

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА МЕТАБОЛОМ *PINUS SYLVESTRIS* (PINACEAE)

© 2021 г. К. В. Сазанова^{1,2,*}, Н. В. Алексеева-Попова¹, И. В. Дроздова¹,
А. И. Беляева¹, И. Б. Калимова¹, Н. И. Павлова¹, А. Л. Шаварда^{1,3}

¹ Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН
ул. Проф. Попова, 2, Санкт-Петербург, 197376, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет
Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034, Россия

³ Научный парк Санкт-Петербургского государственного университета
Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034, Россия

*e-mail: Ksazanova@binran.ru

Поступила в редакцию 31.08.2020 г.

После доработки 03.08.2021 г.

Принята к публикации 24.08.2021 г.

В экспериментальных условиях, с применением метода газовой хроматографии-масс-спектрометрии изучено влияние Cu, Ni и Cd на метаболом *Pinus sylvestris*. Установлено, что изменения в структуре метаболитной сети растений обнаруживаются на 6-е сутки после воздействия металлов, что на 3–6 дней раньше проявления визуальных симптомов токсичности. При этом контрольная группа растений проявляет отличия на уровне метаболома раньше, а специфическое влияние отдельных металлов на метаболом растений заметно только на 9-е сутки. Оба фактора (природа металла и его концентрация) вносят равнозначный вклад в кластеризацию метаболомов растений. Ответные же реакции растений на действие металлов, проявляющиеся в изменении концентраций отдельных метаболитов, существенно отличаются в зависимости от вносимой концентрации металлов (1 или 5 мМ) и от природы металлов: особенности влияния Cd и Cu проявляются в основном сходным образом, а действие Ni часто отличается. Визуализированные динамические изменения метаболитной матрицы растений обусловлены в основном не набором определенных соединений, а являются проявлением изменения ее корреляционной структуры.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris*, тяжелые металлы, метаболом, стресс, токсичность, адаптация

DOI: 10.31857/S0006813621110089

Загрязнение тяжелыми металлами представляет собой значительную угрозу для экосистем. В отличие от органических загрязнителей, эти поллютанты не являются биоразлагаемыми и способны перемещаться по пищевой цепи через биоаккумуляцию (Singh et al., 2011). Активное поступление тяжелых металлов в окружающую среду определяет многократное увеличение стрессовых нагрузок на все компоненты экосистем, что может вести к изменению ее структуры в целом (¹Kurilenko et al., 2004). Тяжелые металлы являются естественными компонентами земной коры. Накопление значительных концентраций некоторых металлов в окружающей среде — воздухе, почве и растениях — может быть результатом естественных процессов, а также следствием

деятельности человека. Антропогенными источниками для эмиссии металлов являются объекты добычи ископаемого топлива, сжигания отходов, переработки руды в цветные металлы, транспорт (Расуна, Расуна, 2001; Sawidis et al., 2011). Проблема загрязнения тяжелыми металлами особенно актуальна в городской среде (Al-Khlaifat, Al-Khashman, 2007; Sawidis et al., 2011; Chen et al., 2016; Zhao et al., 2016). Изучение механизмов устойчивости растений к токсическому действию тяжелых металлов необходимо для разработки эффективных методов оценки возрастающего антропогенного загрязнения окружающей среды и разработки мер по его снижению.

Cd, Cu и Ni относятся к приоритетным загрязнителям окружающей среды. Кадмий не является необходимым элементом для роста растений, но он легко усваивается корнями и переносится в побеги. Поэтому его присутствие в окружающей среде даже в минимальных количествах представ-

¹ Куриленко В.В., Зайцева О.В., Новикова Е.А., Осмоловская Н.Г., Уфимцева М.Д. 2004. Основы экогеологии, биоиндикации и биотестирования водных экосистем. СПб. 444 с.

ляет серьезную угрозу для растений (Xie et al., 2014). Медь и никель, в отличие от кадмия, необходимы для нормального роста и развития растений. Однако, когда концентрация этих металлов в окружающей среде очень высока, они становятся токсичными (Valko et al. 2006; Bhalerao et al., 2015; Hassan et al., 2019).

Поглощение и накопление избыточных концентраций тяжелых металлов растениями вызывает различные морфологические, физиологические и биохимические реакции, которые проявляются в торможении роста, нарушении фотосинтеза, дыхания, водного обмена и минерального питания растений (Nazar et al., 2012; ²Titov et al., 2014; Bhalerao et al., 2015). Некоторые ионы металлов вызывают окислительный стресс через образование активных форм кислорода (АФК), которые нарушают метаболизм клеток и приводят к множественным токсическим эффектам, таким как перекисное окисление липидов, расщепление белков или повреждение ДНК (Pongrac et al., 2009; Kandziora-Ciupa et al., 2016). Таким образом, токсическое действие металлов проявляется в нарушении многочисленных метаболических процессов в растениях.

В зависимости от таксономической и экологической принадлежности, растения проявляют одну из двух стратегий устойчивости к тяжелым металлам, а именно предотвращения или ограничения поглощения металлов клетками растений или внутриклеточной детоксикации металлов (Titov et al., 2014). Обнаружено, что у растений имеются внутриклеточные системы, которые контролируют АФК с использованием ферментативных антиоксидантов, таких как глутатион, пролин, аскорбиновая кислота, каротиноиды и небелковые соединения, богатые группами S-H, а также ферментативные антиоксидантные системы (Pongrac et al. 2009; Kandziora-Ciupa, et al., 2016). Низкомолекулярные соединения играют важную роль при адаптации растений к тяжелым металлам. Ряд метаболитов, таких как органические кислоты, аминокислоты, сахара и полиолы могут функционировать в качестве антиоксидантов, осмо-протекторов, молекул сигнальной трансдукции, а также являться побочными продуктами биохимических изменений, происходящих при стрессе (Rizhsky et al., 2004; Shulaev et al., 2008; Xie et al., 2014).

В последнее время мощным инструментом для исследования особенностей метаболических процессов у растений является метаболомный профайлинг (Guy et al., 2008; Fiehn, 2002; Kaplan et al., 2004). В отличие от целевого анализа конкретных соединений результаты метаболомного профайлинга позволяют не только получать дан-

ные о концентрационных изменениях большого числа малых органических молекул, но также и исследовать эмерджентное поведение такой сложнейшей биологической системы как метаболическая сеть растения при стрессовом воздействии.

Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) является одной из основных лесообразующих хвойных пород на Европейском Севере России, она весьма чувствительна к атмосферному загрязнению и другим антропогенным факторам. В многочисленных исследованиях показано, что эта древесная порода широко используется для целей биоиндикации загрязнения среды тяжелыми металлами (³Yarmishko 1997; ⁴Ivanov et al., 2013; Kandziora-Ciupa et al., 2016; Václavík et al., 2016). Сосновые иголки с толстым эпикутикулярным восковым слоем интересны для биомониторинга загрязнения воздуха из-за возможности как пассивного, так и активного поглощения тканями из атмосферы (Kandziora-Ciupa, et al., 2016).

Цель данного исследования состояла в выявлении общих закономерностей изменения метаболитного профиля *Pinus sylvestris*, а также концентрационных изменений отдельных метаболитов под действием меди, никеля и кадмия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выращивание растений и воздействие тяжелыми металлами

Для проведения эксперимента использовали семена *P. sylvestris* сбора 2011 г., предоставленные Выборгским лесхозом Ленинградской области. Проращивание семян проводили в вегетационных сосудах, содержащих 1 кг песка, который поливали через сутки дистиллированной водой, а после появления всходов – разбавленным 1:2 питательным раствором Арнона. В каждый сосуд высевали по 50 семян, после появления всходов оставляли по 20 растений на сосуд. Растения выращивали в контролируемых условиях со световым периодом 16 ч при температуре 21°C в течение месяца. Затем, в контрольный вариант продолжали вносить питательную смесь в той же концентрации, а в опытных вариантах к ней добавляли сернокислые соли металлов ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$). Использовали подобранные в предварительной серии опытов (Drozdova et al., 2014) действующие концентрации этих тяжелых металлов: 1 мМ и

³ Ярмишко В.Т. Сосна обыкновенная и атмосферное загрязнение на Европейском Севере. СПб. 1997. 210 с.

⁴ Иванов Ю.В., Савочкин Ю.В., Кузнецов В.В. 2011. Сосна обыкновенная как модельный объект для изучения адаптации хвойных к действию тяжелых металлов. Изменение морфометрических и физиологических параметров при развитии сеянцев сосны в условиях хронического действия цинка. – Физиология растений. 58(5): 728–736.

² Титов А.Ф., Казнина Н.М., Таланова В.В. 2014. Тяжелые металлы и растения. Петрозаводск. 194 с.

5 мМ. Расчет был выполнен именно на концентрацию металлов, а не их солей. Оценку темпов накопления биомассы надземной части семян проводили гравиметрическим методом. Для определения абсолютно сухой биомассы ее высушивали до постоянного веса. Пробы для анализа метаболитного профиля *P. sylvestris* и содержания в растениях Cu, Ni и Cd отбирали в процессе роста на 3-й, 6-й и 9-й день после внесения металлов до появления визуальных признаков токсичности.

Подготовка проб

Пробоподготовку осуществляли в соответствии с общепринятыми современными методиками (Kim, Verpoorte, 2010). Растения фиксировали в жидком азоте, экстрагировали метанолом и центрифугировали при 4000 г в течение 10 минут. Полученный экстракт выпаривали при 40°C на ротонном испарителе ИКА, сухой остаток растворяли в пиридине. Далее с использованием N, O-бис-(триметилсилил) трифторацетамида (BSTFA) (Supelco, США) получали ТМС (триметилсилил)-производные. Силилирование выполняли в течение 15 мин при 100°C.

Растительный материал для анализа содержания тяжелых металлов фиксировали при 105°C, затем выдерживали в сушильном шкафу при 70°C до достижения постоянного веса. Сухие образцы (2 г) озольяли в муфельной печи при 450°C в течение 12 ч. Зола растворяли в 6 мл смеси кислот: 1.5 М HCl и 3.71 М HNO₃, затем разбавляли деионизированной водой до 25 мл.

Анализ проб

Анализ содержания метаболитов в растениях *P. sylvestris* проводили методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) на приборе Маэстро (Интерлаб, Россия) с масс-селективным детектором 5975С, колонка HP-5MS, 30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм, Agilent (US). Хроматографирование проводили при линейном программировании температуры от 70°C до 320°C, 6°C/мин в режиме постоянства потока газа-носителя через колонку (1 мл/мин). Газ-носитель — гелий. Сканирование масс-спектров проводилось в диапазоне 50–800 m/z с частотой 2 скана/сек. Хроматограммы образцов регистрировали по полному ионному току. Сбор данных осуществляли с помощью программного обеспечения Agilent ChemStation.

Концентрации Cu, Ni и Cd определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре Квант-АФА, “Кортек”, Россия.

Обработка данных

Обработку и интерпретацию масс-спектрометрической информации проводили с использованием программы AMDIS (<http://www.amdis.net>), базы данных NIST 2011 и базы данных масс-спектрометрической информации, созданной в Ботаническом институте им. В.Л. Комарова РАН. Определение индексов удерживания (RI) проводили с методом калибровки по стандартным предельным углеводородам. Полуколичественную (semiquantitation) интерпретацию метаболитного профиля осуществляли по площадям пиков полного ионного тока методом внутреннего стандарта с помощью программы UniChrom (www.unichrom.com). В качестве внутреннего стандарта использовался трикозан, добавляемый в пробу на стадии растворения ее в пиридине. Следует особо отметить, что данные о количественном содержании отдельных соединений являются не более чем оценочной характеристикой содержания метаболитов в экстрактах растений, но могут использоваться для построения метаболитной матрицы, которая и является формальным результатом профайлингового анализа и используется для статистического моделирования изучаемого явления. Статистическая обработка результатов была выполнена методами мультивариантной статистики с использованием программ Microsoft Excel и MetaboAnalyst.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Визуальные симптомы токсичности появились на 10–12 день. Они проявлялись в уменьшении прироста, усыхании, хлорозах и некрозах хвои, укорочении главного и боковых корней. Ранее нами были показаны особенности влияния Ni, Cu и Cd в концентрациях 1 и 5 мМ на ростовые и морфологические признаки растений *Pinus sylvestris* (Drozdova et al., 2014). В этих опытах было установлено, что под действием Cd рост стебля и хвои замедлялся на 20% по сравнению с контролем при концентрации металла 1 мМ и на 30% — при концентрации 5 мМ. Медь в низкой концентрации практически не влияла на рост стебля, а в высокой концентрации замедляла его рост на 30–35%. Токсическое влияние Cu в обеих концентрациях в большей степени затрагивало накопление биомассы хвои, которая была на 35–40% меньше, чем в контроле. Никель в низкой концентрации не влиял на прирост стебля и хвои, а в высокой концентрации замедлял прирост стебля на 5–10% и на 20% снижал биомассу хвои. Настоящее исследование в целом подтвердило полученные ра-

⁵ Дроздова И.В., Алексеева-Попова Н.В., Беляева А.И., Калимова И.Б. 2014. Влияние меди, никеля и кадмия на рост и некоторые физиологические параметры семян *Pinus sylvestris* и *Picea abies* (Pinaceae). — Раст. ресурсы. 50 (4): 554–566.

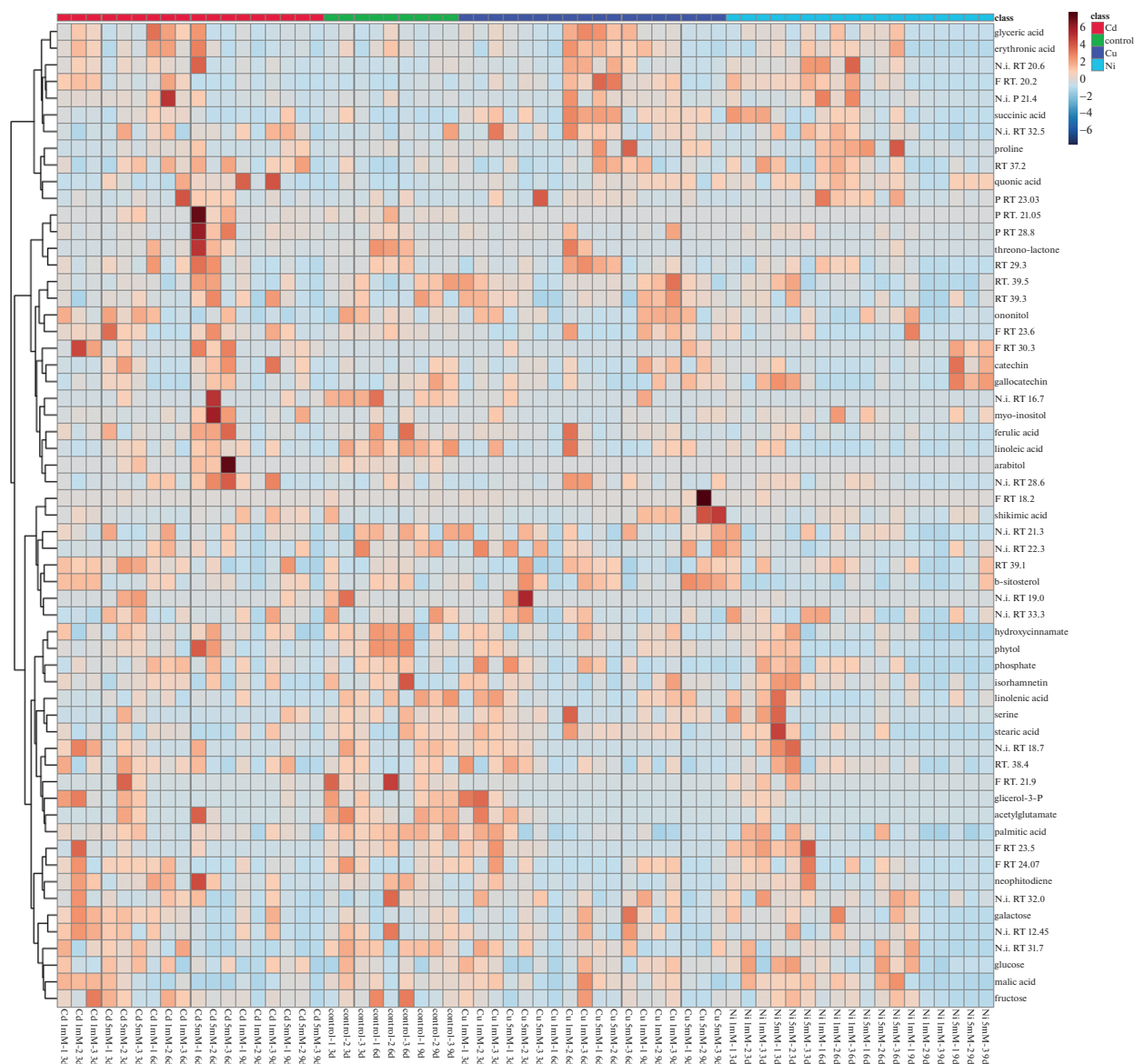


Рис. 1. Тепловая карта метаболитов, обнаруженных в экстрактах растений *Pinus sylvestris* под действием металлов (Ni – неидентифицированные метаболиты, Rt – время удерживания; F – furanose, P – pyranose).

Fig. 1. Heat map of metabolites found in extracts of *Pinus sylvestris* plants under the influence of metals (Ni – unidentified metabolites, Rt – retention time; F – furanose, P – pyranose).

нее данные. На 9-е сутки эксперимента наиболее выраженным – на 30% по сравнению с контролем было снижение сухой биомассы надземной части семян *Pinus sylvestris* при действии Cd в концентрации 5 мМ. Никель в концентрации 1 мМ не вызывал сколько-нибудь значимого снижения биомассы семян, с увеличением концентрации до 5 мМ наблюдалось ее снижение на 25%. Воздействие Cu в концентрациях 1 и 5 мМ приводило к снижению аккумуляции биомассы семян от 20 до 23% от контроля.

Метаболомный профайлинг растений позволил идентифицировать соединения следующих классов: карбоновые кислоты алифатического

ряда, в том числе кислоты цикла Кребса, аминокислоты, сахарокислоты, жирные кислоты; сахароспирты, моно- и дисахара, циклические кислоты (шикимовая кислота, хинная кислота, кумаровая кислота, феруловая кислота), флавоноиды (катехины, изорамнетин), терпены (в том числе абиетиновая кислота и фитол), стеролы. Некоторые соединения не были идентифицированы, но учитывались при построении статистических моделей. Результаты метаболомного профайлинга представлены в виде тепловой карты на рис. 1.

На рисунке видно, что добавление металлов в питательный раствор влияет на концентрационные изменения множества метаболитов. Кроме

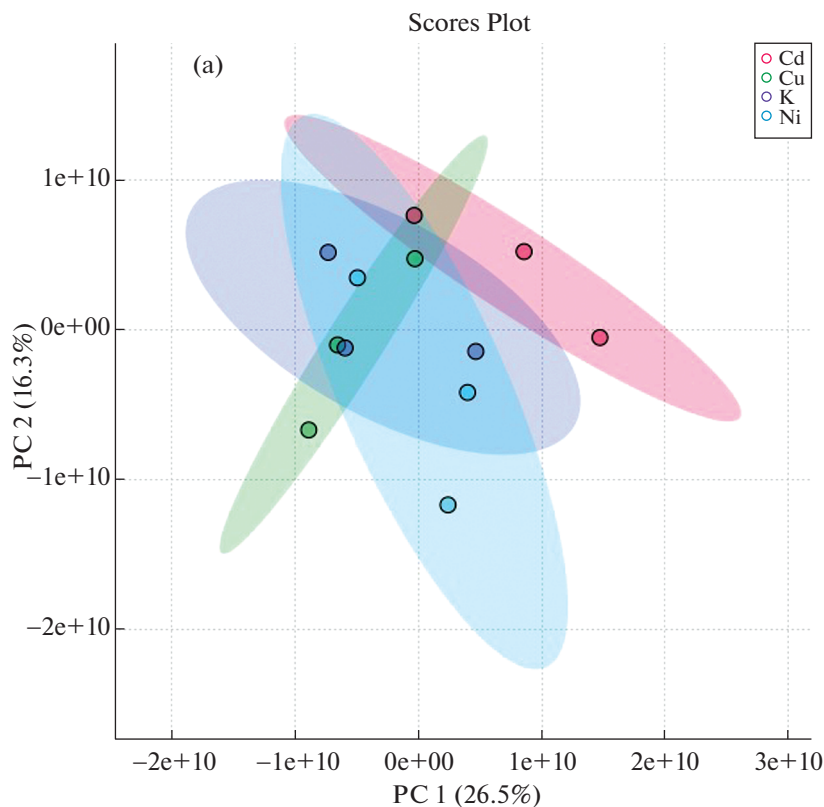


Рис. 2. PCA анализ растений *Pinus sylvestris* после внесения тяжелых металлов Cu, Ni и Cd в концентрации 1 мМ: а – 3-и сутки, полученная модель объясняет 42.8% общей дисперсии (PC1 – 26.5%; PC2 – 16.3%); б – 6-е сутки, полученная модель объясняет 42% общей дисперсии (PC1 – 23.1%; PC2 – 18.9%); в – 9-е сутки, полученная модель объясняет 45.3% общей дисперсии (PC1 – 31.3%; PC2 – 14%).

Fig. 2. PCA analysis of *Pinus sylvestris* plants after the addition of heavy metals Cu, Ni and Cd at a concentration of 1 mM: а – 3rd day, the resulting model explains 42.8% of the total variance (PC1 – 26.5%; PC2 – 16.3%); б – 6th day, the resulting model explains 42% of the total variance (PC1 – 23.1%; PC2 – 18.9%); в – 9th day, the resulting model explains 45.3% of the total variance (PC1 – 31.3%; PC2 – 14%).

того, метаболомный профиль растения претерпевает динамические изменения в процессе роста растений. Сочетание этих изменений приводит к изменению структуры метаболитной сети в целом.

Состояние метаболитной сети растений было смоделировано с использованием метода главных компонент (МГК) в виде точек в фазовом пространстве, которое построено в координатах, выражающих число молекул каждого структурного типа, обнаруженных в данный момент времени в пробе. Согласно результатам МГК-анализа, различия в структуре метаболитной сети контрольных растений и растений, выращенных в присутствии металлов, выражающиеся в кластеризации метаболомов опытных образцов, заметны только на 6-е сутки после воздействия. На 3-и сутки различия не проявляются (рис. 1, 2). На 9-е сутки заметно четкое расхождение в пространстве главных компонент метаболомов растений, выращенных в присутствии того или иного металла, т.е. проявляется специфическое действие метал-

лов. Таким образом, различия между метаболомом контрольных и опытных растений проявляются раньше, чем между растениями, выращенными в присутствии разных металлов. При этом скорость формирования ответной реакции на уровне метаболома не имеет прямой зависимости от концентрации вносимых Cu, Ni и Cd.

Как видно на рис. 1, концентрации многих соединений сильно варьируют даже в пределах одной экспериментальной группы. Такие различия являются проявлением индивидуальных особенностей метаболомного профиля отдельных растений. Эти различия, безусловно, вносят вклад в структуру метаболитной сети растений. Таким образом, визуализированные динамические изменения метаболитной матрицы растений обусловлены в основном не набором определенных соединений, а, скорее всего, являются проявлением изменения ее корреляционной структуры. Тем не менее статистический анализ позволяет выявить нагрузки переменных, т.е. коэффициенты значимости для отдельных метаболитов. Для

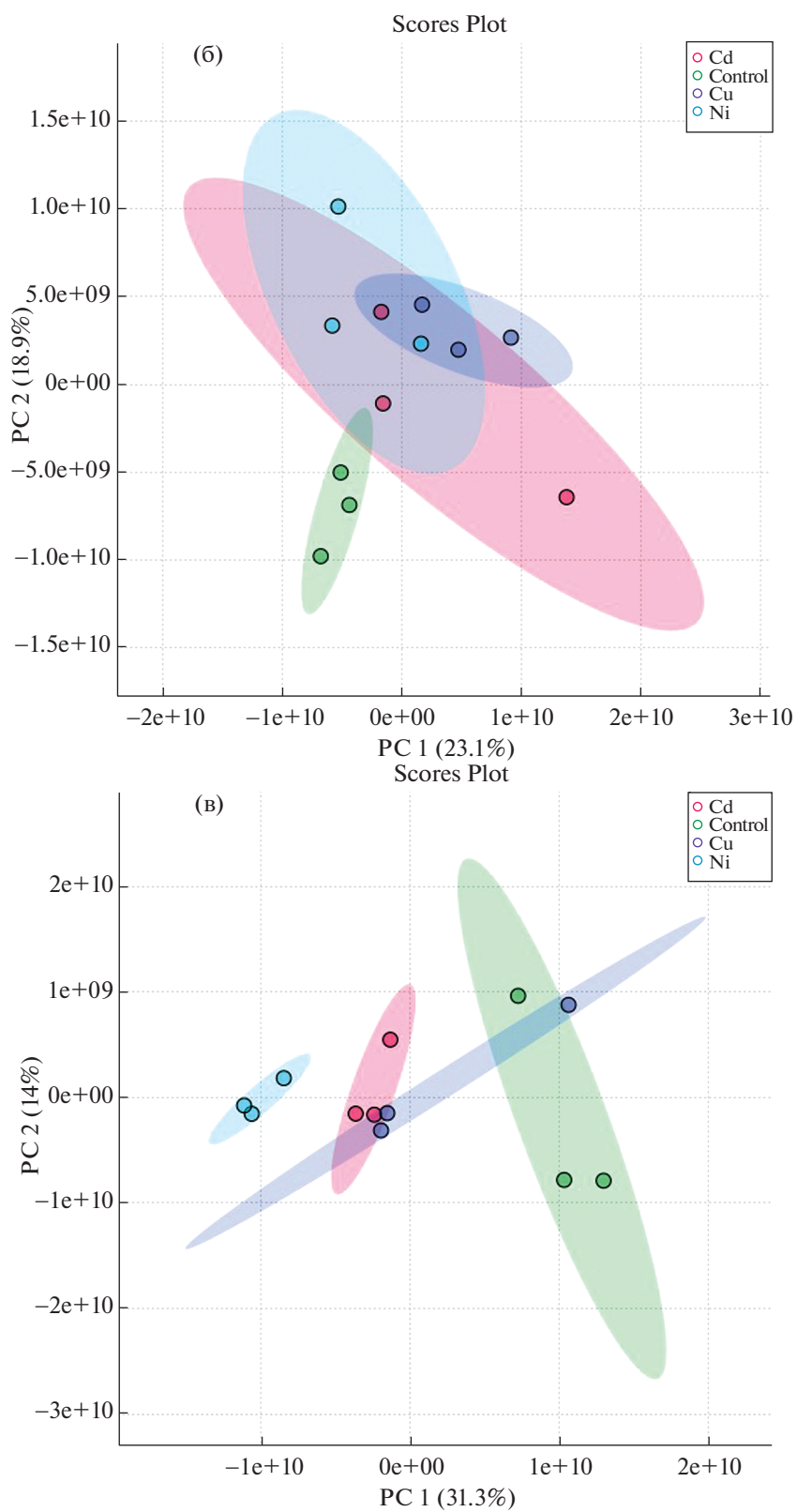


Рис. 2. Окончание.

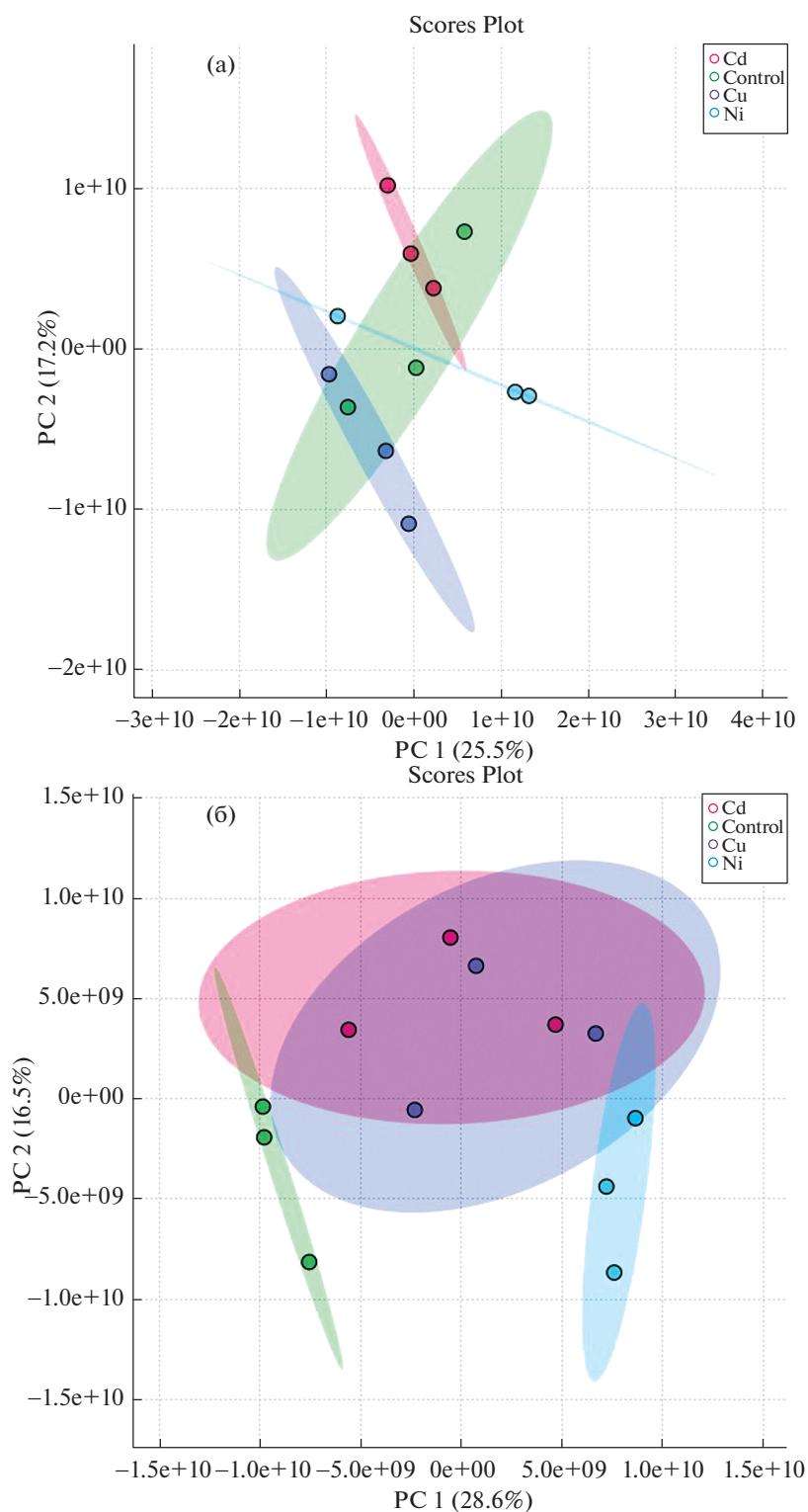


Рис. 3. PCA анализ растений *Pinus sylvestris* после внесения тяжелых металлов Cu, Ni и Cd в концентрации 5 мМ: а – 3-и сутки, полученная модель объясняет 42.7% общей дисперсии (PC1 – 25.5%; PC2 – 17.2%); б – 6-е сутки, полученная модель объясняет 42.1% общей дисперсии (PC1 – 28.6%; PC2 – 16.5%); в – 9-е сутки, полученная модель объясняет 46.5% общей дисперсии (PC1 – 25.6%; PC2 – 20.9%).

Fig. 3. PCA analysis of *Pinus sylvestris* plants after the addition of heavy metals Cu, Ni and Cd at a concentration of 5 mM: а – 3rd day, the resulting model explains 42.7% of the total variance (PC1 – 25.5%; PC2 – 17.2%); б – 6th day, the resulting model explains 42.1% of the total variance (PC1 – 28.6%; PC2 – 16.5%); в – 9th day, the resulting model explains 46.5% of the total variance (PC1 – 25.6%; PC2 – 20.9%).

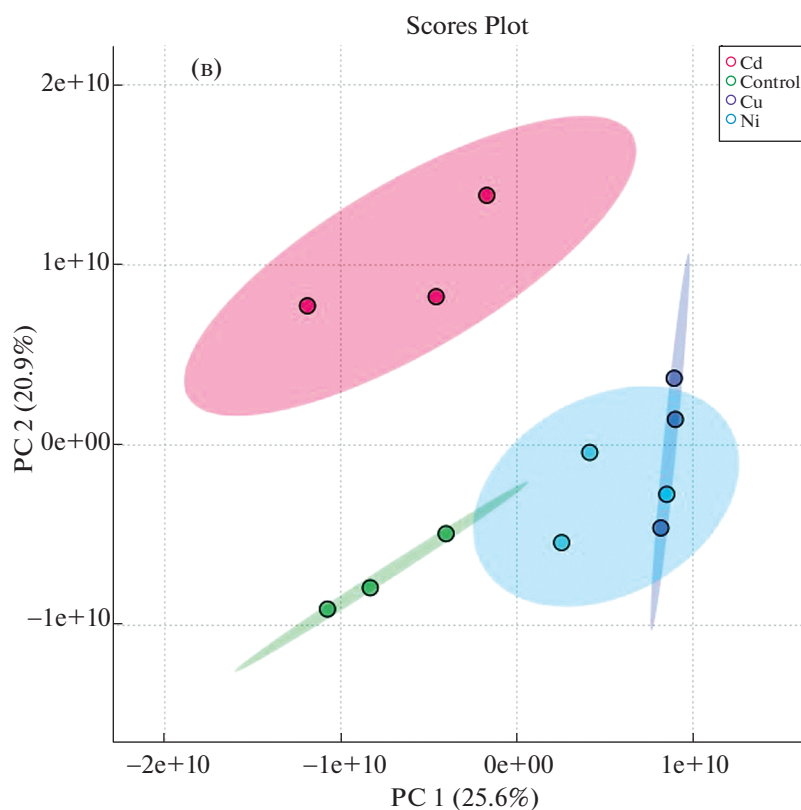


Рис. 3. Окончание.

главных компонент (ГК) 1 и 2 на 6-е сутки роста при обеих концентрациях металлов коэффициенты значимости были наибольшими для шикимовой, хинной и глицериновой кислот. При концентрации металлов 5 мМ, а также при более длительном воздействии металлов большую значимость приобретали жирные кислоты и сукцинат (табл. 1). Под действием металлов в концентрации 5 мМ на 9-е сутки изменения метаболизма были также связаны с некоторыми аминокислотами (пролин и серин) и многоатомными

спиртами (мио-инозитол и ононитол), фитолом и катехином.

При количественном анализе конкретных соединений также заметно, что особенности влияния Cd и Cu на накопление метаболитов часто сходны, а действие Ni проявляется иначе. Влияние Cu и Cd связано практически с одинаковым набором метаболитов, а именно в первую очередь с хинной и шикимовой кислотами, янтарной кислотой и жирными кислотами. Влияние же Ni в большей степени затрагивает метаболизм аминокислот.

Таблица 1. Наиболее значимые для построения статистической модели метаболомных различий соединения
Table 1. The most significant compounds for constructing a statistical model of metabolomic differences

Сутки/ day	Концентрация металлов/ Concentration of metals	Соединения/Compounds
6	1 mM	Шикимовая кислота, хинная кислота, эритроновая кислота, глицериновая кислота, галактоза/Shikimic acid, quinic acid, erythronic acid, glyceric acid, galactose
	5 mM	Шикимовая кислота, хинная кислота, янтарная кислота, глицериновая кислота, арабитол, катехин, линолевая, линоленовая кислоты/Shikimic acid, quinic acid, succinic acid, glyceric acid, arabitol, catechin, linolic acid, linoleic acid
9	1 mM	Шикимовая кислота, хинная кислота, янтарная кислота, глицериновая кислота, эритроновая кислота, ситостерол, жирные кислоты (линолевая, линоленовая, пальмитиновая)/Shikimic acid, quinic acid, succinic acid, glyceric acid, erythronic acid, sitosterol, fatty acids (linolic acid, linoleic acid, palmitic acid)
	5 mM	Янтарная кислота, глюкоза, серин, пролин, ононитол, катехин, мио-инозитол, фитол, линоленовая кислота/Succinic acid, glucose, serine, proline, ononitol, catechin, mio-inositol, phytol, linoleic acid

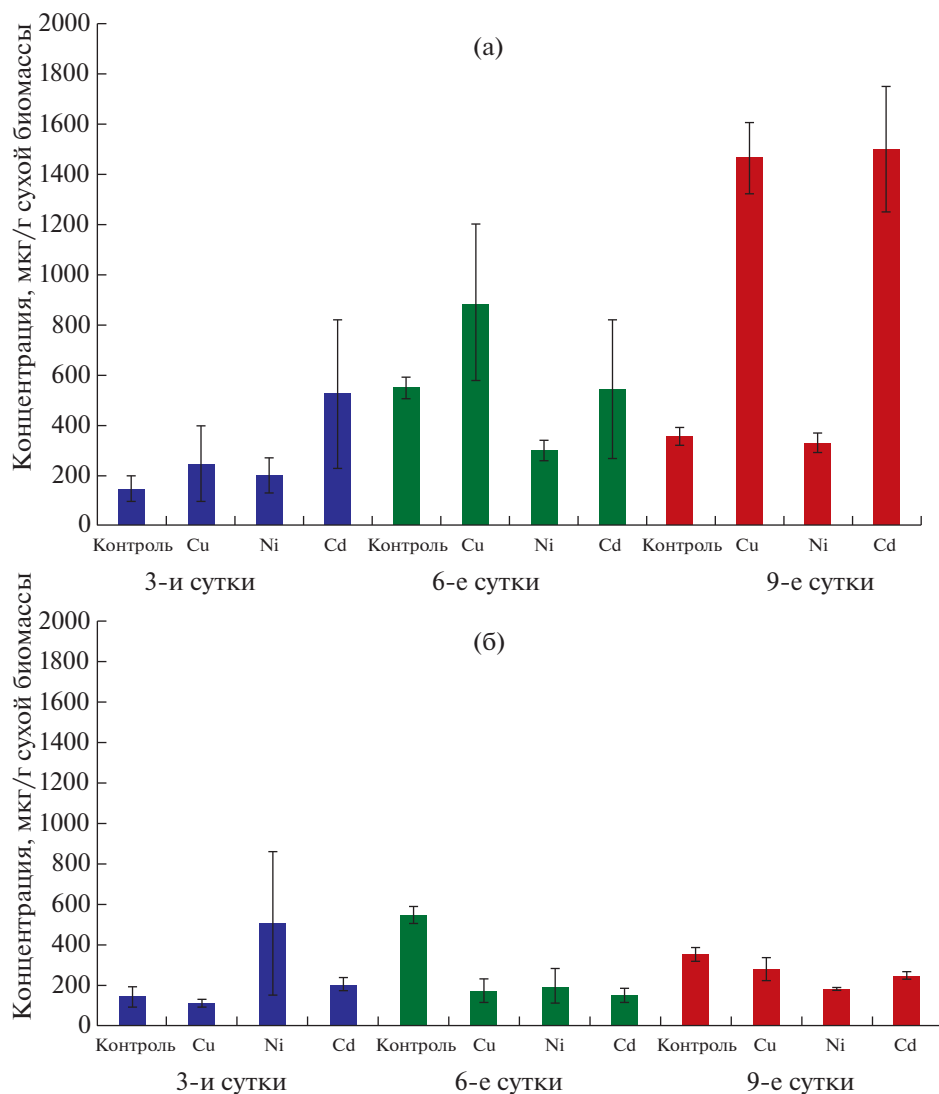


Рис. 4. Изменение содержания шикимовой кислоты в растениях *Pinus sylvestris* под действием металлов: а – 1 мМ; б – 5 мМ.

Fig. 4. Change in the shikimic acid content in *Pinus sylvestris* plants under the influence of metals: a – 1 mM; б – 5 mM.

Key: концентрация, мкг/г сухой биомассы – concentration, µg/g dry biomass; контроль – control; 3-и сутки – 3th day; 6-е сутки – 6th day; 9-е сутки – 9th day.

кислот (пролина и серина), углеводов (глюкоза, галактоза) и в меньшей степени хинной и шикимовой кислот.

Как было отмечено выше, концентрации многих метаболитов часто сильно различаются между образцами даже в пределах одной экспериментальной группы. Однако для некоторых соединений различия средних значений концентраций между опытными группами достоверно на уровне значимости 95% ($p = 0.05$). К таким соединениям относятся хинная, шикимовая, янтарная кислоты и аминокислота пролина, концентрационные изменения которых под действием металлов обсуждаются ниже.

На рисунках 4 и 5 показаны изменения концентраций хинной и шикимовой кислот под дей-

ствием металлов. На 3-и сутки появляется тенденция к увеличению концентраций в тканях растений этих кислот относительно контроля под действием 1 мМ Cd и Cu и тенденция к уменьшению содержания этих кислот при концентрации металлов 5 мМ. Значимые различия проявляются, начиная с 6-х суток после внесения металлов.

Действие Ni на метаболом сосны в низкой концентрации (1 мМ), в отличие от действия Cd и Cu, практически не связано с увеличением концентрации хинной и шикимовой кислот, а в высокой концентрации Ni стимулирует накопление этих кислот на 3-и сутки, но далее их содержание снижается.

Шикимовая и хинная кислота является промежуточными продуктами шикиматного пути,

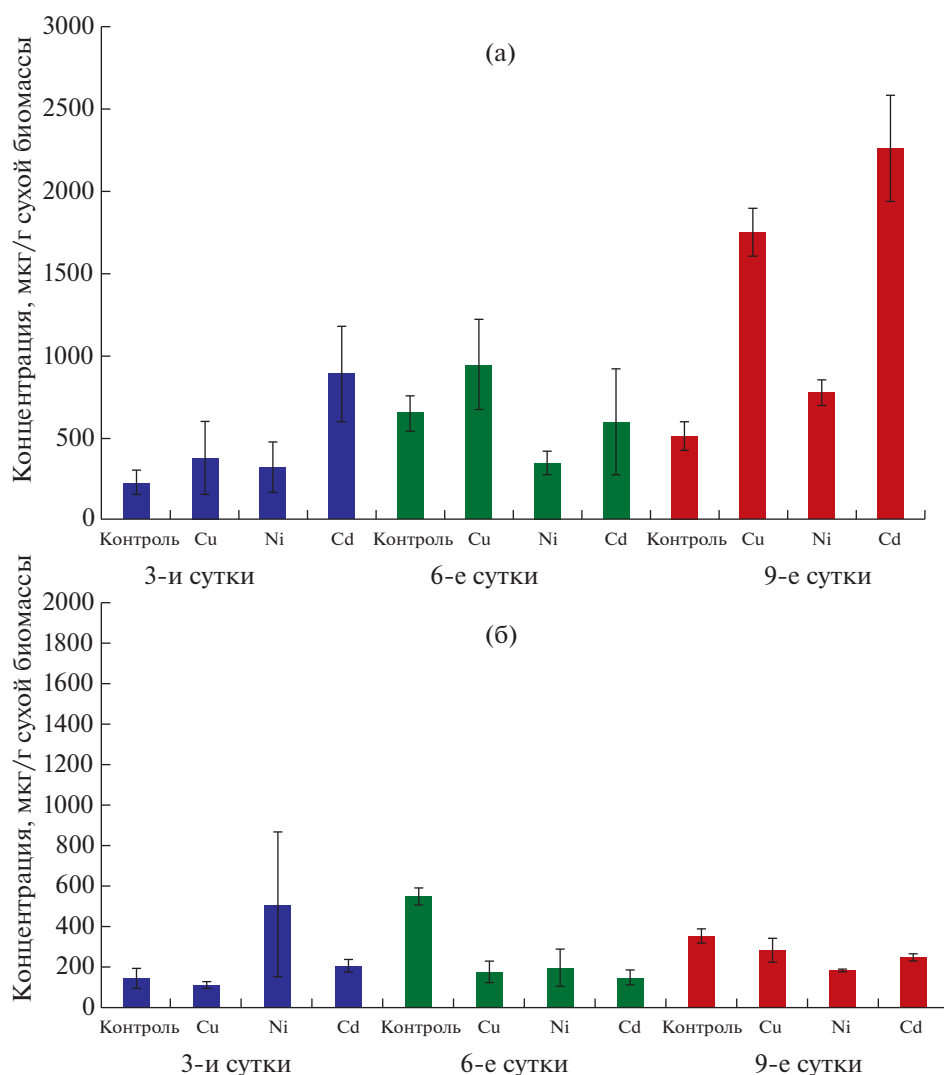


Рис. 5. Изменение содержания хинной кислоты в растениях *Pinus sylvestris* под действием металлов: а – 1 мМ; б – 5 мМ.

Fig. 5. Change in the quinic acid content in *Pinus sylvestris* plants under the influence of metals: а – 1 mM; б – 5 mM.

Key: концентрация, мкг/г сухой биомассы – concentration, $\mu\text{g/g}$ dry biomass; контроль – control; 3-и сутки – 3th day; 6-е сутки – 6th day; 9-е сутки – 9th day.

участвующего в биосинтезе фенольных соединений. По литературным данным, повышенное количество фенольных соединений в тканях растений наблюдали при воздействии различных стрессовых факторов. Это можно рассматривать как общую реакцию адаптации растений к стрессовым условиям и как стратегию запасания углеродных скелетов, в периоды, когда рост растений ограничен. Как именно стресс-индуцированный биосинтез фенольных соединений обуславливает адаптацию к стрессу является дискуссионным вопросом. Предполагается, что количество фенольных соединений возрастает в том случае, если фотосинтез ингибирован в меньшей степени, чем рост (Caretto et al., 2015).

Содержание янтарной кислоты колебалось в зависимости от времени воздействия, вида металла и его концентрации (рис. 6). Под действием Cd и Cu в обеих концентрациях содержание сукцината возрастало относительно контроля. Под действием Cu эти различия проявлялись на 6-е сутки, а под действием Cd – на 9-е сутки после внесения металла. Ni не оказывал достоверно значимого влияния на накопление в растениях сукцината.

Повышенное накопление низкомолекулярных органических кислот под действием тяжелых металлов является широко распространенным явлением, характерным для растений (Xie et al., 2014; Osmolovskaya et al., 2018). Способность кислот, таких как цитрат, малат, оксалат, малонат,

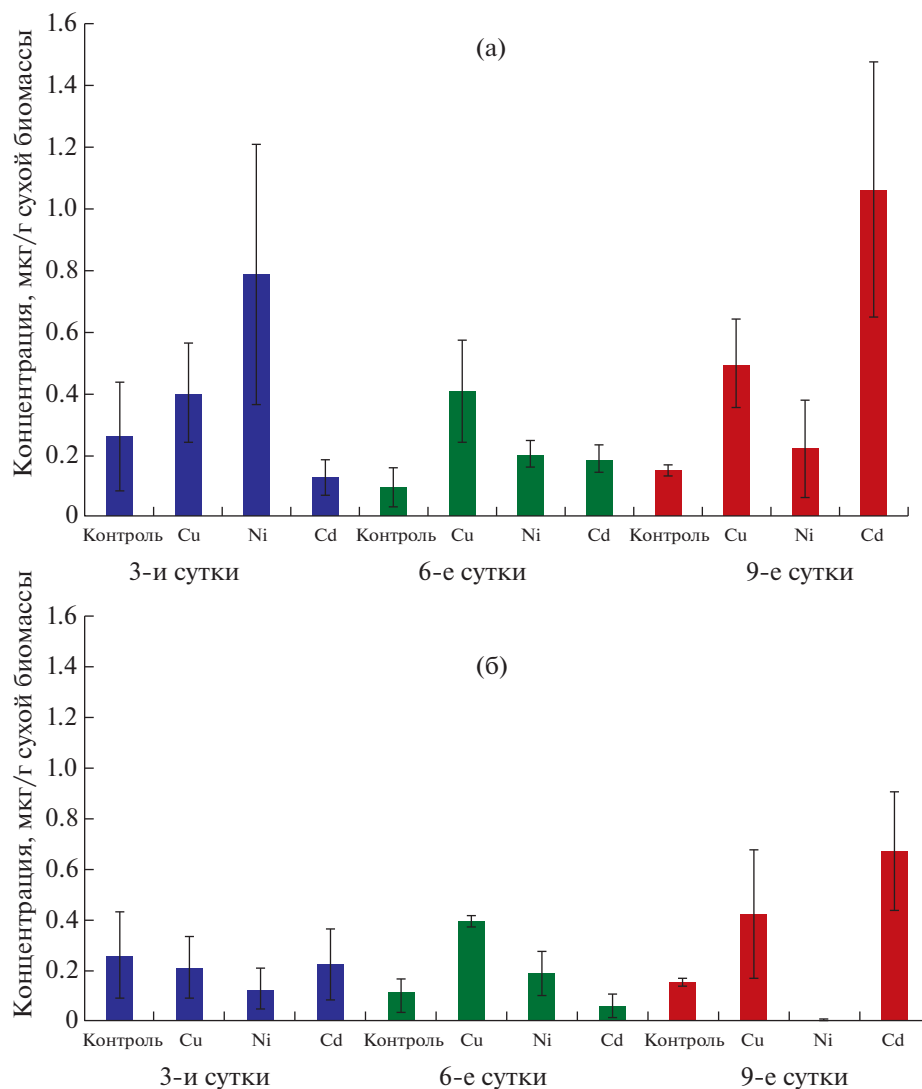


Рис. 6. Изменение содержания янтарной кислоты в растениях *Pinus sylvestris* под действием металлов: а – 1 мМ; б – 5 мМ.

Fig. 6. Change in the succinic acid content in *Pinus sylvestris* plants under the influence of metals: а – 1 mM; б – 5 mM.

Key: концентрация, мкг/г сухой биомассы – concentration, $\mu\text{g/g}$ dry biomass; контроль – control; 3-и сутки – 3th day; 6-е сутки – 6th day; 9-е сутки – 9th day.

аконитат и тартарат образовывать прочные связи с ионами тяжелых металлов приводит к их детоксикации (Anjum et al., 2015). В листьях амаранта *Amarantus cruentus* и *A. caudatus* наблюдается индуцируемое кадмием повышение содержания малата, цитрата и оксалата. Содержание сукцината возрастет только у *A. cruentus*, и, напротив, снижается у *A. caudatus* (Osmolovskaya et al., 2019). Результаты нашего эксперимента свидетельствуют

об изменении содержания только кислот в свободной форме и не позволяют сделать выводы о роли кислот в детоксикации металлов. Тем не менее, наблюдаемые изменения концентрации сукцината под действием меди и кадмия указывают на специфическое влияние этих металлов на углеродный метаболизм *P. sylvestris*.

Начиная с 6-х суток под действием металлов в растениях происходило накопление аминокислоты пролина. Cd и Cu способствовали увеличению содержания пролина в концентрации 5 мМ, а Ni – в концентрации 1 мМ (рис. 7). Повышение уровня пролина в ответ на воздействие тяжелых металлов описано для многих видов растений (Balestrasse et al., 2005; Sharma, Dietz, 2006; Sun et al.,

⁶ Осмоловская Н.Г., Ву В.З., Билова Т.Е., Кучаева Л.Н., Лыкова Т.Ю. 2019. Метаболомный подход в изучении устойчивости двух видов амаранта *Amaranthus caudatus* L. и *Amaranthus cruentus* L. к действию тяжелых металлов. – Тез. доклада на конференции “125 лет прикладной ботаники в России” 25–28 ноября 2019 г. СПб. С. 245–246.

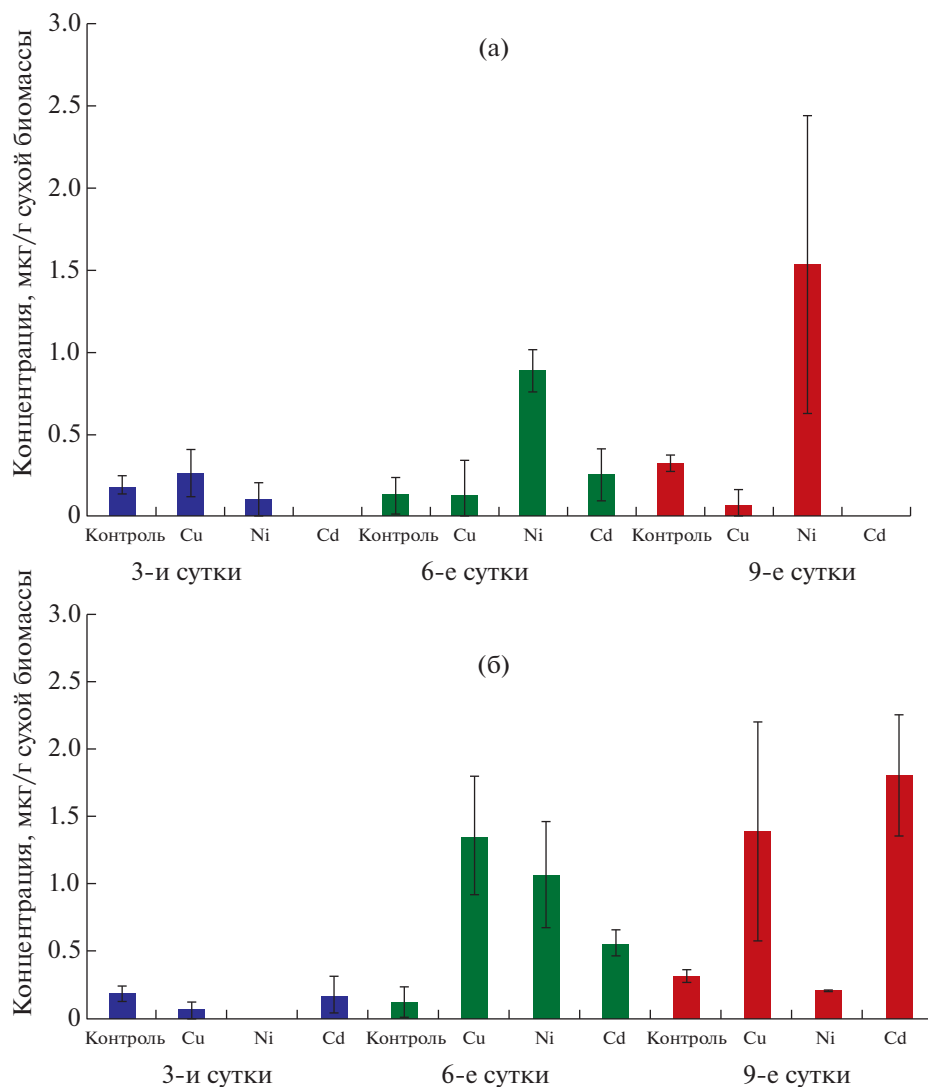


Рис. 7. Изменение содержания пролина в растениях *Pinus sylvestris* под действием металлов: а – 1 мМ; б – 5 мМ.

Fig. 7. Change in the proline content in *Pinus sylvestris* plants under the influence of metals: а – 1 mM; б – 5 mM.

Key: концентрация, мкг/г сухой биомассы – concentration, µg/g dry biomass; контроль – control; 3-и сутки – 3th day; 6-е сутки – 6th day; 9-е сутки – 9th day.

2007; Abdel-Latif, 2008), в том числе для *Pinus sylvestris* (Kandziora-Ciupa et al., 2016). У растений пролин составляет <5% от общего пула свободных аминокислот при нормальных условиях и 80% от общего пула аминокислот при стрессе (Kumar et al., 2010). Проллин играет важную роль в защите клеток от повреждения, вызванного АФК (Kartashov et al., 2008; Ivanov et al., 2013). Было высказано предположение, что эта аминокислота действует как акцептор радикалов или участвует в хелатировании ионов металлов (Andrade et al. 2009).

При анализе закономерностей концентрационных изменений других соединений (рис. 1) на уровне тенденций наши данные позволили выявить уменьшение содержания свободных жир-

ных кислот (пальмитиновой, линолевой, линоленовой, стеариновой) при действии всех металлов в обеих концентрациях. Влияние тяжелых металлов затрагивает метаболизм липидов и жирных кислот (Mogsy et al., 2012). Детальный же анализ изменения метаболизма липидов и жирных кислот требует специальных методологических подходов.

Под действием металлов существенно менялось содержание полиолов. Арабитол присутствовал только в контрольных образцах и в некоторых растениях, выращенных при действии Cd в концентрации 5 мМ. Содержание ононитола и мио-инозитола возрастало под действием всех металлов, но только на 9-е сутки воздействия. Увеличение содержания мио-инозитола под дей-

Таблица 2. Содержание тяжелых металлов в сеянцах *Pinus sylvestris*, мг/кг сухой массы
Table 2. Content of heavy metals in *Pinus sylvestris* seedlings, mg/kg dry weight

Вариант опыта/ Experiment variant	День экспозиции / Exposition day		
	3	6	9
	Ni		
Контроль/control	1.95 ± 0.08	3.31 ± 0.16	3.41 ± 0.19
Ni 1 mM	18.5 ± 0.51	72.2 ± 1.8	96.5 ± 2.89
Ni 5 mM	190 ± 5.72	558 ± 13.9	3168 ± 110
	Cu		
Контроль/control	5.26 ± 0.05	4.90 ± 0.09	5.25 ± 1.10
Cu 1 mM	6.26 ± 0.25	12.9 ± 0.51	25.5 ± 0.52
Cu 5 mM	170 ± 0.52	1058 ± 31.1	1879 ± 56.3
	Cd		
Контроль/control	<0.05	<0.05	<0.05
Cd 1 mM	4.32 ± 0.04	30.2 ± 0.60	60.5 ± 12.2
Cd 5 mM	80.4 ± 16.1	1827 ± 54.8	3911 ± 83.4

ствием металлов описано на примере некоторых растений (Osmolovskaya et al., 2019) и, по-видимому, связано с общим нарушением углеродного обмена у растений.

Для многих других соединений, в том числе неидентифицированных, не прослеживалось четких закономерностей концентрационных изменений под действием тяжелых металлов.

Изменения в метаболизме растений непосредственно связаны с поступлением и накоплением металлов в растениях (табл. 2). При концентрации металлов 5 мМ динамика их накопления была различна. Наиболее резкое увеличение концентрации Cd и Cu в вегетативной части растений наблюдается на 6-й день после внесения металлов: количество Cu возрастает более чем в 5 раз, а Cd в 20 раз по сравнению с 3-ми сутками. На 9-е сутки концентрация Cu и Cd возрастает лишь в 1.5–2.5 раза по сравнению с 6-ми сутками. Ni, напротив, накапливался более интенсивно на 9-е сутки, по сравнению с 6-ми. К 9-му дню эксперимента в наименьшей концентрации накапливается Cu, а в наибольшей Cd.

При внесении металлов в концентрации 1 мМ их поступление в ткани растения происходит более равномерно и в значительно меньших количествах. При данной концентрации наиболее интенсивно в вегетативную часть растения поступает Ni, а наименее интенсивно Cu.

Полученные результаты показывают, что ГХ-МС анализ с последующей обработкой метаболитной матрицы методами мультивариантной статистики позволяет выявить значительную

часть метаболомных изменений, происходящих под действием тяжелых металлов. Визуализированные динамические изменения метаболома растений обусловлены в основном не изменениями метаболизма отдельных веществ, а являются проявлением изменения корреляционной структуры метаболитной сети. Формирование ответных реакций на уровне метаболома заметно на 6-е сутки после воздействия металлов, как в высокой, так и в низкой концентрации и, по-видимому, не имеет прямой зависимости с количеством поступивших в растение металлов. Визуальные же симптомы токсичности появились на 10–12 день. Таким образом, метаболомный анализ позволяет зафиксировать биохимические изменения, возникающие на 4–6 дней раньше, чем визуальные симптомы токсичности. При этом контрольная группа растений обособляется раньше, а специфическое влияние отдельных металлов на метаболом растений заметно только на 9-е сутки. Первичные изменения метаболома под действием металлов являются скорее общими реакциями на стрессовое воздействие, а далее имеют место адаптивные изменения метаболизма в ответ на конкретные стрессовые факторы.

По-видимому, действие металлов затрагивает сходные пути метаболизма, что проявляется в общих закономерностях изменения концентраций определенных метаболитов. Тем не менее, следует отметить некоторую специфичность метаболомного ответа у растений в условиях токсического влияния отдельных тяжелых металлов. Влияние Cu и Cd проявлялось сходным образом на изменение концентраций хинной кислоты, шикимовой кислоты, янтарной кислоты и пролина, а влияние Ni заметно отличалось. Динамика поступления Ni в ткани растений также имела особенности: при высокой концентрации Ni медленнее поступает в ткани растения, чем Cu и Cd. Содержание Cu и Cd уже на 6-е сутки достигает значительных величин, что оказывает токсическое действие. Ni при дозе 5 мМ достигает таких концентраций только на 9-е сутки.

Сравнительный анализ дозозависимой специфичности влияния металлов показал, что, оба фактора (природа металла и его концентрация) вносят равнозначный вклад в кластеризацию метаболомов растений. Ответные же реакции растений на действие металлов, проявляющиеся в изменении концентраций отдельных метаболитов, существенно отличаются в зависимости от вносимой концентрации металлов (1 или 5 мМ). Выявленные различия могут являться косвенным свидетельством того, что при концентрации 1 мМ происходят адаптационные процессы, а при более высокой концентрации металлов – 5 мМ в растениях проявляются уже токсические реакции.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках плановых тем БИН РАН № АААА-А18-118032390136-5 и АААА-А19-119030690058-2. Статистическая модель метаболической сети разработана при поддержке гранта Президе-

дента РФ для молодых ученых МК-799.2021.1.4 “Метаболомика сообществ микроорганизмов литобионтных систем”.

Список литературы (см. References)

EFFECT OF HEAVY METALS ON METABOLOME OF *PINUS SYLVESTRIS* (PINACEAE)

K. V. Sazanova^{a,b,#}, N. V. Alekseeva-Popova^a, I. V. Drosdova^a, A. I. Belyaeva^a,
I. B. Kalimova^a, N. I. Pavlova^a, and A. L. Shavarda^{a,c}

^a Komarov Botanical Institute RAS

Prof. Popov Str., 2, St. Petersburg, 197376, Russia

^b St. Petersburg State University

Universitetskaya Emb., 7/9, St. Petersburg, 199034, Russia

^c St. Petersburg State University Research Park

Universitetskaya Emb., 7/9, St. Petersburg, 199034, Russia

#e-mail: Ksazanova@binran.ru

The effect of Cu, Ni and Cd on the metabolome of *Pinus sylvestris* was studied under experimental conditions, using gas chromatography-mass-spectrometry. Changes in the structure of the metabolic network of plants were detected on the 6th day after exposure to metals, 3–6 days before the manifestation of visual symptoms of toxicity. In this case, the control group of plants showed differences at the level of the metabolome earlier, and the specific effect of individual metals on the plant metabolome was noticeable only on the 9th day. Both factors (the nature of the metal and its concentration) make an equal contribution to the clustering of plant metabolomes. The responses of plants to the action of metals, manifested in changes in the concentrations of individual metabolites, differ significantly depending on the applied concentration of metals (1 or 5 mM) and on the nature of the metals: the features of the influence of Cd and Cu are manifested mainly in a similar way, while the effect of Ni is often different. The visualized dynamic changes in the metabolic matrix of plants are mainly not caused by a set of certain compounds, but are a manifestation of a change in its correlation structure.

Keywords: *Pinus sylvestris*, heavy metals, metabolome, stress, toxicity, adaptation

ACKNOWLEDGEMENTS

The study was carried out within the framework of the state assignments Nos. АААА-А18-118032390136-5 and АААА-А19-119030690058-2 of the Komarov Botanical Institute RAS. A statistical model of the metabolic network was developed with the support of the grant of the President of the Russian Federation for young scientists МК-799.2021.1.4 “Metabolomics of microorganism communities of lithobiontic systems”.

REFERENCES

- Abdel-Latif A. 2008. Cadmium induced changes in pigment content, ion uptake, proline content and phosphoenolpyruvate carboxylase activity in *Triticum Aestivum* seedlings. — Aust. J. Basic Appl. Sci. 2 (1): 57–62.
- Al-Khlaifat A., Al-Khashman O. 2007. Atmospheric heavy metal pollution in Aqaba city, Jordan, using *Phoenix dactylifera* L. leaves. — Atmos Environ. 41: 8891–8897. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.08.028>
- Andrade S.A.L., Gratão P.L., Schiavinato M.A., Silveira A.P., Azevedo R.A., Mazzafera P. 2009. Zn uptake, physiological response and stress attenuation in mycorrhizal jack bean growing in soil with increasing Zn concentrations. — Chemosphere. 75: 1363–1370. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.02.008>
- Anjum N.A., Hasanuzzaman M., Hossain M.A., Thangavel P., Roychoudhury A., Gill S.S., Rodrigo M.A.M., Adam V., Fujita M., Kizek R., Duarte A.C., Pereira E., Ahmad I. 2015. Jaks of metal/metalloid chelation trade in plants. An overview. — Frontiers in Plant Science. 6: 192. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00192>
- Balestrasse K.B., Gallego S.M., Benavides M.P., Tomaro M.L. 2005. Polyamines and proline are affected by cadmium stress in nodules and roots of soybean plants. — Plant Soil. 270: 343–353. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-1792-0>
- Bhalerao S.A., Sharma A.S., Poojari A.C. 2015. Toxicity of Nickel in Plants. — Int. J. Pure App. Biosci. 3 (2): 345–355.
- Caretto S., Linsalata V., Colella G., Mita G., Lattanzio V. 2015. Carbon Fluxes between Primary Metabolism and Phenolic Pathway in Plant Tissues under Stress. — Int. J. Mol. Sci. 16 (11): 26378–26394. <https://doi.org/10.3390/ijms161125967>

- Chen B., Stein A., Castell N., Gonzalez-Castanedo Y., Sanchez de la Campa A.M., de la Rosa J.D. 2016. Modeling and evaluation of urban pollution events of atmospheric heavy metals from large Cu-smelter. — *Sci. Total Environ.* 539: 17–25.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.117>
- Drozdova I.V., Alekseeva-Popova N.V., Beljaeva A.I., Kalimova I.B. 2014. Vliyanie medi, nikelya i kadmiya na rost i nekotorye fiziologicheskie parametry seyancev *Pinus sylvestris* i *Picea abies* (Pinaceae) [Effect of copper, nickel and cadmium on growth and some physiological parameters of seedlings *Pinus sylvestris* and *Picea abies* (Pinaceae)]. — *Rastitel'nye resursy.* 50 (4): 554–566 (In Russ.).
- Fiehn O. 2002. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. — *Plant molecular biology.* 48: 155–171.
<https://doi.org/10.1023/A:1013713905833>
- Guy C., Kaplan F., Kopka J., Selbig J., Hinch D.K. 2008. Metabolomics of temperature stress. — *Physiologia Plantarum.* 132: 220–235.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00999.x>
- Hassan M.U., Chattha M.U., Khan I. 2019. Nickel toxicity in plants: reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities – a review. — *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26: 12673–12688.
<https://doi.org/10.1007/s11356-019-04892-x>
- Ivanov Y.V., Savochkin Y.V., Kuznetsov V.V. 2011. Sosna obyknovennaya kak model'nyy ob'ekt dlya izucheniya adaptatsii khvoynykh k deystviyu tyazhelykh metallov. Izmenenie morfometricheskikh i fiziologicheskikh parametrov pri razvitiu seyantsev sosny v usloviyakh khronicheskogo deystviya tsinka [Scots pine as a model plant for studying the mechanisms of conifers adaptation to heavy metal action: 1. Effects of continuous zinc presence on morphometric and physiological characteristics of developing pine seedlings]. — *Fiziologiya rasteniy.* 58 (5): 728–736 (In Russ.).
- Ivanov Yu.V., Savochkin Yu.V., Kuznetsov A.V. 2013. Development of scots pine seedlings and functioning of antioxidant systems under the chronic action of lead ions. — *Biol. Bull.* 40 (1): 26–35.
- Kandziora-Ciupa M., Ciepał R., Nadgórska-Socha A. 2016. Accumulation of heavy metals and antioxidant responses in *Pinus sylvestris* L. needles in polluted and non-polluted sites. — *Ecotoxicology.* 25: 970–981.
<https://doi.org/10.1007/s10646-016-1654-6>
- Kaplan F., Kopka J., Haskell D.W., Zhao W., Schiller K.C. 2004. Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis*. — *Plant physiology.* 136: 4159–4168.
<https://doi.org/10.1104/pp.104.052142>
- Kartashov A.V., Radyukina N.L., Ivanov Yu.V., Pashkovskii P.P., Shevyakova N.I., Kuznetsov V.V. 2008. Role of antioxidant systems in wild plant adaptation to salt stress. — *Russ. J. Plant. Physiol.* 55 (4): 463–468.
- Kumar N., Pal M., Singh A., Kumar SaiRam R., Srivastava G.H. 2010. Exogenous proline alleviates oxidative stress vase life in rose (*Rosa hybrida* L. 'Grand Gala'). — *Sci. Hortic.* 127: 79–85.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.09.009>
- Kurilenko V.V., Zaiceva O.V., Novikova E.A., Osmolovskaya N.G., Ufimceva M.D. 2004. Osnovy ekogeologii, bioindikatsii i biotestirovaniya vodnykh ekosistem [Fundamentals of ecogeology, bioindication and biotesting of aquatic ecosystems]. St. Petersburg. 444 p. (In Russ.).
- Morsy A.A., Salama K.H.A., Kamel H.A., Mansour M.F. 2012. Effect of heavy metals on plasma membrane lipids and antioxidant enzymes of *Zygophyllum* species. — *Eurasian J. Biosci.* 6: 1–10.
<https://doi.org/10.5053/ejobios.2012.6.0.1>
- Nazar R., Iqbal N., Masood A., Khan M.I.R., Syeed S., Khan N.A. 2012. Cadmium toxicity in plants and role of mineral nutrients in its alleviation. — *American Journal of Plant Sciences.* 3: 1476–1489.
<https://doi.org/10.4236/ajps.2012.310178>
- Osmolovskaya N., Dung V.V., Kuchaeva L. 2018. The role of organic acids in heavy metal tolerance in plants. — *Bio. ComM.* 63 (1): 9–16.
<https://doi.org/10.21638/spbu03.2018.103>
- Osmolovskaya N.G., Vu V.D., Bilova T.E., Kuchaeva L.N., Lykova T.Yu. 2019. Metabolomnyy podkhod v izuchenii ustoychivosti dvukh vidov amaranta *Amaranthus caudatus* L. i *Amaranthus cruentus* L. k deystviyu tyazhelykh metallov [Metabolomic approach to the study of *Amaranthus caudatus* L. and *Amaranthus cruentus* L. tolerance to heavy metals]. — *Tezisy doklada na konferentsii "125 let prikladnoj botaniki v Rossii"* 25–28 noyabrya 2019 g. St. Petersburg. P. 245–246 (In Russ.).
- Pacyna J.M., Pacyna E.G. 2001. An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide. — *Environmental Reviews.* 9 (4): 269–298.
<https://doi.org/10.1139/a01-012>
- Pongrac P., Zhao F. J., Razinger J., Zrimec A., Regvar M. 2009. Physiological responses to Cd and Zn in two Cd/Zn hyperaccumulating *Thlaspi* species. — *Environ. Exp. Bot.* 66: 479–486.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.03.010>
- Rizhsky L., Liang H., Shuman J., Shulaev V., Davletova S. 2004. When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. — *Plant physiology.* 134: 1683–1696.
<https://doi.org/10.1104/pp.103.033431>
- Sawidis T., Breuste J., Mitrovic M., Pavlovic P., Tsigaridas K. 2011. Trees as bioindicator of heavy metal pollution in three European cities. — *Environ. Pollut.* 159 (12): 3560–3570.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.08.008>
- Sharma S.S., Dietz K.J. 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. — *J. Exp. Bot.* 57: 711–726.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erj073>
- Shulaev V., Cortes D., Miller G., Mittler R. 2008. Metabolomics for plant stress response. — *Physiologia Plantarum.* 132: 199–208.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01025.x>
- Singh R., Gautam N., Mishra A., Gupta R. 2011. Heavy metals and living systems: An overview. — *Indian J. Pharmacol.* 43 (3): 246–253.
<https://doi.org/10.4103/0253-7613.81505>
- Sun R.L., Zhou Q.Z., Sun F.H., Jin C.X. 2007. Antioxidative defense and proline/phytochelatin accumulation in

- a newly discovered Cd-hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. – Environ. Exp. Bot. 60: 468–476.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.01.004>
- Titov A.F., Kaznina N.M., Talanova V.V. 2014. Tyazhelye metally i rasteniya [Heavy metals and plants]. Petrozavodsk. 194 p. (In Russ.).
- Václavík P., Kmeťová M., Janiga M. 2016. Heavy metals and other elements in the *Pinus sylvestris* needles – Ružomberok. – Oecologia Montana. 25: 33–38.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M.M., Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. – Chemico-biological interactions. 160: 1–40.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Xie Y., Hu L., Du Z., Sun X., Amombo E., Fan J., Fu J. 2014. Effects of cadmium exposure on growth and metabolic profile of Bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers]. – PLOS ONE. 9 (12): e115279.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115279>
- Yarmishko V.T. 1997. Sosna obyknovennaya i atmosfernoe zagryaznenie na Evropejskom Severe [Scots pine and aerial pollution in the European North]. St. Petersburg. 210 p. (In Russ.).
- Zhao H., Shao Y., Yin Ch., Jiang Y., Li X. 2016. An index for estimating the potential metal pollution contribution to atmospheric particulate matter from road dust. – Sci. Total Environ. 550: 167–175.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.110>