaCl и снижается в присутствии 100 mM NaCl.

В клетки арабидопсиса в отличие от теллунгиеллы многие химические элементы поступают по безбарьерному типу, что особенно характерно для Na, Ca, Fe, Pb, Zn.

Некоторые биофильные элементы имеют антагонистическое распределение, что характерно главным образом для арабидопсиса. Основными антагонистами в нем являются K-Na, Ca-Mg.

Среди основных структурных элементов для исследованных растительных видов фосфор имеет тенденцию распределяться практически всегда по безбарьерному типу.

Накопление химических элементов в суспензионных клеточных культурах изученных видов растений обусловлено не только составом питательной среды, но и их видоспецифическими особенностями. При этом интенсивное соленакопление в растительных клетках сопровождается нарушением баланса эссенциальных элементов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Интеграционного междисциплинарного проекта СО РАН № 47 и Президентского гранта поддержки научных школ № 4812.2006.4.

Библиографический список

1. Белоголова Г.А. Биогеохимическая характеристика природных и техногенных экосистем Южного Прибайкалья / Г.А. Белоголова, Г.В. Матяшенко, Р.Х. Зарипов. // Экология. 2000. № 4. С. 263-269.
2. Шахов А.А. Солеустойчивость растений / А.А. Шахов. М.: Изд-во АН СССР, 1956. 552 с.
3. Школьник М. Я. Микроэлементы в жизни растений / М.Я. Школьник. Л.: Наука, 1974. 324 с.
4. Gong Q. Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana* / Q. Gong, P. Li, Sh. Ma, S. I. Rupassara, H. J. Bohnert // The Plant J. 2005. Vol. 44. P. 826–839.
5. Li H.-Q. Establishment of an efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated leaf disc transformation of *Thellungiella halophila* / H.-Q. Li, J. Xu, L. Chen, M.-R. Li // Plant Cell Rep. 2007. Vol. 26. P. 1785–1789.
6. Liu A.R. Osmotica accumulation and its role in osmotic adjustment in *Thellungiella halophila* under salt stress / A.R. Liu, K.F. Zhao // Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao. 2005. Vol.31. P. 389-395.
7. Murashige T. A Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Scoog // Plant Physiol. 1962. Vol. 15. P. 473-497.
8. Saleki R. Mutants of *Arabidopsis thaliana* capable of germination under saline conditions / R. Saleki, P.G. Young, D.D. Lefebvre // Plant Physiology. 1993. Vol. 101. P. 839–845.
9. Taji T. Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-related halophyte Salt Cress using *Arabidopsis* microarray / T. Taji, M. Seki, M. Satou, T. Sakurai, M. Kobayashi, K. Ishiyama, Y. Narusaka, M. Narusaka, J.-K. Zhu, K. Shinozaki // Plant Physiology. 2004. Vol. 135. P. 1697–1709.
10. Tyagi A.K. Sodium chloride resistant cell line from haploid *Datura innoxia* Mill. A resistance trait carried from cell to plantlet and vice versa *in vitro* / A.K. Tyagi, A. Rashid, S.C. Maheshwari // Protoplasma. 1981. Vol. 105. P. 327-332.

