



УДК 581.11.2:581.573.4

Влияние повышенных доз фторидов в почве на активность аденилатциклазной сигнальной системы растений

Л. А. Ломоватская, О. В. Рыкун, А. А. Симакова, Л. Г. Соколова,
А. С. Романенко, Л. В. Помазкина

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
E-mail: LidaL@sifibr.irk.ru

Аннотация. Приводятся первые результаты по исследованию реакции аденилатциклазной сигнальной системы различных сельскохозяйственных культур на фторидные загрязнения почвы. Предполагается, что изменение активности аденилатциклазной сигнальной системы растений в этих условиях можно в дальнейшем использовать как объективный диагностический показатель устойчивости.

Ключевые слова: фторидное загрязнение почв, пшеница, люцерна, кукуруза, редька масличная, цАМФ, диагностика устойчивости.

Введение

Известно, что повышенное содержание легкорастворимых фторсодержащих соединений в почве может способствовать их интенсивной транслокации в системе «почва – растение» [17]. Несомненно, степень токсичного влияния фтора на растения (1-й класс опасности) зависит от его концентрации в почве и эффективности функционирования физиологических барьеров самих растений [13]. Поэтому отбор сельскохозяйственных культур, отличающихся повышенной устойчивостью к фторидам алюминиевого производства, весьма важен. В связи с этим возникает вопрос о критериях, по которым можно оценивать устойчивость той или иной культуры. Как правило, для оценки устойчивости к различным абиотическим стрессам в настоящее время используется единственный параметр: например, скорость роста или содержание эндогенных сахаров [7; 11]. Такой подход не даёт объективной оценки устойчивости растений к неблагоприятному фактору среды, поскольку отслеживает частные проявления защитных реакций растений. Для того чтобы полученные результаты более объективно отражали физиологическое состояние взрослого растения, требуется выбор параметров, в полной мере отражающих особенности метаболизма в предлагаемых условиях. Весьма подходящим объектом для исследования стрессовой реакции растений являются их сигнальные системы, изменение активности которых связано с изменением экспрессии генома, и, в конеч-

ном счёте, ведёт к модуляции других физиологических параметров растений [4; 9; 12].

Известно, что в передаче сигнала от стрессоров различной природы, будь то осмотический стресс, засоление, низкая температура или экзотоксины фитопатогена, принимают участие активные формы кислорода, ионы кальция, оксид азота, цАМФ, а также другие вторичные мессенджеры [3; 6]. Так, возрастание концентрации внутриклеточного кальция в клетках пшеницы наблюдается уже через 0,3 с. после воздействия теплового стресса, что показано с помощью флюоресцентных зондов [3; 9]. Кроме того, существует ряд доказательств того, что циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), как вторичный мессенджер аденилатциклазной сигнальной системы (АСС), участвует в ответной реакции растений на различные виды стрессов [2; 15–17]. На примере воздействия экзополисахаридов бактериального возбудителя кольцевой гнили было показано, что одним из факторов реализации защитного ответа клеток растений картофеля служит концентрационная динамика цАМФ. Его уровень резко меняется в различных органах растений уже после 1 мин воздействия и имеет ярко выраженные сортовые отличия: в растениях устойчивого сорта его концентрация резко возрастает (сотни процентов), а в растениях восприимчивого к патогену сорта снижается, не достигая контрольного уровня [5]. Таким образом, показано, что степень активации или ингибирования аденилатциклазной сигнальной системы растений отражает степень их устойчивости к биотическому стрессору. Исходя из этого, представляет интерес исследование изменения активности АСС некоторых сельскохозяйственных культур к абиотическому стрессовому фактору, а именно, к загрязнению почв фторидами.

Для проверки этого предположения были проведены полевые эксперименты, в которых использовали несколько сельскохозяйственных культур.

Материалы и методы

Объектом исследований служили районированные сорта яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. (Тулунская-12), люцерны посевной *Medicago sativa* (Таёжная), кукурузы *Zea mays* L. (Обский 140 СВ), редьки масличной *Raphanus sativus* (линия ИрГСХА). Все растения возделывались в полевых мелкоделяночных ($S = 0,25 \text{ м}^2$) опытах одновременно на незагрязнённой и загрязнённой фторидами алюминиевого производства агросерых почвах. Опыты проводили по разработанной ранее методике [8]. С целью предотвращения воздействия на растения воздушной составляющей аэропромывбросов алюминиевого производства ИркаЗ-РУСАЛ, загрязнённая почва (пахотный слой) была вывезена из импактной зоны. На экспериментальном участке СИФИБР СО РАН, где, по данным снегосъёмки, загрязнение фторидами отсутствовало, осенью предшествующего началу экспериментов года удаляли гумусовый горизонт почвы до глины. На выровненную поверхность устанавливали каркасы высотой 0–30 см, в которых формировали пахотный горизонт загрязнённой почвы (вариант опыта «промышленное загрязнение»). Близкая по основным свойствам незагрязнённая агросе-

рая почва участка, который также ограничивали каркасами, служила условным контролем (вариант опыта «контроль»). Для того чтобы вычленить отклик растений на действие фторидов, на незагрязненной почве одновременно моделировали близкий уровень загрязнения путём внесения фторида натрия NaF, который преобладает в составе твёрдых выбросов ИРКАЗ (вариант опыта «модельное загрязнение»). Дозу (NaF), соответствующую 500 мг F на кг почвы, тщательно перемешивали в пахотном слое.

Содержание фторидов в почве и растениях определяли спектрофотометрическим методом [1]. Все полевые культуры возделывались на фоне внесения комплекса минеральных удобрений с учётом требований их агротехники. Растительные пробы (по 2 растения) отбирали в конце августа. Далее растения фиксировали жидким азотом, после чего корни, стебель и листья отдельно растирали в ступке с буфером следующего состава: 50 мМ трис-HCl, pH 7,4, 0,1 мМ теофиллин, 1мМ дитиотриэтол, 0,5 мг/мл поливинилпирролидон. Для дополнительного связывания фенолов при гомогенизации использовали ионообменную смолу Дауэкс-50 в весовом соотношении 1:5 (смола:растительный материал). Полученный гомогенат фильтровали через мелкоячеистый капрон для удаления крупных фрагментов растительного материала, полученный растительный экстракт центрифугировали 20 мин при 16 тыс. г. После этого супернатант кипятили для инактивации аденилатциклазы и фосфодиэстеразы – ферментов, синтезирующих и разрушающих цАМФ. Образцы очищали от присутствия других циклических нуклеотидов на колонках с нейтральной окисью алюминия. Уровень цАМФ в образцах определяли модифицированным методом ИФА с применением первичных к цАМФ антител и вторичных антител, меченых пероксидазой [17].

Результаты и обсуждение

В различных вариантах опыта установлена следующая концентрация наиболее доступных для растений водорастворимых фторидов: на незагрязнённой почве содержание $F_{\text{вод}}$ (контроль) составляло 4 мг/кг или < ПДК (уровень ПДК равен 10 мг/кг почвы), на загрязнённой NaF (модельное загрязнение) – 87 мг/кг или 9 ПДК, тогда как на загрязнённой выбросами ИРКАЗ (промышленное загрязнение) – 103 мг F/кг или 10 ПДК. В последних двух вариантах уровни загрязнения фторидами были вполне сопоставимы между собой.

Анализ активности аденилатциклазной сигнальной системы растений, оцениваемый по уровню цАМФ в различных органах, показал, что её уровень весьма индивидуален для каждого вида растений. Кроме того, результаты показали, что все растения активно реагируют на повышенное содержание фторидов в почве (табл. 1). Обращает на себя внимание тот факт, что у пшеницы уровень цАМФ во всех вариантах опыта был значительно выше, чем в органах других видов растений. Все остальные культуры не столь сильно отличались между собой по его содержанию. Распределение этого вторичного мессенджера между органами растений также было не-

одинаковым: прослеживалась тенденция максимального содержания в листьях (см. табл. 1).

Таблица 1

Концентрация цАМФ (нМ/ г массы сырого вещества)
в органах растений различных сельскохозяйственных культур

Орган растения	Контроль	Модельное загрязнение	Промышленное загрязнение
Пшеница			
Корень	20±3	64±5	720±45
Стебель	0,68±0,09	1,5±0,08	200±12
Лист	198±15	256±18	370±22
Кукуруза			
Корень	0,2±0,01	0,2±0,01	0,1±0,006
Стебель	0,2±0,01	20±1	0,1±0,005
Лист	0,3±0,01	30±2,5	0,7±0,05
Люцерна			
Корень	0,04±0,002	0,03±0,001	0
Стебель	0,08±0,006	1600±98	0,02±0,001
Лист	0,2±0,01	1000±79	0,6±0,005
Редька масличная			
Корень	0,03±0,001	0,001±0,0003	0,1±0,001
Стебель	0,06±0,003	0,01±0,001	0
Лист	0,2±0,01	0,01±0,001	0

Вызывают интерес результаты влияния фторида натрия (вариант «модельное загрязнение») на активность аденилатциклазной сигнальной системы растений. У всех видов, кроме редьки масличной, уровень цАМФ возрастал очень существенно, в большей степени в листьях. При этом у пшеницы этот феномен был выражен в меньшей степени, чем у растений люцерны и кукурузы. Наиболее сильная активация АСС наблюдалась в корнях первой. Это, скорее всего, свидетельствует об индивидуальных видовых особенностях растений и связано со специфичностью реализуемых механизмов устойчивости. О наличии предполагаемых особенностей говорит и тот факт, что максимальный активирующий эффект в корнях наблюдался только у пшеницы. У остальных растений, за исключением редьки масличной, уровень цАМФ преобладал в стебле и листьях. Это, в свою очередь, свидетельствует о развитии системной модуляции активности АСС, поскольку непосредственное воздействие NaF испытывали только корни, но уровень цАМФ повышался в листьях и стебле.

Несомненно, фторид, являясь легко растворимым и подвижным соединением, способен проникать в корень. Таким образом, возникает возможность активации мембранной аденилатциклазы (мАЦ), которая синтезирует цАМФ. Известно, что фторид является активатором G-белка, через который и происходит передача сигнала к мАЦ [14; 17].

В настоящее время проблема оценки токсичности смесей загрязнителей и устойчивости к ним растений связана со слабой изученностью адди-

тивного, синергического и конкурентного взаимодействия составляющих поллютантов [6]. Поэтому результаты, полученные в варианте эксперимента «промышленное загрязнение», указывают на более сложный характер влияния загрязнителей.

Анализ почвы в варианте «промышленное загрязнение» показал присутствие в ней, помимо фторидов, тяжёлых металлов. Как известно, тяжёлые металлы являются распространёнными поллютантами и весьма токсичны для большинства видов растений. При этом они способны существенно модулировать активность растительных сигнальных систем. Так, имеются данные, что тяжёлые металлы связываются с рецепторами плазмалеммы клеток растений, тем самым модулируя активность различных сигнальных систем [9]. Возможно, это объясняет результаты, полученные по исследованию активности АСС в варианте «промышленное загрязнение», которые существенно отличались от варианта «модельное загрязнение». Как следует из данных табл. 2, в которой представлена сравнительная оценка модуляции активности АСС растений различных видов в процентах к контролю, в растениях пшеницы активация АСС была выражена в наибольшей степени. В люцерне и, особенно, в редьке масличной активность АСС была ингибирована в различной степени, что сопровождалось снижением массы растений.

Таблица 2

Влияние фторидных загрязнений почвы на активность аденилатциклазной сигнальной системы различных видов сельскохозяйственных растений, цАМФ, % загрязнение/контроль

Орган растения	Контроль	Модельное загрязнение	Промышленное загрязнение
Пшеница			
Корень	100	320	3600
Стебель	100	220	2940
Лист	100	129	186
Кукуруза			
Корень	100	100	50
Стебель	100	>5000	50
Лист	100	>5000	233
Люцерна			
Корень	100	7	0
Стебель	100	2000	25
Лист	100	>5000	300
Редька масличная			
Корень	100	3,3	33
Стебель	100	17	0
Лист	100	0,5	0

В литературе имеются сведения о том, что пшеница весьма толерантна к различным загрязнениям, в том числе фторидами и тяжёлыми металлами [10]. Наименее устойчивыми к таким видам загрязнений считаются кукуруза и люцерна. Таким образом, первые результаты, изложенные в настоящей статье, свидетельствуют о наличии связи между степенью модуляции активности АСС растений и устойчивостью к поллютантам различной природы: чем выше степень устойчивости растений, тем выше активность АСС. Наоборот, более низкая активность или даже ингибирование АСС проявляется у видов растений, менее устойчивых к загрязнениям почвы фторидами и, особенно, тяжёлыми металлами. Дальнейшие эксперименты должны дать более полную информацию о том, имеют ли диагностическое значение особенности распределения концентраций цАМФ по органам растений, а также о вкладе активности цАМФ-производящего фермента – мембранной аденилатциклазы в модуляции активности АСС.

Выводы

Изложенные результаты позволяют сделать ряд выводов:

– Несмотря на то что непосредственный контакт с поллютантом испытывают только корни растений, эффект от их воздействия на АСС растений наблюдается во всех органах, а степень воздействия весьма различна в корнях, стеблях и листьях.

– Загрязнение почв фторидами в модельном эксперименте модулирует активность АСС растений различных видов: стимулирует в клетках пшеницы, люцерны и ингибирует в клетках редьки масличной.

– Активность АСС растений тех же видов, выращенных на почвах с промышленным загрязнением, снижена во всех их органах. Исключение составляет пшеница, в подземных и надземных частях которой сохраняется высокий уровень цАМФ.

Работа выполнена при поддержке проекта РФФИ № 14-05-00735 А.

Список литературы

1. Дмитриев М. Т. Санитарно-химический анализ загрязняющих веществ в окружающей среде / М. Т. Дмитриев, Н. И. Казнина, И. А. Пинигина. – М. : Химия, 1989. – 368 с.
2. Каримова Ф. Г. ЦАМФ-зависимое фосфорилирование белков гороха, индуцированное форсколином / Ф. Г. Каримова, Е. В. Тырыкина, О. Ю. Захарова // Физиология растений. – 2005. – Т. 52. – С. 27–35.
3. Колупаев Ю. Е. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров / Ю. Е. Колупаев, Ю. В. Карпец. – Киев : Основа, 2010. – 352 с.
4. Кузнецов В. В. Общие системы устойчивости и трансдукция стрессорного сигнала при адаптации растений к абиотическим факторам // Вестн. Нижегород. ун-та. Сер. Биология. – 2001. – № 1. – С. 65–69.
5. Ломоватская Л. А. Аденилатциклазы и устойчивость растений к стрессам / Л. А. Ломоватская, А. С. Романенко, Н. В. Филинова. – Иркутск : Изд-во Ин-та географии им. В. Б. Сочавы СО РАН, 2010. – 87 с.

6. Мурзаева С. В. Накопление тяжелых металлов и активность антиоксидантных ферментов в пшенице при воздействии сточных вод // Изв. Самар. НЦ РАН. – 2002. – Т. 4, № 2 – С. 260–268.
7. Полевой В. В. Практикум по росту и устойчивости растений / В. В. Полевой, Т. В. Чиркова, И. А. Косарева. – СПб. : Изд-во СПбГУ, 2001. – 120 с.
8. Помазкина Л. В. Интегральная оценка влияния техногенного загрязнения и климатических факторов на агроэкосистемы Байкальской природной территории // Успехи современ. биологии. – 2011. – Т. 131, № 2. – С. 193–202.
9. Репкина Н. С. Влияние тяжелых металлов на экспрессию генов у растений / Н. С. Репкина, В. В. Таланова, А. Ф. Титов // Тр. Карел. НЦ РАН. – 2013. – № 3. – С. 31–45.
10. Танделов Ю. П. Фтор в системе почва – растение / Ю. П. Танделов. – 2-е изд., перераб. и доп. – Красноярск : [б. и.], 2012. – 146 с.
11. Третьяков Н. И. Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений / Н. И. Третьяков – М. : Колос, 1998. – 120 с.
12. Шакирова Ф. М. Сигнальная регуляция устойчивости растений к патогенам / Ф. М. Шакирова, А. Р. Сахабутдинова // Успехи современ. биологии. – 2003. – Т. 123. – С. 563–572.
13. A modified ensame immunoassay method for determination of cAMP in plant cells / L. A. Lomovatskaya [et al.] // Trends inimmunolabelled and related techniques. – 2012. – P. 161–168.
14. Early signaling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured Freanch bean cells involve cAMP and Ca²⁺ / L. V. Bundschedler [et al.] // New Phytologist. – 2001. – Vol. 151. – P. 185–194.
15. Evidence that cyclic AMP is involved in the hypersensitive response of *Medicago sativa* to a fungal elicitor / C. J. Cooke [et al.] // Phytochemistry. – 1994. – Vol. 35. – P. 889–894.
16. Jiang J. Evidenes for involvement of endogenous cAMP in *Arabidopsis* defense responses to *Verticillium* toxins / J. Jiang, L. W. Fan, W. H. Wu // Cell Research. – 2005. – Vol. 15. – P. 585–592.
17. Weinstein S. Fluorides in the Environment. CABI / S. Weinstein, A. Davison. – 2004 – 304 p.

Effect of High Doses of Fluoride in the Soil on the Activity of Adenylyl Cyclase Signaling System of Plants

L. A. Lomovatskaya, O. V. Rykun, A. A. Simakova, L. G. Sokolova,
A. S. Romanenko, L. V. Pomazkina

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry RAS, Irkutsk

Abstract. The article presents the first results on the response of adenylyl cyclase signaling system of different crops on the fluoride contamination of the soil. It is assumed that changes in the activity of adenylyl cyclase signaling system of the plants in these conditions can then be used as an objective diagnostic indicator of sustainability.

Keywords: fluoride contamination of soil, wheat, alfalfa, corn, oilseed radish, cAMP, diagnostic stability.

Ломоватская Лидия Арнольдовна
доктор биологических наук
ведущий научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42–82–56
факс: (3952) 51–07–54
e-mail: LidaL@sifibr.irk.ru

Lomovatskaya Lidiya Arnoldovna
Doctor of Sciences (Biology)
Leading Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42–82–56
fax: (3952) 51–07–54
e-mail: LidaL@sifibr.irk.ru

Рыкун Ольга Васильевна
ведущий инженер
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42–82–56
факс: (3952) 51–07–54
e-mail: sifibr@yandex.ru

Rykun Olga Vasilievna
Leading Engineer
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42–82–56
fax: (3952) 51–07–54
e-mail: sifibr@yandex.ru

Симакова Анастасия Александровна
ведущий технолог
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42–64–78
e-mail: lvp@sifibr.irk.ru

Simakova Anastasiya Aleksandrovna
Leading Technologist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42–64–78
e-mail: lvp@sifibr.irk.ru

Соколова Марина Гавриловна
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42–82–56
факс: (3952) 51–07–54
e-mail: sifibr@yandex.ru

Sokolova Marina Gavrilovna
Candidate of Sciences (Biology),
Senior Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology and
Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42–82–56
fax: (3952) 51–07–54
e-mail: sifibr@yandex.ru

Романенко Анатолий Сидорович
доктор биологических наук, профессор
главный научный сотрудник
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952) 42–82–56
факс: (3952) 51–07–54
e-mail: sifibr@yandex.ru

Romanenko Anatolii Sidorovich
Doctor of Sciences (Biology), Professor
Chief Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42–82–56
fax: (3952) 51–07–54
e-mail: sifibr@yandex.ru

Помазкина Любовь Владимировна
доктор биологических наук, профессор
заведующая лабораторией
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел.: (3952)42–64–78,
e-mail: lvp@sifibr.irk.ru

Pomazkina Lubov' Vladimirovna
Doctor of Sciences (Biology), Professor
Head of Laboratory
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42–64–78
e-mail: lvp@sifibr.irk.ru