

ORIGINAL ARTICLE

Role of Root Exudates in Adaptative Reactions of Buckwheat Plants in Aluminium-acid Stress

A.E. Smirnov*, A.M. Kosyan, O.I. Kosyk, N.Yu. Taran

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Educational and Scientific Centre "Institute of Biology", Kyiv, Ukraine

*E-Mail: mcd_smirnov@mail.ru

Received October 11, 2013

Aluminium toxicity is major limiting factor of crop production in acidic soils. It is known that mechanisms of toxic effects of aluminium are differing in biochemical characters, research of aluminium toxicity complicated by variety of its chemical forms and migration in soil and water ability. The root exudates qualitative composition of common buckwheat was evaluated. Organic complexing agents – oxalic acid and phenolic compounds were revealed. The role of these complexing agents in the buckwheat aluminium resistance under acidic stress, participation in processes of external and internal detoxification was shown. Spectrophometric assay revealed an increase in root secretion of oxalic acid by 2.5 times and decrease in content of phenolic compounds in root exudates solution by 3 times upon aluminium (50 μ M) treatment. In the meanwhile the same concentration of the metal had induced phenylalanine ammonia-lyase activity by 2 times.

Key words: aluminium resistance, buckwheat, oxalic acid, phenolic compounds, phenylalanine ammonia-lyase.

ORIGINAL ARTICLE

Роль Корневых Экссудатов в Адаптивных Реакциях Гречихи Обыкновенной в Условиях Алюмокислого Стресса

А. Е. Смирнов*, А. М. Косян, О. И. Косык, Н. Ю. Таран

Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, Образовательно-научный центр «Институт биологии», Киев, Украина

*E-Mail: mcd_smirnov@mail.ru

Поступила в редакцию 11 октября 2013 г.

Алюминиевая токсичность является основной причиной недобора урожая зерновых культур на кислых почвах. Известно, что механизмы токсического действия алюминия различны по своей биохимической природе, а изучение фитотоксических эффектов металла усложняется из-за многообразия его химических форм и способности к миграции в почве и воде. В работе изучен качественный состав корневых экссудатов гречихи обыкновенной. Выявлены органические комплексообразователи – щавелевая кислота и фенольные соединения. Показана роль этих комплексообразователей в устойчивости гречихи к алюмокислому стрессу, участие в процессах внешней и внутренней детоксикации. При обработке исследуемых растений алюминием наблюдалось увеличение в 2,5 раза количества выделенной в околораневой почвенный раствор щавелевой кислоты, содержание в корневых выделениях фенольных соединений, наоборот, снизилось в 3 раза. При этом отмечено повышение активности основного фермента синтеза фенольных соединений – фенилаланин аммиак-лиазы в 2 раза.

Key words: aluminium resistance, buckwheat, oxalic acid, phenolic compounds, phenylalanine ammonia-lyase.

В ходе эволюционного развития растения выработали ряд биохимических механизмов, которые способствуют адаптации и толерантности к различным стрессовым факторам биотической и абиотической природы. Одним из наиболее значимых параметров для нормального роста и развития растений является эдафический фактор – совокупность физико-химических свойств почвы. При этом на кислых почвах с высоким содержанием неорганических веществ, превалирующим фактором является

минеральная кислотность, повышение которой приводит к алюмокислому стрессу (Inostroza-Blancheteau et al., 2012).

Минеральная кислотность почвы может быть обусловлена выщелачиванием основных катионов – Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , что приводит к снижению буферной емкости, уровня pH почвы и переходу ионов алюминия в почвенный раствор. Солюбилизация алюминия в почвенном растворе – основная причина гибели растений на кислых почвах (Hede et al., 2001).

В литературе описаны различные механизмы адаптации растений к алюминиевой токсичности. Основные различия между механизмами адаптации к воздействию металла определяются местом детоксикации ионов алюминия – в почвенном растворе (внешняя детоксикация) или в растительных тканях (внутренняя детоксикация).

Образование комплекса алюминия с хелатирующими соединениями корневых выделений в почвенном растворе, лежит в основе процессов адаптации к фитотоксическим проявлениям металла (Bose et al., 2010). Выделяемые апексом корня фосфаты и карбоксилаты способны образовывать комплексы с ионами металла, но основными детоксикантами алюминия в почвенном растворе являются вторичные метаболиты – органические кислоты, фенольные вещества, непротеиногенные аминокислоты, алкалоиды, мукополисахариды, пектаты и сидерофоры (Meriga et al., 2003).

Гречиха обыкновенная (*Fagopyrum esculentum* Moench.) отличается высокой устойчивостью к токсичным эффектам алюминия. Корневая система гречихи характеризуется высокой синтетической активностью и выделением в почвенный раствор органических комплексообразователей с полидентатными лигандами – хелатирующих соединений. Эти органические соединения, образуя комплексы с алюминием, снижают подвижность ионов металла в почвенном растворе. Литературные данные свидетельствуют о том, что такими соединениями, выделяемыми корневой системой гречихи, могут быть органические кислоты, аминокислоты и фенольные

соединения (Ma et al., 1997).

Поэтому целью нашей работы было определение качественного состава комплексообразующих соединений в растворе корневых экссудатов гречихи посевной, изучение влияния ионов алюминия на их содержание в исследуемом растворе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 7-дневные проростки гречихи обыкновенной (*Fagopyrum esculentum* Moench.) сорта Рубра. Семена гречихи проращивали в чашках Петри на смоченной дистиллированной водой фильтровальной бумаге, в термостате при 25°C, на протяжении 2 дней.

Для получения корневых экссудатов использовали емкости, заполненные стерилизованным кварцевым песком, на который высаживали 2-дневные проростки гречихи. Растения выращивались в контролируемых условиях. Емкости с проростками размещали на световой площадке (16 ч день / 8 ч ночь) при температуре 25°C и освещении 12 тыс. люкс. На пятый день исследуемые растения обрабатывали 50 мкМ раствором алюминия (рН 4.5). Контрольные растения обрабатывали дистиллированной водой. Кюветы с 7-дневными проростками заполняли дистиллированной водой, на 30 минут. Через 30 минут полученный смыв корневых экссудатов переносили в плоско для выпаривания до полного испарения воды под потоком теплого воздуха. Выпаренный раствор корневых выделений растворяли в 1 мл метилового спирта для последующей идентификации компонентного состава.

Идентификация комплексообразующих

соединений (органических кислот, фенольных соединений, аминокислот) в корневых экссудатах проводили на основе капельного анализа органических веществ по Файглю, используя специфические для каждого комплексообразователя реактивы (Табл. 1) (Feigel, Anger, 1960).

Количественное содержание комплексообразующих соединений определяли на спектрофотометре UV-1800 «Shimadzu» (Япония). Содержание щавелевой кислоты в растворе корневых экссудатов гречихи обыкновенной определяли по окислению бромфенолового синего при 592 нм (Xiao-Qin, Zhi-Qi, 2000). Содержание фенольных соединений определяли с помощью реактива Фолина-Чекольте при 765 нм (Waterman, Mole, 1994).

Активность фермента фенилаланин аммиак-лиазы (КФ 4.3.1.5., ФАЛ) определяли в корнях с помощью методики Цукера (Zucker, 1965), спектрофотометрическим методом по изменению оптической плотности при 290 нм на спектрофотометре UV-1800 «Shimadzu» (Япония). Активность ФАЛ выражали в мМ коричной кислоты на г белка. Содержание белка определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951).

Статистическая обработка произведена в программе «Microsoft Excel 2010», разница считалась значимой при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фитотоксическое действие ионов алюминия проявляется в повреждении основных клеточных компонентов и процессов: структуры, состава и физико-химических свойств плазматической мембраны, поступления ионов Ca^{2+} и поддержания кальциевого баланса, динамических изменений цитоскелета,

клеточного ядра, митоза, процессов репликации и структуры хроматина (Kochian et al., 2005). Поэтому растения, произрастающие на кислых почвах с потенциально высокими концентрациями алюминия должны избегать прямого контакта жизненно важных структур и метаболических процессов с ионами токсиканта.

Существующая классификация органических кислот подразделяет их на три группы по снижению уровня алюминиевой токсичности (Пухальская, 2005). При этом наиболее сильными детоксикантами являются лимонная, щавелевая, и винная кислоты. Способность к детоксикации ионов алюминия у этих кислот положительно коррелирует с относительным положением гидроксильных и карбоксильных групп, благодаря наличию которых формируются стабильные 5- или 6-членные комплексы с алюминием (Hue et al., 1986).

Проведенный нами качественный анализ раствора корневых экссудатов гречихи обыкновенной показал, что лимонная кислота присутствует в корневых выделениях лишь в следовых количествах. Практически полное отсутствие цитрата в исследуемом растворе предполагает синтез корневой системой другой органической кислоты с сильными комплексообразующими свойствами. После проведения реакции с дифениламином на обнаружение щавелевой кислоты, в исследуемом растворе корневых экссудатов было установлено наличие этой комплексообразующей кислоты в значительных количествах. Проведенная качественная реакция на обнаружение аминокислот с нингидрином, показала, что аминокислоты в корневых выделениях гречихи содержатся в следовых количествах. На это указывает отсутствие

характерной синей окраски. Реакция с хлоридом железа (III) так же не показала наличие аминокислот в исследуемом растворе корневых экссудатов.

Считается, что выделение в околокорневой почвенный раствор органических кислот с комплексообразующими свойствами не является единственным путем обеспечения алюмореzистентности, ему способствует также выделение фенольных веществ корневой системой гречихи, описанное отдельными авторами (Marschner, 1995). Фенолы могут снижать токсический эффект алюминия, регулируя активность растительной гексокиназы (Taylor, 1988). Имеются сообщения о способности фенолов снижать токсический эффект алюминия на корневой рост, ингибирование которого является первым признаком влияния металла (Wagatsuma et al., 2001).

Фенольные вещества и соединения, содержащие фенольный гидроксил, вступая в реакцию с хлоридом железа (III) дают интенсивную желто-зеленую окраску. Нами был получен раствор с характерной окраской, указывающей на присутствие фенольных соединений в исследуемом растворе.

Проведенные количественные исследования корневых выделений показали, что содержание щавелевой кислоты в растворе корневых экссудатов растений, обработанных кислым раствором алюминия, возросло в 2,5 раза. При этом содержание фенольных веществ в исследуемом растворе значительно снизилось – более чем в 3 раза (рис. 1).

Отмеченное нами выделение значительного количества щавелевой кислоты корневой системой гречихи обыкновенной способствует

образованию комплексов алюминия со щавелевой кислотой, предотвращает попадание металла в клетки корневого апекса и создает, таким образом, одно из звеньев адаптационного механизма, который обеспечивает алюмореzистентность данного вида.

По мнению некоторых авторов, фенолы – менее эффективные хелаторы, поэтому изучению роли фенольных соединений в формировании алюмореzистентности уделяется меньше внимания. Фенолы, благодаря реакции депротонирования, могут усиливать взаимодействие органических кислот с ионами алюминия, увеличивая константу стабильности для комплекса металла с органическими кислотами (Vardar, Umal, 2007). Помимо этого, существуют данные про индуцированное алюминием увеличение активности ключевого фермента биосинтеза фенольных соединений – фенилаланин аммиак-лиазы (КФ 4.3.1.5., ФАЛ). Исследования, проведенные нами, указывают на повышение активности фермента ФАЛ в корнях растений обработанных раствором алюминия в 2 раза (рис. 2).

Полученные результаты определяют видовую специфику комплексной ответной реакции на алюмокислый стресс растений гречихи. В силу сложности процессов, вовлеченных в общий адаптационный механизм при действии алюминия, можно предположить, что выделяемые корневой системой гречихи низкомолекулярные комплексообразователи участвуют в процессах внешней и внутренней детоксикации ионов металла.

Анализ полученных данных указывает на активацию синтеза и выделения щавелевой кислоты корневой системой гречихи обыкновенной в околокорневой почвенный

раствор. Щавелевая кислота – основной хелатирующий агент, связывающий ионы подвижного алюминия в ризосфере. Фенольные соединения, выделяемые гречихой, не являются значимыми хелаторами – не принимают участия в процессах внешней детоксикации. Очевидно,

активация фермента ФАЛ обеспечивает биосинтез фенольных соединений, которые участвуют в окислительно-восстановительных циклах для поддержания про/антиоксидантного гомеостаза внутри клетки и не выделяются в почвенный раствор.

Таблица 1 : Реактивы для обнаружения комплексообразующих соединений в растворе корневых экссудатов гречихи обыкновенной

Искомый комплексообразователь	Реактив	Изменение окраски
Лимонная кислота	Пиридин + уксусный ангидрид	С бесцветной на карминно-красную
Щавелевая кислота	Дифениламин	С бесцветной на синюю
Аминокислоты	Нингидрин	С бесцветной на синюю, красную, пурпурную
	Хлористое железо (III)	С бесцветной на красную
Фенольные вещества	Хлористое железо (III)	С бесцветной на желто-зеленую

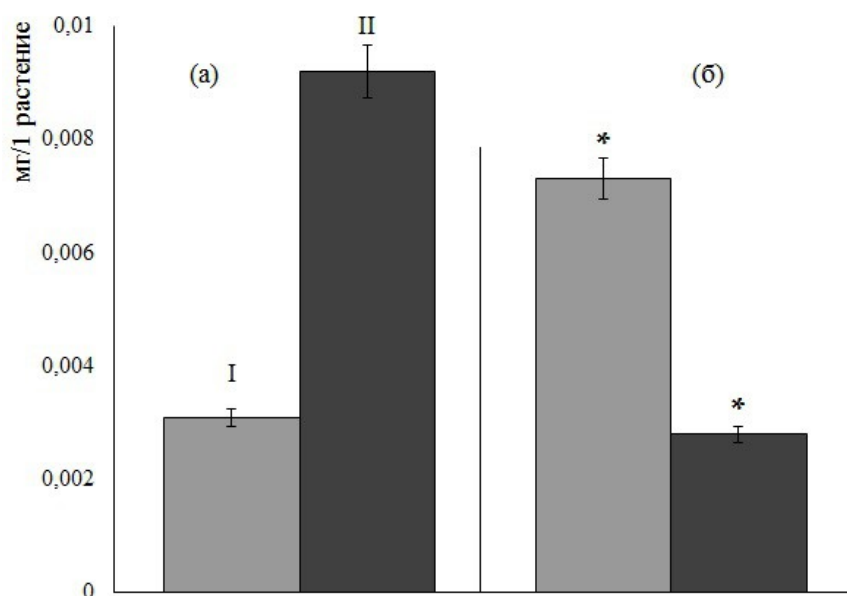


Рисунок 1 : Влияние алюминия на содержание комплексообразующих соединений в корневых экссудатах гречихи обыкновенной: (а) – контроль, (б) – 50 мкМ алюминия; (I) – щавелевая кислота, (II) – фенолы; * – $P < 0,05$.

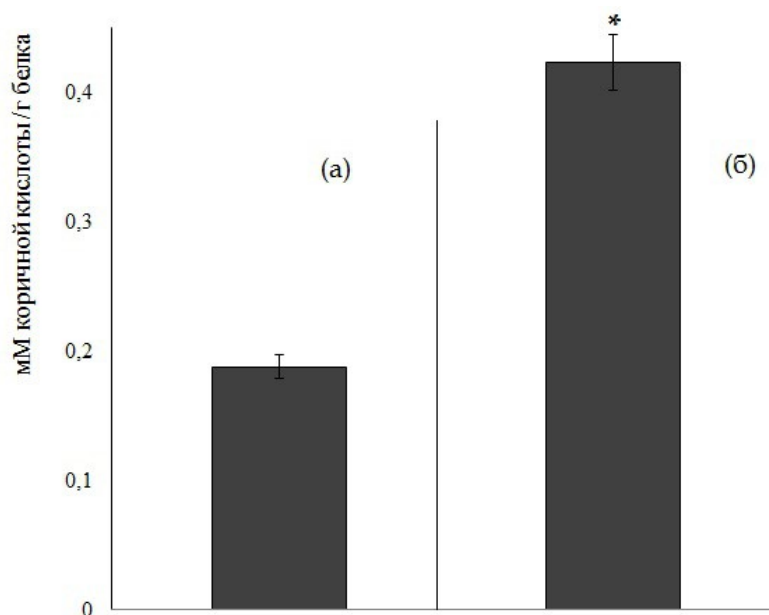


Рисунок 2 : Влияние алюминия на активность фенилаланин аммиак-лиазы (ФАЛ) в корнях 7-дневных проростков гречихи обыкновенной: (а) – контроль, (б) – 50 мкМ алюминия; * – $P < 0,05$.

ЛИТЕРАТУРА

- Пухальская Н.В. (2005) Проблемные вопросы алюминиевой токсичности. *Агрохимия*. **8**. 70-81.
- Bose J., Babourina O., Shabala S. Rengel Z. (2010) Aluminium-induced ion transport in Arabidopsis: the relationship between Al tolerance and root ion flux. *Journal of Exp. Bot.* **61**. 3163–3175.
- Feigl, E. Anger V. (1960) Spot Tests in Organic Analysis. Amsterdam: Elsevier, 836 p.
- Hede A.R., Skovmand B., Lopez-Cesati J. (2001) Acid soils and aluminum toxicity, Application of physiology in wheat breeding Mexico. D.F.: CIMMYT, 172–182 p.
- Hue N.V., Graddock G.R., Adams F. (1986) Effect of organic acid on aluminium toxicity in subsoils. *Soil Science*. **50**. 28-34.
- Inostroza-Blancheteau C., Rengel Z., Alberdi M., de la Luz Mora M., Aquea F., Arce-Johnson P., Reyes-Díaz M. (2012) Molecular and physiological strategies to increase aluminum resistance in plants. *Mol. Biol. Rep.* **39**(3). 2069-2079.
- Kochian L.V., Piceros M.A., Hoekenga O.A. (2005) The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminium resistance and toxicity. *Plant and Soil*. **274**. 175–195.
- Lowry K., Rosebrough N.J., Farr A.Z. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal. Biol. Chem.* **193**(1). 265–275.
- Ma J., Zheng S., Matsumoto H., Hiradate S. (1997) Detoxifying aluminum with buckwheat. *Nature*. **390**. 569–570.
- Marschner H. (1995) Mineral nutrition of Higher Plants. London: Academic Press, 889 p.
- Meriga B., Reddy B.K., Jogeswar G., Reddy L.A., Kavi Kishor P.B. (2003) Alleviating effect of citrate on aluminium toxicity of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Current Science*. **85**(3). 383–386.
- Taylor G.J. (1988) The physiology of aluminum phytotoxicity. *Metal Ions in Biological Systems*. **24**. P. 123-168.
- Vardar F., Umal M. (2007) Aluminum toxicity and

- resistance in higher plants. *Advances in Molecular Biology*. **1**. 1–12.
- Wagatsuma T., Ishikawa S., Akimoto T., Tawaraya K. (2001) Plant Nutrition-Food Security and Sustainability of Agroecosystems. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ, 454-455.
- Waterman P.G., Mole S. (1994) Analysis of Phenolic Plant Metabolites. London: Blackwell Scientific Publications, 238 p.
- Xiao-Qin Xu, Zhi-Qi Zhang. (2000) Kinetic Spectrophotometric Determination of Oxalic Acid Based on the Catalytic Oxidation of Bromophenol Blue by Dichromate. *Microchimica acta*. **135(3-4)**. 169–172.
- Zucker M. (1965) Induction of Phenylalanine Deaminase by Light and its Relation to Chlorogenic Acid Synthesis in Potato Tuber Tissue. *Plant Physiology*. **40(5)**. 779–784.