

РОЛЬ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК КОРНЕЙ В ПОГЛОЩЕНИИ МЕДИ РАСТЕНИЯМИ ВИКИ НАРБОНСКОЙ

© 2021 г. Н.Р. Мейчик, Ю.И. Николаева, О.В. Никушин, М.А. Кушунина

Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119234, Москва, Ленинские горы, 1/12

E-mail: mkushunina@gmail.com

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.

После доработки 08.06.2020 г.

Принята к публикации 14.09.2020 г.

Проведен сравнительный анализ накопления меди корнями растений вики нарбонской (*Vicia narbonensis* L.) и изолированными из них клеточными стенками. Установлено, что основным местом накопления ионов меди у интактных растений является корневая система, а клеточные стенки корней характеризуются высоким содержанием карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты, что обуславливает их высокую связывающую способность в отношении ионов меди. Полученные результаты показывают, что основной стратегией защиты растений вики нарбонской от повышенных концентраций меди в окружающей среде является предотвращение накопления ионов этого металла в цитоплазме клеток корня путем депонирования их в клеточную стенку.

Ключевые слова: клеточная стенка, адсорбция, ионообменные группы, тяжелые металлы

DOI: 10.31857/S0006302921010154

В настоящее время загрязнение почв тяжелыми металлами (ТМ) является серьезной экологической проблемой. Для растений ТМ в высоких концентрациях становятся мощными ингибиторами жизненных процессов, вызывают множественные нарушения метаболизма, снижение продукционного потенциала и даже гибель. Избыток ТМ в растительных клетках вызывает широкий спектр токсических реакций: деструкцию клеточных мембран, нарушение организации цитоскелета и ингибирование ферментов и, как следствие, ингибирование процессов фотосинтеза, дыхания, клеточного деления, ионного транспорта и т.д. [1–3]. В то же время некоторые из ТМ являются необходимыми для жизнедеятельности растений элементами. Так, медь является микроэлементом для всех растений. В качестве кофактора она входит в состав многих ферментов и белков, таких как цитохромоксидаза электрон-транспортной цепи митохондрий, пластоцианин, некоторые формы супероксиддисмутаза.

Внутриклеточные защитные механизмы, реализуемые у растений в ответ на «металл-стресс» (Ме-стресс), широко изучаются и обсуждаются научным сообществом, и освещены в достаточном количестве обзоров [4, 5]. Многие исследова-

тели полагают, что в ответе на Ме-стресс внутриклеточные механизмы защиты играют главенствующую роль. Эти механизмы включают метаболическую инактивацию ионов ТМ путем их хелатирования и/или компартментализации в вакуоли [6]. Как правило, в подобном рода исследованиях растения помещают на среду с повышенной концентрацией металла и исследуют ответы растений на действие Ме-стресса, избавляясь каким-либо способом от клеточной стенки, чтобы устранить ее влияние.

В то же время проблема детоксикации меди в апопласте изучена недостаточно, хотя клеточная стенка (КС) клеток корня первой вступает в контакт с ионами ТМ почвенного раствора и является первым барьером на пути их проникновения в протопласт. Наличие у КС способности к связыванию ионов ТМ, зависящей от физико-химических свойств этого компартмента клетки, может быть движущей силой их поступления в корень из почвенного раствора и создавать конкуренцию поглощению симпластом, особенно при низких концентрациях металла [7, 8].

Для оценки роли апопласта корней в поглощении ТМ растениями используются различные методы, включая физико-химическое фракционирование ионов ТМ [7, 9], энергодисперсионную рентгеновскую спектроскопию [10], дифференциальное поглощение при разных температурах

Сокращения: ТМ — тяжелые металлы, Ме-стресс — металл-стресс, КС — клеточная стенка, ПГК — полигалактуроновая кислота.

[11] и метод сравнительной оценки поглощения металла корнями транспирирующих растений и выделенной из них КС при одинаковых условиях внешней среды [12].

Как было показано ранее, изолированная КС корней вики нарбонской характеризуется самым высоким содержанием карбоксильных групп в составе пектинов [13] по сравнению с другими бобовыми, однако роль КС в поглощении Cu^{2+} этими растениями не установлена.

Цель работы состояла в определении ионообменной способности клеточных стенок, изолированных из корней вики нарбонской, в отношении ионов меди при разных концентрациях металла в среде и в оценке роли апопласта в поглощении Cu^{2+} этими растениями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили растения вики нарбонской (*Vicia narbonesis* L.) сорта Sel2384. Растения выращивали в водной культуре в климатической камере (24°C, интенсивность света ~110 мкмоль/м²×с, 14-часовой световой день) при постоянной аэрации растворов и их замене каждые семь суток. В экспериментах использовали 9(10)-дневные растения, выращенные на растворе с низким содержанием элементов минерального питания (~0.2 мМ K^+ , NO_3^- и PO_4^{3-}) и 14(15)-дневные растения, выращенные на 0.1 среды Прянишникова (в мМ: NH_4NO_3 — 3.0, MgSO_4 — 0.5, KCl — 2.0, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 2.0, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 1.0, FeCl_3 — 0.15).

Выделение полимерного матрикса клеточных стенок. Проводили из интактных корней по описанному ранее методу [14]. Навески корней (~1 г) помещали в колбы и промывали последовательно 1%-м раствором NaOH (~0.3 л, в течение 24 ч, при постоянном перемешивании), H_2O (~2 л), 1%-м раствором HCl (~0.3 л, в течение 24 ч, при постоянном перемешивании) и дистиллированной водой до исчезновения в промывных водах хлорид-ионов. Затем определяли сырую и сухую (после высушивания при 60°C) массу препарата КС. Данный метод стандартизации, т.е. перевода всех имеющихся в структуре КС катионообменных групп в H^+ -форму, а анионообменных — в форму свободного амина, позволяет проводить сравнительное исследование сорбционных свойств ионообменных материалов с различной структурой функциональных групп [14, 15]. Долю сухой массы КС ($G_{\text{КС}}$) в сухой массе корней (%) определяли по формуле:

$$G_{\text{КС}} = (G_{\text{КС}}/G_{\text{к}}) \times 100, \quad (1)$$

где $G_{\text{к}}$ и $G_{\text{КС}}$, соответственно, сухая масса корней и выделенных из них КС, г.

Исследование ионогенных групп в составе клеточных стенок корней проводили методом потенциометрического титрования, как описано ранее [16], при постоянной ионной силе раствора (100 мМ), которую создавали добавлением NaCl . Число типов ионообменных групп в КС (j), а также их количество (ΔS^j) определяли по дифференциальным кривым ($dS_i/d\text{pH}_i$) = $f(\text{pH}_i)$, как описано ранее [16]. Степень ионизации (α_i) для каждой группы рассчитывали по формуле:

$$\alpha_i = S_i^j / \Delta S^j, \quad (2)$$

где S_i^j — количество диссоциированных групп j -го типа при pH_i .

Чтобы рассчитать константу ионизации для каждой ионообменной группы, использовали модифицированное Грегором уравнение Хендерсона—Хассельбаха:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + n \lg(\alpha/(1-\alpha)), \quad (3)$$

где $\text{p}K_a$ — кажущаяся константа ионизации ионообменной группы полимера, α — степень ее ионизации, n — константа, зависящая от строения полимерной матрицы и природы противоиона [17].

Используя установленные значения параметров (ΔS^j , $\text{p}K_a^j$, n^j), рассчитывали $S_i^{\text{рас}}$ по суммарному уравнению [16]:

$$S_i^{\text{рас}} = S_o^{\text{кат}} - \sum_{j,i=1}^{k,m} \frac{\Delta S^j}{1 + 10^{\frac{\text{p}K_a^j - \text{pH}_i}{n^j}}}, \quad (4)$$

где $S_i^{\text{рас}}$ — расчетное значение ионообменной способности КС при соответствующем значении pH_i ; $S_o^{\text{кат}}$ — максимальная катионообменная способность КС; ΔS^j — количество ионообменных групп j -го типа; $S_o^{\text{кат}}$, ΔS^j и $S_i^{\text{рас}}$ выражены в мкмоль/г сухой массы КС; $\text{p}K_a^j$ — кажущаяся константа ионизации ионообменных групп j -го типа; n^j — константа уравнения (3) для ионообменных групп j -го типа; k — число точек на потенциометрической кривой, m — число типов ионообменных групп.

Адекватность примененного подхода к описанию кислотно-основного равновесия оценивали методом регрессионного анализа, определяя параметры уравнения:

$$S_i^{\text{расч}} = B \times S_i^{\text{эксп}} + A, \quad (5)$$

где $S_i^{\text{расч}}$ и $S_i^{\text{эксп}}$ — рассчитанная по уравнению (4) и экспериментально определенная ионооб-

менная способность при соответствующем значении pH_i , мкмоль/г сухой массы КС; A и B – параметры регрессии.

Поглощение ионов меди транспирирующими растениями. Растения вики 9- или 14-дневного возраста, выращенные как указано выше, переносили в сосуды объемом 150 мл (по три растения в каждом сосуде) с растворами $CuCl_2$ с концентрацией 10, 50 или 100 мкМ ($pH\ 5.0 \pm 0.1$) и выдерживали в климатической камере 24 ч при непрерывной аэрации растворов (опытные растения). Контрольные растения выдерживали 24 ч на исходных питательных растворах без добавления $CuCl_2$ (концентрация $Cu^{2+} \leq 0.5$ мкМ).

По истечении 24 ч половину опытных и контрольных растений извлекали из раствора, разделяли на надземную часть и корни, взвешивали, а затем высушивали в термостате при температуре 60°C до постоянного веса, после чего определяли сухую массу частей растений и рассчитывали оводненность корней и надземной части (K_{H_2O}) по формуле:

$$K_{H_2O} = \frac{(m_{сыр} - m_{сух})}{m_{сух}}, \quad (6)$$

где $m_{сыр}$ и $m_{сух}$ – соответственно сырая и сухая масса (г) корней или побегов.

Затем сухие навески измельчали, помещали в фарфоровые тигли, смачивали концентрированной азотной кислотой и озоляли в муфельной печи при 420°C в течение 10–15 ч. Зола растворяли в концентрированной соляной кислоте, затем раствор разбавляли дистиллированной водой и определяли в нем концентрацию Cu^{2+} колориметрическим методом [18].

Другую половину опытных и контрольных растений использовали для выделения из корней клеточной стенки, как описано выше, при этом корни и полученные из них препараты КС не подвергали термообработке.

Поглощение ионов меди изолированными клеточными стенками. Препараты клеточных стенок, изолированных из корней трех опытных или контрольных растений вики 10- или 15-дневного возраста, переносили в сосуды объемом 150 мл с растворами $CuCl_2$ с концентрацией $CuCl_2$ 10, 50 или 100 мкМ, $pH\ 5.0 \pm 0.1$ и выдерживали в течение 24 ч при постоянном перемешивании. Затем образцы КС отделяли от раствора, определяли в нем концентрацию ионов Cu^{2+} и рассчитывали ионообменную способность КС по формуле:

$$S_{Cu} = \frac{(C_0 - C_i) \times V}{g}, \quad (7)$$

где S_{Cu} – сорбционная способность КС в отношении ионов Cu^{2+} , мкмоль/г сухой массы КС; C_0 и C_i – исходная и конечная концентрации Cu^{2+} в растворе, мМ; V – объем раствора, мл; g – сухая навеска образца КС, г.

Статистическая обработка данных. Опыты проводили в трех-шести биологических повторностях для каждой концентрации $CuCl_2$. Обработку данных проводили с помощью программ Microsoft Excel и IBM SPSS Statistics. Приведены средние значения и их стандартные отклонения или ошибки. Достоверность различий между изучаемыми показателями определяли с помощью двухвыборочного t -критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование ионогенных групп в составе клеточных стенок корней. Экспериментальные кривые потенциометрического титрования имели сложную полисигмоидную форму, что свидетельствует о наличии нескольких типов ионообменных групп в составе структурных полимеров КС. При $pH\ 10.8$ значения катионообменной способности КС по Na^+ достигали максимального уровня ($S_o^{кат}$, табл. 1). Это означает, что все ионогенные группы заняты Na^+ . $S_o^{кат}$ характеризует общее количество кислотных групп, которые имеются в полимерной структуре КС исследуемых растений. Эти группы могут включаться в реакции ионного обмена при соответствующих значениях pH среды. Следует отметить, что анионообменные группы, которые, как правило, обнаруживаются на потенциометрических кривых КС корней растений других видов [16], не выявлены у растений вики, что может быть обусловлено большим содержанием карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты в стенках, которые экранируют диссоциацию аминогрупп.

Расчеты кривых потенциометрического титрования препаратов изолированных КС свидетельствуют, что у растений 10- и 15-дневного возраста качественный (pK_a^j) и количественный (ΔS^j) состав ионообменных групп не отличаются (табл. 1), а также показывают, что рассчитанные (уравнение 4) значения полностью соответствуют полученным экспериментальным данным, о чем свидетельствуют величины коэффициентов корреляции (r^2) и коэффициенты регрессии B , близкие к единице (уравнение 5) и для 10-дневных ($B = 1.03$; $r^2 = 0.991$), и для 15-дневных ($B = 1.04$; $r^2 = 0.990$) растений.

Таблица 1. Параметры модифицированного Грегором уравнения Хендерсона–Хассельбаха (уравнение 3) для ионогенных групп в полимерном матриксе клеточных стенок корней растений вики разного возраста

Возраст растений, сутки	j	pK_a^j	n^j	$(r_{\text{согг}}^j)^2$	ΔS^j	$S_o^{\text{кат}}$
15	1	4.09 ± 0.04	1.08	0.996	600 ± 10	1620 ± 35
	2	7.40 ± 0.15	0.99	0.931	550 ± 11	
	3	10.0 ± 0.35	0.93	0.908	470 ± 14	
10	1	4.06 ± 0.03	1.27	0.997	610 ± 20	1645 ± 45
	2	7.26 ± 0.20	1.11	0.925	550 ± 10	
	3	10.3 ± 0.20	0.83	0.960	485 ± 15	

Примечание. j – Тип группы (1 – карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты, 2 – карбоксильные группы гидроксикоричных кислот, 3 – фенольные ОН-группы); $S_o^{\text{кат}}$ – суммарное количество катионообменных групп; n^j – константа уравнения (3); $(r_{\text{согг}}^j)^2$ – коэффициент корреляции зависимости $pH_i = f(\lg[\alpha_i/(1-\alpha_i)])$; ΔS^j – количество ионогенных групп j -го типа. $S_o^{\text{кат}}$, S^j выражены в мкмоль/г сухой массы клеточных стенок. Приведены средние значения трех биологических повторностей и их стандартные отклонения.

Ростовые характеристики растений при разных концентрациях меди в растворах. В исследуемом диапазоне концентраций ионов меди в растворе сухая масса корня и 10-, и 15-дневных растений не изменялась в ответ на увеличение концентрации меди в среде, при этом сухая масса побега десятидневных растений увеличивалась на 10% ($p < 0.05$, табл. 2). Токсическое действие меди на растения вики проявлялось только в изменении содержания воды: у 10-дневных растений этот показатель снижался как в корнях, так и в побегах, а у 15-дневных – только в надземной части (табл. 2). Массовая доля клеточной стенки корней достоверно различалась ($p < 0.05$) у 10- и

15-дневных контрольных растений и составляла 47.5 ± 0.4 и $51.8 \pm 1.6\%$, соответственно (табл. 3). Независимо от возраста растений значение этого показателя возрастало в ответ на присутствие меди в среде, при самой высокой обработке оно достигало 59.3 ± 2.2 и $61.7 \pm 0.3\%$ у 10- и 15-дневных растений соответственно.

Накопление Cu^{2+} в органах растений вики при различной концентрации Cu^{2+} в среде. С увеличением концентрации Cu^{2+} в среде от 10 до 100 мкМ содержание меди в корнях и 10-, и 15-дневных растений возрастало от 10 до 65 мкмоль/г сухой массы (табл. 4). При этом уже при 10 мкМ Cu^{2+} в

Таблица 2. Сухая масса корня и побега и содержание воды в органах ($K_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{корень}}$ и $K_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{побег}}$) растений вики разного возраста после 24 ч экспозиции на растворах с разной исходной концентрацией CuCl_2

Возраст растений, дни	C_{Cu} , мкМ	Сухая масса одного корня, мг	$K_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{корень}}$, г H_2O /г сухой массы	Сухая масса одного побега, мг	$K_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{побег}}$, г H_2O /г сухой массы
10	0.5 (контроль)	16.6 ± 0.9^a	15.7 ± 0.2^c	32.8 ± 1.2^g	11.1 ± 0.3^a
	10	18.6 ± 0.5^a	13.9 ± 0.2^d	41.6 ± 1.5^h	10.4 ± 0.4^{ab}
	50	17.1 ± 1.1^a	13.3 ± 0.1^d	38.2 ± 1.9^h	10.3 ± 0.3^{ab}
	100	16.5 ± 0.6^a	14.0 ± 0.2^d	38.7 ± 1.4^h	10.2 ± 0.2^b
15	0.5 (контроль)	26.4 ± 1.8^b	17.6 ± 0.3^f	56.2 ± 1.9^j	11.4 ± 0.1^a
	10	27.3 ± 1.4^b	17.0 ± 0.3^f	59.7 ± 2.3^j	11.0 ± 0.2^{ab}
	50	25.7 ± 4.3^b	16.6 ± 0.2^f	58.9 ± 5.5^j	10.8 ± 0.2^b
	100	29.1 ± 3.3^b	17.8 ± 0.4^f	63.0 ± 2.6^j	10.7 ± 0.1^b

Примечание. Приведены средние значения из трех-десяти биологических повторностей и их стандартные ошибки. Значения с одинаковыми буквами не отличаются в соответствии с t -критерием для независимых выборок с уровнем вероятности $p < 0.05$. Значения с разными буквами достоверно различаются при $p < 0.05$.

Таблица 3. Массовая доля (в %) клеточных стенок от сухой массы корней вики в зависимости от возраста растений и концентрации Cu в экспериментальном растворе

	C_{Cu} , мкМ	10-дневные растения	15-дневные растения
Контроль	1 (0.5 мкМ)	47.5 ± 0.4^a	51.8 ± 1.6^c
Опыт	2 (C_{Cu} 10 мкМ)	49.0 ± 0.6^a	58.3 ± 0.8^c
	2 (C_{Cu} 50 мкМ)	55.7 ± 1.4^b	56.0 ± 1.0^c
	2 (C_{Cu} 100 мкМ)	59.3 ± 2.2^b	61.7 ± 0.3^d

Примечание. Контроль — клеточную стенку выделяли из корней растений, которые не подвергались действию Cu^{2+} ; опыт — клеточную стенку выделяли из корней растений после 24 ч экспозиции на растворах с разной исходной концентрацией $CuCl_2$ (C_{Cu}). Приведены средние значения из трех (опытные растения) и пятнадцати (контрольные растения) биологических повторностей и их стандартные ошибки. Значения с одинаковыми буквами не отличаются в соответствии с t -критерием для независимых выборок с уровнем вероятности $p < 0.05$. Значения с разными буквами достоверно различаются при $p < 0.05$.

среде оно было почти в 40 раз больше по сравнению с содержанием Cu в корнях контрольных растений.

При всех обработках в надземных частях 10-дневных растений вики содержание меди также увеличивалось, однако отличия от контрольных растений были незначительными: при 100 мкМ Cu^{2+} в среде содержание меди в побегах было лишь в полтора раза больше по сравнению с побегами контрольных растений (табл. 4). У 15-дневных растений содержание меди в надземных органах опытных и контрольных растений было приблизительно одинаковым ($p < 0.05$) и составляло 0.574 ± 0.037 и $0.520 \pm$

± 0.060 мкмоль/г сухой массы побега соответственно.

Независимо от концентрации меди в растворе увеличение содержания меди в корнях было намного значительнее, чем в побегах (табл. 4). Эти результаты согласуются с известными данными о том, что большинство видов растений накапливают Cu в тканях корня с незначительной транслокацией в надземную часть [3, 19]. Отсутствие снижения массы корней и надземных органов по сравнению с контролем предполагает, что поглощенные за 24 ч ионы меди не оказывают значительного токсического действия на растения вики, хотя и наблюдается небольшое снижение оводненности тканей корня и побега (табл. 2).

Таблица 4. Содержание меди в корнях ($S_{Cu}^{корни}$) и побегах ($S_{Cu}^{побег}$) в зависимости от возраста растений и концентрации Cu^{2+} в растворе

Возраст, дни	C_{Cu} , мкМ	$S_{Cu}^{корни}$, мкмоль/г сухой массы корней	$S_{Cu}^{побег}$, мкмоль/г сухой массы побегов
10	0.5	1.57 ± 0.18	0.523 ± 0.030^c
	10	10.8 ± 0.3	0.604 ± 0.040^c
	50	39.1 ± 1.4	0.683 ± 0.071^d
	100	68.1 ± 3.4	0.798 ± 0.037^d
15	0.5	1.57 ± 0.18	0.529 ± 0.032^a
	10	9.71 ± 1.12	0.416 ± 0.023^b
	50	32.1 ± 3.45	0.652 ± 0.052^a
	100	65.7 ± 8.90	0.622 ± 0.042^a

Примечание. Приведены средние значения из трех-десяти биологических повторностей и их стандартные ошибки. Значения с одинаковыми буквами не отличаются в соответствии с t -критерием для независимых выборок с уровнем вероятности $p < 0.05$. Значения с разными буквами указывают на значительные различия с $p < 0.05$.

Таблица 5. Содержание меди в клеточной стенке, изолированной из корней 10- и 15-дневных растений вики в зависимости от концентрации Cu^{2+} в растворе

C_{Cu} , мкМ		$S_{\text{Cu}}^{\text{KC}}$, мкмоль/г сухой массы корня		$S_{\text{Cu}}^{\text{KC}}$, мкмоль/г сухой массы КС	
		10-дневные растения	15-дневные растения	10-дневные растения	15-дневные растения
10	1	19.8 ± 0.5	18.6 ± 2.0	41.3 ± 1.2	35.8 ± 4.2
	2	19.4 ± 0.6	15.5 ± 1.1	43.0 ± 2.3	27.7 ± 1.2
50	1	91.5 ± 4.8^a	85.1 ± 5.8	181 ± 7	165 ± 13
	2	120 ± 9^b	80.5 ± 8.5	188 ± 7	143 ± 14
100	1	130 ± 5^c	140 ± 4	285 ± 10	273 ± 5
	2	166 ± 6^d	156 ± 9	289 ± 16	253 ± 12

Примечание. $S_{\text{Cu}}^{\text{KC}}$ — содержание меди в клеточной стенке. 1 — Контроль, КС выделяли из корней растений, которые не подвергались действию Cu^{2+} ; 2 — опыт, КС выделяли из корней растений после Cu-обработки с разными начальными концентрациями Cu^{2+} в течение 24 ч. Приведены средние значения из трех-шести биологических повторностей и их стандартные ошибки. Значения с разными буквами указывают на достоверные различия в соответствии с t -критерием для независимых выборок с уровнем вероятности $p < 0.05$. Отсутствие букв — нет достоверных отличий между контролем и опытом ($p < 0.05$).

Связывание Cu^{2+} изолированными клеточными стенками при разной концентрации Cu^{2+} в среде. Сравнительный анализ адсорбирующей способности в отношении ионов меди КС, изолированных из контрольных и опытных растений, показывает, что у 15-дневных растений нет отличий в этом показателе (табл. 5) ни в расчете на единицу сухой массы корня, ни в расчете на единицу сухой массы КС. У 10-дневных растений при 10 мкМ Cu^{2+} в среде Cu-связывающая способность КС опытных растений не отличалась от значений для контрольных растений ($p < 0.05$, табл. 5), однако при повышении концентрации меди в растворе до 50 и 100 мкМ она увеличивалась в расчете на единицу сухой массы корня, но оставалась неизменной в расчете на единицу сухой массы КС.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В исследованном диапазоне концентраций медь не оказывает значительного ингибирующего действия на рост растений вики десяти- и пятнадцатидневного возраста, так как не наблюдалось снижения сухой массы как корней, так и побегов относительно контроля. Токсическое действие меди выражалось в некотором снижении содержания воды в корнях у 10-дневных растений и побегах у растений обоих возрастов. Следует также отметить, что в наших условиях эксперимента отсутствовали внешние проявления токсичности меди, которые наблюдали другие авторы (развитие межжилкового хлороза листьев,

коричневый цвет корней, угнетение роста корней и побегов) у родственного растения *Vigna unguiculata* при концентрации меди ≥ 1.7 мкМ [19]. Несомненно, известность данных и наших результатов о токсическом действии Cu^{2+} в определенных концентрационных пределах обусловлено разными условиями постановки эксперимента. Имеет значение не только концентрация меди в растворе, но и соотношение количества используемых растений к объему раствора, содержащего токсичный металл, а также продолжительность токсического действия Cu^{2+} . Так, например, авторы работы [19] использовали в эксперименте четыре проростка *V. unguiculata*, которые выращивали в течение 14 дней в сосуде, содержащем 21 л раствора с концентрацией Cu^{2+} 1.7 мкМ (C_{Cu}), при этом концентрацию меди поддерживали на постоянном уровне в течение всего эксперимента. Таким образом, токсическая нагрузка (объем раствора $\times C_{\text{Cu}}$ /количество растений) без учета продолжительности обработки составляла 9.5 мкмоль Cu^{2+} на одно растение. В наших экспериментах мы использовали три растения вики, объем раствора с концентрацией Cu^{2+} 10, 50 или 100 мкМ составлял 0.15 л, а начальная токсическая нагрузка на одно растение — 0.5, 2.5 или 5.0 мкмоль Cu^{2+} соответственно. При этом токсическая нагрузка не была постоянной и уменьшалась к концу опыта на 90–99%. Таким образом, в наших экспериментах начальная токсиче-

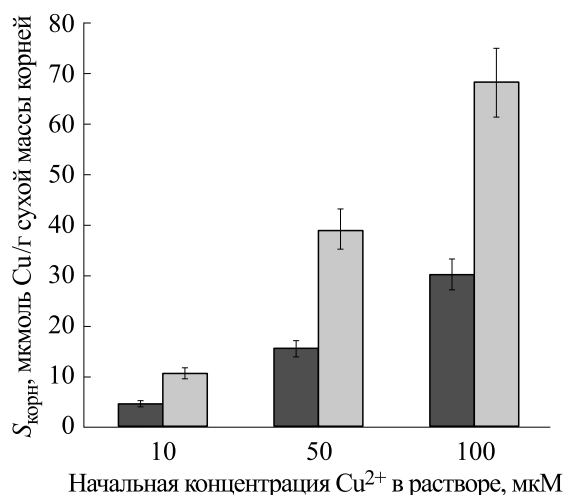


Рис. 1. Содержание меди в корнях ($S_{\text{корн}}$, мкмоль/г сухой массы корней) десятидневных растений вики при разных начальных концентрациях Cu^{2+} в растворе и разном количестве растений в эксперименте: темные столбики — семь растений; светлые столбики — три растения в объеме раствора 150 мл. Приведены средние значения из трех биологических повторностей и их стандартные ошибки.

ская нагрузка на одно растение даже при самой высокой концентрации меди была в два раза меньше, чем в цитированном выше исследовании.

Эксперименты с разным количеством растений вики подтверждают эти рассуждения (рис. 1). С увеличением количества растений, находящихся в одинаковом объеме раствора Cu^{2+} , от трех до семи уменьшается содержание металла в корнях во всем исследуемом дискретном концентрационном диапазоне, т.е. токсическое действие Cu^{2+} снижается. Так, при увеличении количества растений в 2.33 раза содержание меди в корнях уменьшилось приблизительно во столько же: в 2.23, 2.52 и 2.27 раза при концентрации Cu^{2+} в растворе 10, 50 и 100 мкМ соответственно.

Клеточные стенки корней растений *V. narboensis* характеризуются высоким содержанием карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты (табл. 1), что обуславливает их высокую связывающую способность в отношении ионов меди (табл. 5). Известно, что в КС растений имеется два типа сайтов связывания ионов меди: карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты (ПГК) и карбоксильные группы гидроксикоричных кислот [13]. Можно полагать, что у вики основным сайтом связывания меди являются карбоксильные группы ПГК, так как pK_a этих групп ниже, чем карбоксильных групп гидроксикоричных кислот (табл. 1), а количество адсорбированной в КС меди меньше, чем содержание карбоксильных групп ПГК. Расчеты показывают, что всего лишь 10% групп ПГК участвуют в свя-

зывании меди при 10 мкМ Cu в среде, а при 100 мкМ этот показатель возрастает до 90%.

Известно, что в ответ на избыток ТМ в среде растения могут реализовывать две стратегии изменения содержания и состава пектинов в КС корня. Первая из них заключается в увеличении массовой доли деметилированных пектинов в КС при воздействии таких ТМ, как Pb, Cd и Cu [20–22], а также алюминия [23]. Вторая, напротив, заключается в увеличении степени метилирования пектинов в КС в ответ на избыток металла в среде [20, 23]. В зависимости от вида, экотипа или сорта растения каждая из стратегий может являться либо механизмом устойчивости к воздействию ТМ, либо, наоборот, приводить к развитию Ме-стресса. Так, в клетках корней растений *Silene paradoxa* из устойчивой популяции в ответ на Cu-стресс было обнаружено усиление синтеза пектинов с высокой степенью метилирования. Формирование таких «исключающих» металл клеточных стенок является одним из факторов, гарантирующих низкое апопластное накопление меди и, вероятно, ограничивающих также и симпластное поглощение меди клетками корня [20]. Напротив, у *Elsholtzia splendens* возрастание доли деметилированных пектинов в КС корня являлось механизмом устойчивости к Ме-стрессу [24].

Ранее было показано, что у бобовых Cu-связывающая способность КС увеличивается или уменьшается в соответствии с содержанием в ней карбоксильных групп ПГК, которые являются основными сайтами связывания Cu^{2+} у этих растений [13]. На этом основании возможно полагать, что изменения Cu-связывающей способно-

сти КС в ответ на воздействие Cu^{2+} отражают различия в содержании карбоксильных групп ПГК и/или степени их метилирования между контрольными и обработанными Cu (опытными) растениями.

Тот факт, что в расчете на единицу сухой массы КС ее Cu -связывающая способность у опытных растений не изменяется по сравнению с контрольными, свидетельствует о том, что присутствие меди в среде в повышенной концентрации не приводит к изменению степени метилирования пектиновых полимеров. Однако увеличение Cu -связывающей способности КС в расчете на единицу сухой массы корня (табл. 5) при концентрации меди в растворе 50 мкМ, а также данные об увеличении массовой доли стенки в общей массе корня (табл. 3) дают основание полагать, что в корнях вики в ответ на действие Cu^{2+} стратегия защиты с участием КС обусловлена усилением в равной мере биосинтеза всех компонентов КС, в том числе и пектинов с таким же содержанием свободных карбоксильных групп, как у контрольных растений, так как Cu -связывающая способность КС в расчете на единицу ее сухой массы не изменяется (табл. 5). Такая же стратегия защиты была выявлена у растений маша (*Vigna radiata*) в аналогичных условиях эксперимента при ≥ 50 мкМ Cu^{2+} в среде [12].

Сравнительная оценка Cu -связывающей способности КС и корней растений показывает (табл. 4 и 5), что в исследуемом дискретном диапазоне концентраций Cu^{2+} изолированные КС корней связывают в два раза больше металла, чем корни интактных растений. Этот результат может быть обусловлен несколькими причинами: 1) некоторая часть Cu^{2+} проходит в побеги растений. В соответствии с результатами, действительно, при ≥ 50 мкМ Cu^{2+} в среде мы наблюдали некоторое увеличение в содержании Cu в надземной части опытных растений (в 1.2 (15-дневные растения) и в 1.5 раза (10-дневные растения, табл. 4) по сравнению с контрольными); 2) используемый в настоящей работе метод выделения КС приводит к получению препарата, в котором не нарушена архитектура полимерной сети [16], но значительно облегчена диффузия к ионообменным группам полимеров по сравнению с КС в интактном корне; 3) часть сайтов связывания металлов в КС в интактном корне может быть занята ионами Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} и т.д. [25], которые отсутствуют в препаратах изолированной стенки и экспериментальных растворах; 4) корни растений в присутствии повышенных концентраций тяжелых металлов могут выделять в среду органические хелаторы, главным образом, аминокислоты (гистидин, глутамин) и фитосидерофоры (производные мугеновой кислоты), образующие прочные комплексы с ионами меди [26], что может препят-

ствовать поглощению металла корнями растений.

Полученные нами данные об адсорбирующей способности изолированных КС (табл. 5), о сравнительной оценке Cu -связывающей способности КС и корней растений (табл. 4 и 5) дают нам основания полагать, что депонирование меди в КС корня является физиологическим ответом растений вики наarbonской на повышенные концентрации этого металла в окружающей среде, предотвращающим поступление ионов Cu^{2+} в симпласт корня, а на уровне целого растения — в надземные органы. Наши данные о преимущественной локализации Cu^{2+} в КС корня согласуются с результатами других авторов, которые использовали другие методы исследования и показали, что апопласт корней играет важную роль в поглощении и накоплении металлов как у чувствительных, так и у устойчивых видов растений. Так, например, используя физико-химическое фракционирование содержащегося в корнях Ni после экспозиции растений на растворах с избыточной концентрацией Ni , исследователи показали, что апопластное поглощение ответственно за 81.3–88.0% и 90.6–95.5% от общего поглощения корнями кукурузы и *Leptoplax emarginata* (гипернакопителя Ni) соответственно [9]. Более того, поскольку данные виды растений сильно различаются по способности к накоплению никеля, эти авторы полагают, что симпластное поглощение не является основным фактором гипернакопления. В работе [27] было показано, что депонирование Cu в КС у твердой пшеницы ответственно за 50–80% от общего поглощения Cu корнями. Аналогично, ~60% от общего количества Cu в корнях *Lolium multiflorum* и *Trifolium pratense* [7] было связано клеточными стенками. Однако некоторые исследования предполагают преобладающую роль внутриклеточных механизмов в поглощении и накоплении Cu и других ТМ [28, 29]. Например, было обнаружено, что Cu -связывающая способность корней пшеницы и томатов в 3.4 раза выше, чем у изолированных КС корня [29]. В данном случае Cu -связывающая способность КС могла быть недооценена из-за малой продолжительности поглощения металла (30 мин). Различия также могут обусловлены применением разных экспериментальных методов, а также видом и возрастом растений, количеством металла в растворе на одно растение, объемом раствора с токсичной концентрацией металла и т.д.

ВЫВОДЫ

Наши исследования показали, что КС корней растений *V. narbonensis* характеризуются высоким содержанием карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты, что обуславливает их высокую связывающую способность в отношении ионов

Cu^{2+} . Было установлено, что в исследованном диапазоне концентраций медь не оказывает токсического действия на рост растений десяти- и пятнадцатидневного возраста, так как не происходит снижения сухой биомассы ни корней, ни побегов относительно контроля. Токсическое действие меди проявляется только в некотором снижении оводненности, что свидетельствует о том, что накопление Cu в КС корней у вики может являться механизмом защиты от неблагоприятного воздействия этого металла. Основным местом накопления Cu в интактных растениях является корневая система. При этом содержание Cu в тканях корня зависит не только от концентрации металла в среде выращивания, но и от количества растений, используемых в экспериментах, из чего следует, что при оценке токсического действия металла на растительный организм важно принимать во внимание соотношение объема раствора к количеству растений.

Используемый в нашей работе подход к исследованию поглощения Cu растениями позволяет оценить вклад как вне- так и внутриклеточных механизмов накопления металла [12]. Однако в выбранных условиях эксперимента накопления меди в симпласте не было обнаружено даже при самой высокой концентрации этого металла в среде. Полученные нами данные об адсорбирующей способности изолированных КС дают нам основания полагать, что основной стратегией защиты растений вики нарбонской от повышенных концентраций меди в окружающей среде является предотвращение поступления ионов этого металла в клетку путем депонирования их в клеточные стенки корня, а также, возможно, выделения хелаторов в среду выращивания, что снижает поступление ионов меди в корни.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом МГУ имени М.В. Ломоносова для поддержки ведущих научных школ МГУ «Депозитарий живых систем Московского университета» в рамках Программы развития МГУ и выполнена в соответствии с НИР кафедры физиологии растений МГУ (№ АААА-А16-116021660106-0).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. Ouzounidou, M. Ciamporova, M. Moustakas, and S. Karataglis, *Env. Exp. Bot.* **35**, 167 (1995).
2. E. Gajewska, M. Sklodowska, M. Slaba, and J. Mazur, *Biol. Plant.* **50**, 653 (2006).
3. H. Lequeux, C. Hermans, S. Lutts, and N. Verbruggen, *Plant Physiol. Biochem.* **48**, 673 (2010).
4. J. L. Burkhead, K. A. Reynolds, S. E. Abdel-Ghany, et al., *New Phytol.* **182**, 799 (2009).
5. S. Klaumann, S. D. Nickolaus, S. H. Fürst, et al., *New Phytol.* **192**, 393 (2011).
6. J. L. Hall, *J. Exp. Bot.* **53**, 1 (2002).
7. K. Iwasaki, K. Sakurai, and E. Takahashi, *Soil Sci. Plant Nutr.* **36**, 431 (1990).
8. V. P. Kholodova, E. M. Ivanova, and V. V. Kuznetsov, in *Detoxification of Heavy Metals*, Ed. by I. Sherameti and A. Varma (Springer, Berlin, Heidelberg, 2011), pp. 143–167.
9. T. Redjala, T. Sterckeman, S. Skiker, and G. Echevarria, *Env. Exp. Bot.* **68**, 99 (2010).
10. P. M. Kopittke, N. W. Menzies, M. D. de Jonge, et al., *Plant Physiol.* **156**, 663 (2011).
11. F. J. Zhao, R. E. Hamon, E. Lombi, et al., *J. Exp. Bot.* **53**, 535 (2002).
12. N. Meychik, Y. Nikolaeva, M. Kushunina, and I. Yermakov, *Funct. Plant Biol.* **43**, 403 (2016).
13. N. Meychik, Y. Nikolaeva, M. Kushunina, and I. Yermakov, *Plant Soil.* **381**, 25 (2014).
14. N. R. Meychik and I. P. Yermakov, *Plant Soil.* **217**, 257 (1999).
15. Н. Р. Мейчик, С. И. Степанов и Ю. И. Николаева, *Журн. физ. хим.* **92**, 251 (2018).
16. N. R. Meychik and I. P. Yermakov, *Plant Soil.* **234**, 181 (2001).
17. Л. А. Шатаева, Н. Н. Кузнецова и Г. Е. Елькин, *Карбоксильные иониты в биологии* (Наука, Л., 1979).
18. З. Марченко, *Фотометрическое определение элементов* (Мир, М., 1971).
19. P. M. Kopittke and N. W. Menzies, *Plant Soil.* **279**, 287 (2006).
20. I. Colzi, M. Arnetoli, A. Gallo, et al., *Env. Exp. Bot.* **78**, 91 (2012).
21. L. Parrotta, G. Guerriero, K. Sergeant, et al., *Front. Plant Sci.* **6**, 1 (2015).
22. M. Wierzbicka, *Plant Sci.* **133**, 105 (1998).
23. D. Eticha, A. Stass, and W. J. Horst, *Plant Cell Env.* **28**, 1410 (2005).
24. T. Liu, C. Shen, Y. Wang, et al., *PLoS One* **9**, e109573 (2014).
25. H. Marschner, *Mineral nutrition of higher plants*, 2nd ed. (Acad. Press, London, 1995).
26. R. Qin, Y. Hirano, and I. Brunner, *Tree Physiol.* **27**, 313 (2007).
27. M. Bravin, B. Le Merrer, L. Denaix, et al., *Plant Soil.* **331**, 91 (2010).
28. D. Liu and I. Kottke, *Cell Biol. Toxicol.* **19**, 299 (2003).
29. S. Guigues, M. Bravin, C. Garnier, et al., *Plant Soil.* **381**, 367 (2014).

The Role of Physicochemical Properties of the Root Cell Walls in Copper Uptake by Narbon Vetch (*Vicia narbonensis* L.)

N.R. Meychik, Yu.I. Nikolaeva, O.V. Nikushin, and M.A. Kushunina

Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

The comparative analysis of copper accumulation in narbon vetch (*Vicia narbonensis* L.) roots and isolated root cell walls is presented. Our results demonstrate that intact plants accumulate Cu predominantly in the root system. The root cell walls are characterized by high content of polygalacturonic acid carboxyl groups, which determines their high Cu-binding capacity. We conclude that copper sequestration in the root cell walls is the main defense strategy employed by narbon vetch plants in response to Cu excess in the medium, which prevents Cu accumulation in the cytoplasm.

Keywords: cell wall, adsorption, ion-exchange groups, heavy metals