

ИЗМЕНЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ КОРНЕВЫХ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ ГОРОХА ПОСЕВНОГО ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ*

Я.В. Пухальский¹, С.И. Лоскутов², кандидат сельскохозяйственных наук, Н.И. Воробьев¹, М.А. Чукаева³, Д.О. Нагорнов³, кандидаты технических наук, А.И. Шапошников¹, Т.С. Азарова¹, А.П. Кожемяков¹, кандидаты биологических наук

¹Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии,
196608, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, 3
E-mail: puhalskyan@gmail.com

²Всероссийский НИИ пищевых добавок – филиал Федерального научного центра пищевых систем
им. В.М. Горбатова Российской академии наук,
191014, Санкт-Петербург, Литейный пр., 55

³Санкт-Петербургский горный университет,
199106, Санкт-Петербург, 21-я линия В.О., 2

Методом ВЭЖХ анализа проведена сравнительная оценка изменения качественных и количественных показателей биохимического состава низкомолекулярных корневых экзометаболитов у трех разных генотипов гороха посевного (SGE, SGECdt и Софья) на раннем этапе вегетации под влиянием внесения в среду токсичных концентраций тяжелых металлов в виде хлоридов (кадмия и/или кобальта – 4 мМ / 40 мМ). Загрязнение питательного субстрата солями тяжелых металлов вызвало увеличение суммарного выхода сахаров и аминокислот у генотипов SGE и SGECdt. У сорта Софья этот эффект проявлялся только в отношении сахаров. Статистически значимой разницы в общем выходе органических кислот между тремя генотипами не наблюдали. Кластерный анализ и анализ главных компонент выделил уникальный мутант гороха SGECdt на фоне других генотипов при совместном введении в питательную среду солей обоих тяжелых металлов. Фрактальный анализ степени структурированности корневой эксудации на примере наибольшей по числу входящих в нее компонентной фракции аминокислот, показал, что значения коэффициентов корреляции демонстрируют возрастание суммарной биомассы растений при уменьшении индексов биосистемной детерминированности. Наименьший показатель индекса консолидации растительной системы в отсутствие стресса выявлен у сорта Софья. Под воздействием ТМ величина этого показателя никак не менялась, что может указывать на стагнацию роста растения и переход его к состоянию близкому к анабиозу. Об этом же можно судить исходя из данных ингибирования роста у генотипа и снижения выхода аминокислот. В присутствии ТМ по отдельности индекс детерминированности на горохе SGE индивидуально снижался, а у мутанта SGECdt, наоборот, повышался. Совместное действие металлов на SGECdt было мультипликативным. По этим показателям можно судить о том, что растение затрачивает больше сил для привлечения потенциальной полезной микрофлоры с целью образования эффективного симбиоза и успешного противодействия металл-индуцированному стрессу.

EFFECT OF HEAVY METALS ON CHANGES IN THE BIOCHEMICAL PROFILE OF PEA ROOT EXUDATES

Puhalsky J.V.¹, Loskutov S.I.², Vorobyov N.I.¹, Shaposhnikov A.I.¹, Chukaeva M.A.³, Nagornov D.O.³, Azarova T.S.¹, Kozhemyakov A.P.¹

¹All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology,
196608, Sankt-Peterburg, Pushkin, sh. Podbel'skogo, 3
E-mail: puhalskyan@gmail.com

²VNIIPD – a branch of the Federal Scientific Center for Food Systems named after V.M. Gorbatova Russia Academy of Sciences,
191014, Sankt-Peterburg, Liteiny pr., 55

³Saint Petersburg Mining University,
199106, Sankt-Peterburg, 21-ya liniya V.O., 2

By HPLC analysis, a comparative assessment of changes in the qualitative and quantitative indicators of the biochemical composition of low molecular weight root exometabolites in three different genotypes of peas (SGE, SGECdt and Sofya) at an early stage of vegetation under the influence of introducing into the environment toxic concentrations of heavy metals in the form of chlorides (cadmium and/or cobalt – 4 мМ / 40 мМ). Contamination of the nutrient substrate with salts of heavy metals caused an increase in the total yield of sugars and amino acids in the SGE and SGECdt genotypes. In the variety Sofya, this effect was manifested only in relation to sugars. No statistically significant difference was found in the total yield of organic acids between the three genotypes. Cluster analysis and principal component analysis identified a unique pea mutant SGECdt against the background of other genotypes with the joint introduction of salts of both heavy metals into the nutrient medium. A fractal analysis of the degree of structuredness of root exudation, using the example of the largest fraction of amino acids in terms of the number of components included in it, showed that the values of the correlation coefficients demonstrate an increase in the total plant biomass with a decrease in the indices of biosystemic determination. The lowest indicator of the plant system consolidation index in the absence of stress was found in the variety Sofya. Under the influence of HM, this numerical value did not change in any way, which may indicate the stagnation of plant growth and the transition to a state close to anabiosis. This can also be judged from the data of growth inhibition in the genotype and a decrease in the yield of amino acids. In the presence of HMs individually, the index of determination on pea SGE individually decreased, while in the SGECdt mutant, on the contrary, it increased. The combined effect of metals on SGECdt was multiplicative.

*статья подготовлена в рамках выполнения Государственного Задания № FGEW-2021-0004: «Выделение, изучение и скрининг перспективных штаммов симбиотических, ассоциативных бактерий и грибов арбускулярной микоризы, для создания высокоэффективных и технологичных биопрепаратов широкого спектра действия и разработка подходов к созданию комбинированных биопрепаратов на основе геномного анализа и подбора штаммов, обладающих комплементарными наборами генов, ответственных за эффективное взаимодействие с растениями».

Based on these indicators, it can be judged that the plant spends more energy to attract potential beneficial microflora in order to form an effective symbiosis and successfully counter metal-induced stress.

Ключевые слова: *Pisum sativum L., SGECDt, металлы, корневые экзометаболиты, гидросветокультура, индекс биосистемной детерминированности.*

Key words: *Pisum sativum L., SGECDt, metals, root exometabolites, hydrolight culture, index of biosystemic determinism.*

В процессе своей жизнедеятельности корневая система растения постоянно выделяет в ризосферу различные органические соединения – экзометаболиты [1]. Интенсивность экссудации зависит от вида растения, фазы его развития и воздействия внешних биотических и/или абиотических стресс-факторов. Если в начальный период роста (10...20 дней) выход корневых выделений может составлять только 7...9 % от надземной биомассы растения, то за весь период вегетации он достигает 27...40 % от общего фотосинтетически фиксированного углерода и 15 % азота растений.

Обычно корневые экссудаты подразделяют на два класса: экзометаболиты с высокой молекулярной массой, которые содержат полисахариды и белки, и низкомолекулярные выделения. К основным классам низкомолекулярных экзометаболитов относят сахара, аминокислоты, органические кислоты, а также ароматические и фенольные соединения. Их поток в основном локализуется в меристематической верхушке корня (апексе), где отсутствие дифференцировки клеток способствует наилучшей диффузии экзометаболитов в ризосферу.

Известно, что существует тесная связь между корневыми экссудатами и микробным разнообразием [2, 3]. Сахара и органические кислоты служат конститутивными составляющими, которые постоянно присутствуют в ризосфере, потребляются микроорганизмами и служат детерминантами, влияющими на активность и смену микробных сукцессий в почве. Результаты недавних исследований свидетельствуют [4], что на основе запрограммированной динамической последовательности выделения корневых экссудатов *Avena barbata* определенного биохимического состава, в отсутствие эффектов почвенного матрикса, можно синхронизировать и прогнозировать последовательность сборки ризосферного генома.

Корневая экскреция способна улучшать минеральное питание растений [5] посредством подкисления ризосферы и усиления транслокации хелатных ионов микроэлементов из субстрата [6, 7, 8]. В промышленно развитых районах и на прилегающих к ним сельскохозяйственных территориях миграция этих микроэлементов может сопровождаться постепенным накоплением в культурах в высоких концентрациях. В таких случаях они начинают воздействовать на растения уже как тяжелые металлы (ТМ). В последние годы особое внимание уделяется избыточному накоплению кадмия (Cd^{2+}), как типичному их представителю первого класса опасности [9, 10]. Кроме того, к таким микроэлементам относится кобальт (Co^{2+}). По степени токсичности для почвы и растений этот поллютант принадлежит второму классу опасности [11]. Чаще всего загрязнение почв ТМ носит полиметаллический характер [12]. Механизмы совместного действия нескольких видов ТМ на растения еще недостаточно хорошо изучены, но исследования в этом направлении продолжают [13, 14]. Известно, что под воздействием ТМ растения усиливают синтез экзометаболитов корнями [15], что направлено на повышение иммобилизации поллютантов на агрегатных частицах почвенных коллоидов и образование трудно

усвояемых для растений комплексов. Однако отмечен и обратный эффект: выделение экссудатов может повышать растворимость и биодоступность ТМ в виде хелатов [16].

Среди сельскохозяйственных растений, бобовые культуры менее устойчивы к токсичным ионам ТМ, чем злаки. Сильное угнетение продукции биомассы у представителей семейства *Fabaceae* наблюдается даже в присутствии низких концентраций ионов Cd^{2+} . Показано, что растения гороха не переносят концентрации Cd^{2+} в среде выше 5 мкМ [17]. Однако эти культуры, обладая высоким симбиотическим потенциалом, способны образовывать множественные эффективные растительно-микробные ассоциации с разнообразным спектром полезных микроорганизмов, обитающих в почве, в частности, с клубеньковыми бактериями, грибами арбускулярной микоризы, а также ассоциативными рост-стимулирующими ризобактериями (plant growth-promoting rhizobacteria – PGPR), повышающими адаптационную лабильность организма их растения-хозяина – макросимбионта, путем улучшения его способности к усвоению труднодоступных форм минеральных элементов из субстрата [18].

Изучение влияния ТМ на процессы изменения в выделительной функции корневой симбиосистемы зернобобовых культур представляет высокий интерес, поскольку косвенно, они могут отражать изменения в биохимических процессах, происходящих внутри живого организма. Новизна подобных исследований заключается в том, что такой подход позволит уже на раннем этапе вегетации растений проводить генотипический скрининг исходного материала по устойчивости к воздействию металл-индуцированного стресса, не прибегая к разрушению живых тканей, при выращивании культур в условиях селекционного фитотрона (синерготрона). Кроме того, этот критерий позволит математически прогнозировать, как вариативность выхода фракций корневых экссудатов у разных растительных синузид может повлиять на запланированные мероприятия по биоремедиации (фитосанации) загрязненной территории с использованием микробных интродуцентов.

Цель исследования – изучение влияния моно- и биметаллического типа загрязнения питательного субстрата на изменение уровня фрактальной консолидации биосистемных компонентов профиля корневых экссудатов у контрастных по степени толерантности генотипов гороха.

Методика. Растительными объектами для исследования послужили Cd-чувствительный генотип гороха посевного сорта – SGE, а также уникальный Cd-устойчивый мутант SGECDt, созданный в результате мутагенеза этилметансульфонатом лабораторной линии SGE. Механизм устойчивости мутанта к Cd не связан с биосинтезом глутатиона и фитохелатинов. Биохимические исследования показали, что в присутствии токсичных ионов Cd (4 мкМ) мутант SGECDt проявлял дефицит содержания небелковых тиолов и свободного пролина, а также низкую активность каталазы и пероксидазы, по сравнению с растениями дикой линии [19]. Мутант также демонстрировал устойчивость к накоплению

токсических концентраций кобальта. Ключевая роль в толерантности принадлежала корням, поставляющим питательные вещества в надземные органы для поддержания гомеостаза и адаптации растений к токсическому действию ионов. Для сравнения в опыт также был включен коммерческий высокоурожайный сорт Софья, чувствительный к воздействию ТМ. На сегодня, это второй по распространенности в РФ сорт селекционного гороха с высоким содержанием белка (20,2...24,8 %) после сорта Фараон.

Как правило, чаще всего влияние ТМ на растительную экссудацию высших растений изучают в упрощенных гидропонных модельных системах, поскольку создание локальных стерильных условий в почве весьма трудоемкая задача [20]. Хотя результаты подобных исследований далеки от естественных, природных, гидропонные методы, наряду с *in vitro*, пригодны для первичного скрининга общих метаболических реакций устойчивости растений к различным загрязнителям [21]. Кроме того, благодаря отсутствию адсорбционного процесса, осуществляемого коллоидными частицами и агрегатами почвы, реакции обмена веществ протекают в таких условиях гораздо быстрее, по типу окисления/восстановления, что позволяет точнее проводить оценку корневых выделений. Поэтому свой эксперимент мы проводили в полипропиленовых гнотобиотических системах OS140BOX (Duchefa, Нидерланды), содержащих стерильный питательный раствор, приготовленный на основе дистиллированной воды. Состав питательного раствора был следующий: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (100 μM); $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ (600 μM); $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (300 μM); $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (100 μM); KCl (300 μM); KNO_3 (1000 μM); $\text{FeC}_2\text{H}_4\text{O}_6 \times 2.5\text{H}_2\text{O}$ (10 μM); H_3BO_3 (2 μM); MnSO_4 (4 μM); ZnSO_4 (3 μM); NaCl (6 μM); Na_2MoO_4 (0,06 μM); CuCl_2 (0,06 μM); NiCl_2 (0,06 μM); KJ (0,06 μM); KBr (0,06 μM); pH 6,5.

ТМ вводили в среду в виде водных растворов солей: CdCl_2 в концентрации 4 μM и/или CoCl_2 в концентрации 40 μM . Выбор концентраций исследуемых ТМ определялся по результатам предыдущих работ авторов. Анион солей был выбран также не случайно, поскольку на примере кадмия известно, что засоление хлоридами усиливает поглощение токсиканта растениями из почвенного раствора даже при очень низком его содержании. Параллельно изучали варианты с совместным внесением ТМ в питательный раствор.

Перед посевом семена скарифицировали и стерилизовали 0,5 %-ным гипохлоридом натрия в течение 10 мин. Затем их тщательно промывали в дистиллированной воде и проращивали на смоченной фильтровальной бумаге (Whatman #1) в темном термостате при 25 °С в течение 3 суток. Проклюнувшиеся семена в количестве 10 шт. высаживали на помещенные в сосуд стерильные сетки из нержавеющей стали, выполненные в виде П-образных мостиков. Эксперимент проводили в пятикратной аналитической повторности для каждого варианта.

Растения культивировали в климатической камере при светодиодном освещении в течение 10 дней до сбора экссудата. В качестве единственного источника инсоляции выступала фитопанель полного (Full) спектра SpecLED (Украина) на 120 Вт ($t = 26$ °С, $\varphi = 80$ %; фотопериодизм: 16/8 ч; $R_a = 98$; PPFD (ФАР) = 375,0/мкмоль·м⁻²·с⁻¹; 25000 Лк; ФАР = 109,1 Вт/м²). Световые показатели измеряли люксметром (Votcraft LX-1108, Германия) и спектрофотометром (OceanOptics STS-VIS, США). Перевод люксов в микромоли осуществляли по формуле для белого света [22].

За трое суток до окончания опыта сосуды проверяли на стерильность путем посева жидкости из сосуда в ламинарном боксе на питательной среде LB. После съема пять собранных растворов с экссудатами из каждого варианта фильтровали через мембранный фильтр диаметром 0,45 мкм (смесь эфиров целлюлозы, MF-MilliporeSigma®, США) и концентрировали в роторном вакуумном испарителе на водяной бане Heidolph Hei-VAP Precision (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Германия) до объема 10 мл. Рабочее давление составляло 69 мбар, скорость вращения колбы ...-160 об/мин, температура бани 45 °С. На следующем этапе концентраты пропускали через ионообменную смолу DOWEX 50WX8 фракции 100–200 (Sigma-Aldrich, Co., США) для разделения на две группы компонентов: 1) органические кислоты и сахара, 2) аминокислоты. Полученные фракции упаривали досуха в вакууме и растворяли в 1 мл воды Milli-Q. Такие образцы для последующего биохимического анализа хранили в морозильной камере при температуре ниже -19 °С.

Количественный состав сахаров, органических кислот и аминокислот в 1 мл свежеприготовленной пробы оценивали с использованием системы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) класса H (Waters ACQUITY UPLC, США). Сахара определяли рефрактометрически на детекторе 2414 (Waters, США), входящем в состав ВЭЖХ системы. Анализ проводили на колонке SUPELCOSIL LC-NH2 (5 мкм, 4,6 × 250 мм) (Supelco Gland, Швейцария) в смеси буфера с использованием 75 % ацетонитрила, при скорости потока 1 мл/мин и температуре 31 °С. Органические кислоты разделяли в 10 мМ ортофосфорной кислоте на колонке Waters ACQUITY CSH C18 (1,7 мкм, 2,1 × 75 мм) (Waters, США) при скорости потока 0,1 мл/мин и температуре колонки 24 °С. Детектирование проводили на фотодиодной матрице Acquity UPLC УФ (eLPSA) при длине волны 220 нм. Протеиногенные аминокислоты (кроме L-триптофана) анализировали методом Waters AccQ-Tag по рабочему протоколу с использованием флуоресцентного детектора (Waters, США). Количество L-триптофана определяли без дериватизации, путем разделения аминокислот на колонке Waters ACQUITY UPLC VEN RP18 Shield (1,7 мкм, 2,1 × 50 мм) (Waters, США) в смеси 0,1 % муравьиной кислоты (буфер А) и 75 % ацетонитрила с 0,1 % добавкой муравьиной кислоты (буфер Б). Градиент значений разбавления буфера Б при подаче в колонку варьировал от 1 до 18 % в течение первых 5 минут, затем возрастал до 80 % на 2 минуты при промывке колонки, и вновь снижался до уровня 1 % при кондиционировании в течение последних 3 минут анализа образца. Скорость потока составляла 0,3 мл/мин. Детектирование L-триптофана происходило с использованием флуоресцентного детектора при длине волн $\lambda = 280$ нм и $\lambda = 350$ нм. Стандартами для идентификации всех компонентов корневых экссудатов служили свежеприготовленные смеси сахаров, органических кислот и аминокислот.

Для определения аккумуляции подвижных ионов Cd^{2+} и Co^{2+} в различных частях растения (надземных и подземных органах) полученную биомассу высушивали, взвешивали и измельчали до порошкообразного состояния в агатовой ступке. Далее ее помещали во фторопластовый сосуд для разложения, добавляли 2,0 мл 70 %-ной концентрированной азотной кислоты (HNO_3), 2,0 мл 30 %-ного пероксида водорода (H_2O_2) и проводили мокрое озоление в системе разложения проб Digiblock ED36S (LabTech, Италия) в течение 4 ч при температуре 170 °С. Азотную кислоту, используемую

для разложения, предварительно очищали в системе очистки кислот subClean. Разложение и последующие операции проводили для двух одинаковых навесок анализируемой пробы. Одновременно готовили холостой раствор с использованием тех же самых реактивов. Полученные после терморазложения суспензии сливали в мерные полиэтиленовые сосуды на 50 мл, доводили до метки 25 мл дистиллированной водой и оставляли на сутки для лучшего осаждения. Содержание ТМ определяли в верхнем отобранном супернатанте методом атомно-эмиссионной спектромерии с индуктивно-связанной плазмой на ICPE-9000 (Shimadzu, Япония) и атомно-абсорбционной спектрометрии с электротермической атомизацией на AA-7000 (Shimadzu, Япония). По каждому элементу строили градуировочную характеристику, коэффициент корреляции в каждом случае составлял $R \geq 0.998$. Качество химико-аналитических измерений, проведенных в лаборатории, подтверждено анализом стандартной (контрольной) пробы (Стандартный образец состава листа березы ЛБ-1 (ГСО 8923-2007)).

Экспериментальные данные подвергли статистическому анализу с использованием программы R (версия 4.1.0). Изменение содержания органических кислот, сахаров и аминокислот в корневом экссудате с различным типом загрязнения ТМ анализировали методом дисперсионного анализа, основанного на преобразовании Бокса-Кокса. Критерий Шапиро-Уилка использовали для оценки нормальности распределения параметров количественных переменных. Взаимосвязь между разными генотипами по сухой биомассе оценивали с использованием методики ANOVA и критерия Тьюки с поправкой на множественные сравнения (поправка Бонферрони). Различия считали достоверными и признавали наличие связи между показателями на уровне вероятности, не превышающем 0,05.

Для визуализации данных и выявления сходства профилей количественного состава корневых экзосметаболитов у изучаемых генотипов гороха был проведен кластерный анализ с построением тепловой карты на основе матрицы корреляционных расстояний.

Индексы биосистемной детерминированности (I_F) экссудатов рассчитывали с помощью оригинальной авторской программы для ЭВМ. В качестве числовой группы для расчёта была выбрана фракция аминокислот, как наиболее многокомпонентная при детектировании на ВЭЖХ.

Фрактальная модель (*Fr1*) представляет собой последовательность чисел, убывающих по степенному закону

$$Fr1: 2^b, 2^b \cdot q^{-1}, 2^b \cdot q^{-2}, 2^b \cdot q^{-3}, \dots, 2^b \cdot q^{-N}, \quad (1)$$

где $q = 2^{(1-1/N)} \dots 2^{(1+1/N)}$; $b = -1 \dots 0$; $N = 3 \dots \infty$

В логарифмической форме фрактальная модель (*Fr2*) представляется арифметическим рядом чисел:

$$Fr2: b, -\log_2(q) + b, -2 \cdot \log_2(q) + b, -3 \cdot \log_2(q) + b, \dots, -N \cdot \log_2(q) + b, \quad (2)$$

где $\log_2(q) = 1 - 1/N \dots 1 + 1/N$; $b = -1 \dots 0$; $N = 3 \dots \infty$

Каждая числовая позиция фрактальных моделей *Fr1* и *Fr2* задает не абсолютную величину компонентов в биосистеме, а их статус по отношению к остальным. Это подчеркивает то, что при любом суммарном количестве компонентов в биосистеме, их процентные соотношения остаются неизменными.

Для расчета I_F исходные значения корневых экссудатов аминокислот преобразуются в молярные массы (г/моль) и аппроксимируются в виде числовой линейной зависимости:

$$Fr3: X_j(Y_j) = \frac{1}{N - I_F} \cdot \sum_{j=1}^{j=N} X_j Y_j - X_{CP} Y_{CP} \approx \frac{1}{N - I_F} \cdot \sum_{j=2}^{j=N} Y_j \quad (3)$$

a_m – коэффициент линейной аппроксимации расположения чисел в системном ряду убывания значений, изображающих члены ряда фрактальной модели.

Далее используя среднеквадратичное отклонение реальных количеств аминокислот от фрактальной модели *Fr3*, можно вычислить I_F экссудации аминокислот в ризосферу растений, исходя из следующей формулы:

$$I_F = \left(1 - \sqrt{\frac{1}{N-1} \cdot \sum_{j=2}^{j=N} d_j^2} \right) \cdot R, \quad (3)$$

где

$$d_j = X_j - a_m \cdot (Y_j - Y_{CP}) - X_{CP};$$

$$X_{CP} = \frac{1}{N} \cdot \sum_{j=1}^{j=N} X_j;$$

$$Y_{CP} = \frac{1}{N} \cdot \sum_{j=1}^{j=N} Y_j;$$

$$Y_j = \log_2(p_j/p_{max});$$

$$X_j = \text{дробная часть } \log_2(p_j/p_{max});$$

p_j, p_{max} – значение аминокислоты с номером (j) и аминокислоты, присутствующей в группе в максимальном количественном значении; a_{min} – коэффициент линейной аппроксимации фрактальной модели *Fr3*. N – общее число аминокислот. $R = N_M/N$ – корректирующий коэффициент. N_M – минимальное число позиций в ряду чисел фрактальной модели, полностью отображающих реальное соотношение функциональных групп аминокислот.

I_F может меняться в диапазоне от 0,0 до 1,0 со следующей градацией: 0,7...1,0 – высокий уровень; 0,3...0,7 – средний уровень; 0,0...0,3 – низкий уровень биоконсолидации компонентов в экссудатах. Равенство I_F нулю означает, что растение становится целиком зависимо от нестабильности внешних условий в конкретной почвенной среде, а генетический контроль за

Табл. 1. Сухая биомасса гороха посевного, выращенного на жидком питательном субстрате, обогащенном токсичными концентрациями тяжелых металлов, мг/растение *

Вариант	Побег	Корень	Целое растение
SGE	57,5 ± 2,7 ^a	29,0 ± 2,0 ^a	86,5 ± 4,3 ^a
SGE + Cd	27,9 ± 1,9 ^b	9,8 ± 0,6 ^b	37,7 ± 2,2 ^b
SGE + Co	26,7 ± 2,7 ^c	9,5 ± 0,5 ^c	36,2 ± 2,9 ^c
SGE + Cd + Co	31,3 ± 2,1 ^d	8,5 ± 0,4 ^d	39,8 ± 2,0 ^d
SGECDt	52,0 ± 1,4 ^a	21,3 ± 0,8 ^a	73,3 ± 1,9 ^a
SGECDt + Cd	35,5 ± 2,1 ^b	16,6 ± 1,2 ^b	52,1 ± 3,0 ^b
SGECDt + Co	45,0 ± 2,8 ^{ab}	11,2 ± 0,6 ^c	56,2 ± 2,8 ^c
SGECDt + Cd + Co	44,0 ± 2,0 ^{ac}	10,7 ± 0,6 ^d	54,7 ± 2,0 ^d
Софья	43,7 ± 2,7 ^a	36,8 ± 1,8 ^a	80,5 ± 3,2 ^a
Софья + Cd	30,6 ± 1,0 ^b	26,2 ± 2,8 ^b	56,8 ± 2,6 ^b
Софья + Co	13,3 ± 1,0 ^c	13,3 ± 0,9 ^c	26,7 ± 1,8 ^c
Софья + Cd + Co	16,0 ± 1,4 ^d	9,2 ± 0,6 ^d	25,2 ± 1,7 ^d

*указаны средние значения ± ошибки средних; a, b, c, d – уровень значений, значимо различающихся между собой ($p \leq 0,05$).

Табл. 2. Содержание токсичных концентраций ТМ в побегах и корнях растений на 10 сутки после посадки, мкг·г⁻¹ сухой биомассы*

Вариант	Побег			Корень		
	SGE	SGECDt	Софья	SGE	SGECDt	Софья
Cd						
4 мМ Cd	58,3±2,4 ^a	172,7±6,8 ^b	55,3±3,8 ^{ab}	348,3±11,7 ^a	865,3±22,7 ^b	543,3±6,0 ^c
4 мМ Cd + 40 мМ Co	76,0±5,2 ^a	204,2±6,1 ^b	67,6±3,8 ^{ab}	422,5±2,2 ^a	1273,1±29,2 ^b	560,8±13,8 ^c
Co						
40 мМ Co	246,3±6,8	258,7±18,9	208,3±14,2	1254,3±96,8	1379,1±89,0	1229,8±87,5
4 мМ Cd + 40 мМ Co	182,1±22,6	165,9±19,0	183,5±19,2	953,9±73,6	1217,0±24,4	1038,8±73,9

*указаны средние значения ± ошибки средних; a, b, c – уровень значений, значительно различающихся между собой (p < 0,05). Для вариантов кобальта различия не достоверны.

биохимическими процессами минимален. При I_r равном единице контроль за метаболизмом растения со стороны генома достигает максимального уровня, а влияние внешних факторов минимизировано. Это обеспечивает устойчивый гомеостаз и адаптационную лабильность растений. Однако их урожайность не будет превышать средне статистических значений.

Результаты и обсуждение. Анализ данных по сухой биомассе корней и побегов показал, что вне зависимости от характера загрязнения внесение солей ТМ приводило к ингибированию роста обоих органов (табл. 1).

Как и ожидалось, угнетение общей биомассы мутантного генотипа SGECDt проявлялось в меньшей степени, чем у двух других линий. Кроме того, у всех генотипов зафиксировано отсутствие проявления аддитивного негативного воздействия на развитие растений на раннем этапе роста при совместном (биметаллическом) стрессе, по сравнению с моноэлементным. Это может быть связано с тем, что суммарное влияние ТМ проходит независимо в два этапа: на раннем действует один, более подвижный токсикант, на последующем этапе онтогенеза, когда устанавливается динамическое равновесие системы, проявляется влияние второго. Однако такое предположение нуждается в апробации на практике при постановке более длительного эксперимента, что пока

ограничено объемом и высотой стерильных сосудов Duchefa. Тем не менее, в подтверждение этой гипотезы, можно выделить тот факт, что при совместном внесении ТМ, влияние Co²⁺ приводило к увеличению накопления Cd²⁺, а воздействие кадмия нивелировало накопление кобальта в растительной биомассе (табл. 2).

Похуже результаты уже отмечали ранее [23], когда после совместного введения кадмия и кобальта в почвенный раствор, ионы Co увеличивали концентрацию двухвалентного Cd в нем в 4...6 раз, а влияние Cd уменьшало содержание Co в среде не более чем в 1,5 раза.

Несмотря на то, что растения гороха относятся к культурам с С-3 типом метаболизма, соотношение сахаров к органическим кислотам у которых составляет 76:23, в контроле суммарно среди компонентного состава корневых выделений, у всех генотипов преобладала фракция органических кислот (рис. 1)

Достоверные различия в изменении суммарной эксудации органических кислот отмечены у генотипов Софья и SGECDt, по сравнению с линией SGE: в контроле в среднем в 2,0 раза (p < 0,05), в варианте с кадмием – в 2,6 раза (p < 0,05), с кобальтом – в 1,4 раза, с биелементным загрязнением – в 1,6 раза (p < 0,05). Различия в суммарном выходе сахаров у SGECDt, по сравнению с генотипами SGE и Софья, в среднем по варианту с

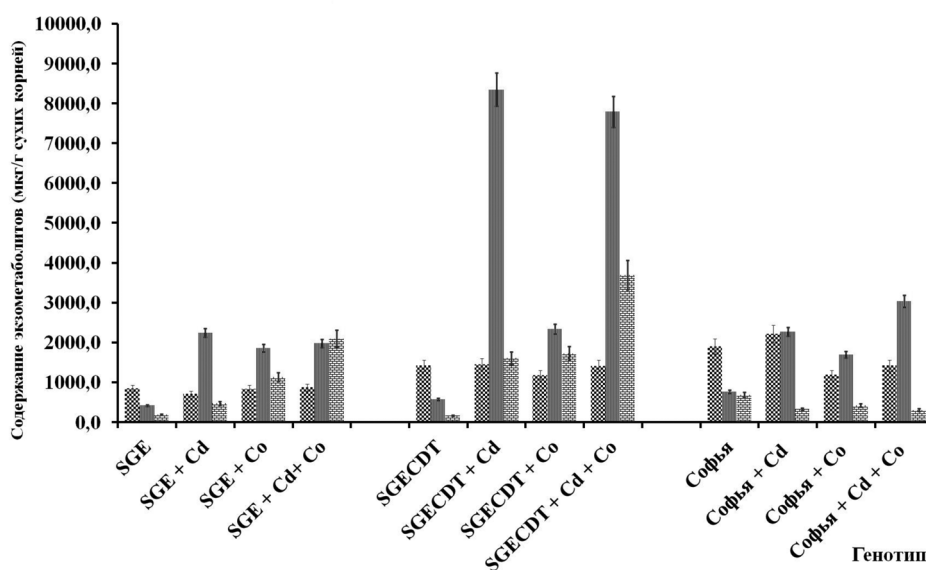


Рис. 1. Усредненные показатели фракционного состава корневых выделений у разных генотипов *Pisum sativum* выращенных на субстрате, обогащенном ТМ. Планки (бары) на столбцах обозначают ошибки средних: ▨ – органические кислоты; ■ – сахара; ▤ – аминокислоты.

кадмием были выше в 3,7 раза, с кобальтом – в 1,3 раза ($p < 0,05$), с Cd + Co – в 3,3 раза ($p < 0,05$). По суммарному выходу аминокислот мутант SGECdDt превосходил SGE в варианте с кадмием в 3,4 раза ($p < 0,05$), с кобальтом – в 1,5 раза ($p < 0,05$), с обоими ТМ – в 1,8 раза ($p < 0,05$), а сорт София – в 4,9 ($p < 0,01$), 4,1 ($p < 0,01$) и 12,0 раза ($p < 0,01$), соответственно. Загрязнение питательного раствора ТМ вызывало увеличение суммарного выхода сахаров и аминокислот у генотипов SGE и SGECdDt ($p < 0,05$). Особенно отчетливо, в сравнении с контролем, это проявлялось у мутанта при биметаллическом стрессе. У сорта София эффект от воздействия ТМ отмечали только на сахарах ($p < 0,05$). Статистически значимой разницы в общем выходе органических кислот между тремя генотипами не обнаружено.

Композиционный состав сахаров у всех сортов был одинаковым. Основной компонент углеводной фракции у генотипов София и SGE был представлен моносахаридом – фруктозой, доля выхода которой в среднем по вариантам опыта составила 84,7 %. SGECdDt характеризовался средним выходом фруктозы (22,8 %), в то время как на долю другого простого сахара – глюкозы приходилось в среднем 70,0 % (табл. 3). Воздействие двух металлов по отдельности или в сочетании приводило к резкому снижению количества выхода фруктозы у мутанта (с 47,0 % в контроле в среднем до 14,7 % при воздействии ТМ) и повышению концентрации глюкозы (с 26,1 % до 84,3 %). Глюкоза – промежуточное звено в процессе синтеза органических кислот, которые, присоединив аминокгруппу, превращаются в аминокислоты, предшественники фитогормонов-ауксинов. Это также согласуется с повышением общей доли уксусной кислоты в суммарном объеме органических кислот при воздействии ТМ с 3,4 % до 12,0 %, и восстановлением/снижением доли пировиноградной кислоты с 11,0 % до 4,2 %. Указанные соединения служат связующими

компонентами в биосинтезе гетероауксина (индолил-3-уксусной кислоты или ИУК), у генотипа SGECdDt. О повышении биосинтеза ИУК в растительных тканях также косвенно свидетельствует увеличение доли янтарной кислоты (с 8,9 % до 36,5 %), которая по своим физиологическим и биохимическим свойствам, активирует механизмы неспецифического ответа растений на стресс и служит миметиком салициловой кислоты. Последняя регуляторная сигнальная молекула также отнесена к группе фитогормонов. На основании приведенных данных можно судить о сопутствующем изменении в фитогормональном балансе мутантной линии, который способствует лучшему развитию растений в условиях металл-индуцированного стресса. Увеличение синтеза глюкозы у SGECdDt также может быть связано с тем, что этот фотоассимилянт менее необходим растению при наборе биомассы в условиях стресса, и, скорее всего, играет роль мобилизационного резерва для дальнейшей регуляции метаболических процессов. Так, в работе [24] результаты метаболомного профилирования на примере другого стресса (засухи) показали, что в растениях происходит накопление различных сахаров, в частности глюкозы и фруктозы, повышающих осмотический потенциал растительных клеток. В работе Киффера с соавт. [25], при выращивании молодых растений тополя (*Populus tremula* L.), в гидропонной культуре с добавлением токсичной концентрации кадмия в количестве 20 мкмоль, показано увеличение содержания углеводов в листьях растений в течение уже первых 14 суток. В работе Хиа с соавторами [26], связанной со сравнительным изучением двух генотипов *Synodon dactylon* (L.) Pers., отличающихся контрастной толерантностью к ионам кадмия, методом хромато-масс-спектрометрии также обнаружено повышение сахаров у обоих генотипов. Причем отличия были более ярко выражены у Cd-чувствительного генотипа WB144, чем

Табл. 3. Содержание сахаров в экзометаболитах изученных генотипов гороха, выращенных в гнотобиотических условиях в присутствии токсической концентрации ТМ, мкг/г сухих корней

Сахар	Вариант			
	контроль	CdCl ₂	CoCl ₂	CdCl ₂ + CoCl ₂
София				
Глюкоза	2,3±1,5	311,9±64,1	195,7±47,7	362,4±49,8
Фруктоза	688,5±60,6	1810,4±177,1	1441,8±134,3	2430,0±142,7
Рибоза	76,3±30,7	148,0±58,3	55,6±21,7	241,8±14,2
Σ	767,1±33,5	2270,3±194,6	1693,1±195,9	3034,2±142,8
Среднее	255,7±11,2	756,8±64,9	564,4±65,3	1011,4±47,6
SGE				
Глюкоза	45,1±3,7	208,6±22,8	240,8±5,5	217,8±5,3
Фруктоза	337,6±109,4	2004,5±344,7	1598,0±143,3	1732,0±67,8
Рибоза	40,1±1,7	32,6±7,2	19,9±2,2	27,9±6,0
Σ	422,8±109,3	2245,7±368,7	1858,7±140,5	1977,7±67,0
Среднее	140,9±36,4	748,6±122,9	619,6±46,8	659,2±22,3
SGECdDt				
Глюкоза	149,8±12,0	7800,7 ± 217,3	1616,4±168,5	7036,6±1028,1
Фруктоза	269,6±17,3	498,7±77,4	679,2±101,3	711,0±81,1
Рибоза	154,8±29,4	51,7±7,7	43,2±3,3	46,4±10,8
Σ	574,2±25,5	8351,1±197,4	2338,8±229,7	7794,0±1109,0
Среднее	191,4±8,5	2783,7±65,8	779,6±76,6	2598,0±369,7

у Cd-толерантного генотипа WB242. По аналогии эти результаты можно сравнить с нашими наблюдениями. Генотип SGECDt, как и WB242, рос лучше, чем генотип SGE, аналог WB144. Известно, что глюкоза играет важную роль не только в физиологических процессах развития растений, но и в устойчивости их к различным абиотическим стрессам [27]. Можно предположить, что благодаря увеличению выхода сахаров, у мутанта также активизируется фотосинтетическая активность.

Среди органических кислот в зависимости от сорта преобладали уксусная, молочная, янтарная, пировиноградная и пропионовая кислоты (табл. 4).

Как было отмечено ранее, у мутанта SGECDt воздействие ТМ приводило к увеличению доли выделения

янтарной и уксусной кислот в общей сумме органических кислот, а также снижение доли пировиноградной кислоты, по сравнению с контролем. У растений сорта Софья под влиянием Cd²⁺ доля лимонной кислоты в общей сумме выделенных органических кислот возрастала с 0,02 % до 10,9 %, щавелевой кислоты – с 0,2 % до 3,9 %.

Органические кислоты – наиболее известные низкомолекулярные комплексобразующие соединения, имеющими отрицательный заряд, у различных культур. Так, янтарная кислота, наряду с яблочной и уксусной, способна эффективно связывать ионы ТМ в ризосфере и повышать устойчивость растений к стрессу [28, 29]. Повышенная секреция органических кислот может из-

Табл. 4. Содержание органических кислот в экзометаболитах изученных генотипов гороха, выращенных в гнотобиотических условиях в присутствии токсической концентрации ТМ, мкг/г сухих корней

Органическая кислота	Вариант			
	контроль	CdCl ₂	CoCl ₂	CdCl ₂ + CoCl ₂
Софья				
Пироглутаминовая	202,7±25,4	173,1±73,3	52,0±27,3	77,4±32,3
Фумаровая	24,6±3,4	29,0±11,7	8,0±1,7	9,3±1,8
Уксусная	474,2±21,4	595,6±80,6	329,5±1,7	375,7±22,5
Молочная	563,0±97,7	569,5±194,5	216,2±96,3	409,5±34,5
Янтарный	85,2±31,2	31,9±12,1	15,9±3,4	5,6±2,9
t-аконитовая	18,0±3,2	31,3±5,3	6,3±1,9	9,1±2,3
Молочная	93,2±28,1	95,8±39,1	24,5±11,4	66,1±26,1
Пировиноградная	434,0±54,2	357,2±88,3	451,9±12,6	385,1±36,3
Лимонная	0,4±0,1	241,9±69,2	52,1±12,0	62,6±0,9
Щавелевая	3,8±1,0	85,6±16,8	28,2±3,8	19,9±4,5
Пропионовая	н/о*	н/о	н/о	н/о
Σ	1898,7±77,5	2210,9±65,9	1184,6±154,4	1420,3±113,0
Среднее	211,0±8,6	221,1±6,6	118,5±15,4	142,0±11,3
SGE				
Пироглутаминовая	141,0±11,6	114,8±11,7	120,0±11,0	113±19,3
Фумаровая	н/о	н/о	н/о	н/о
Уксусная	42,9±0,6	70,1±2,6	32,3±2,8	15,8±2,3
Молочная	161,8±9,9	180,0±24,9	150,0±17,9	173,0±25,7
Янтарный	14,7±2,3	34,6±6,7	20,2±3,2	17,3±1,0
t-аконитовая	0,3±0,1	0,2±0,1	0,3±0,1	0,6±0,2
Молочная	н/о	н/о	н/о	н/о
Пировиноградная	35,8±12,6	25,0±4,5	51,0±3,9	65,7±9,4
Лимонная	н/о	н/о	н/о	н/о
Щавелевая	н/о	н/о	н/о	н/о
Пропионовая	450,0±27,6	289,0±40,0	468,0±35,3	487,0±33,5
Σ	846,5±19,0	713,7±59,8	841,8±46,5	872,0±24,5
Среднее	120,9±2,7	102,0±9,3	120,3±9,5	124,6±6,7
SGECDt				
Пироглутаминовая	298,6±56,2	130,8±14,4	29,4±13,0	25,6±4,8
Фумаровая	15,0±2,1	2,4±0,4	1,2±0,6	0,2±0,1
Уксусная	48,1±4,7	81,8±2,2	96,7±4,6	314,4±10,5
Молочная	206,8±46,6	177,6±23,1	77,4±15,5	37,9±8,8
Янтарный	125,6±13,2	502,6±24,0	449,6±13,2	520,2±39,8
t-аконитовая	10,0±0,9	1,0±0,2	0,6±0,1	0,8±0,1
Молочная	н/о	н/о	н/о	н/о
Пировиноградная	155,4±7,2	71,6±5,9	62,3±3,4	32,9±2,0
Лимонная	н/о	н/о	н/о	н/о
Щавелевая	н/о	н/о	н/о	н/о
Пропионовая	557,4±16,4	484,9±36,3	465,0±14,2	483,8±33,7
Σ	1416,9±59,4	1452,7±39,2	1182,2±35,4	1415,7±33,4
Среднее	177,1±7,4	181,6±4,9	147,8±4,4	177,0±8,3

*н/о – не обнаружено

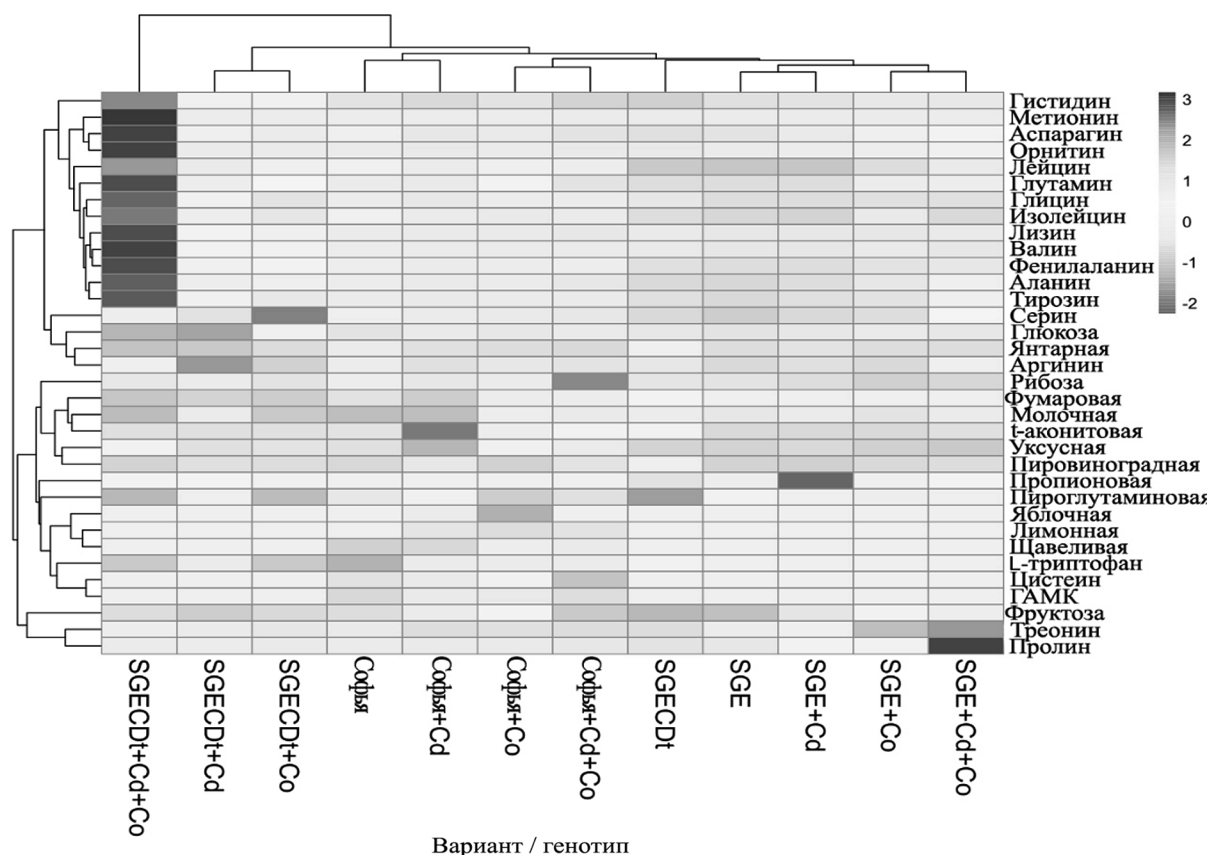


Рис. 2. Тепловая карта изменения корневых экссудатов у разных генотипов *Pisum sativum* при металл-индуцированном стрессе (темный цвет указывает на более высокую концентрацию каждого компонента, светлый – на более низкую).

менять уровень кислотности раствора, влияя на миграционный процесс (диффузию) и фитоэкстракцию ТМ в культуре. Увеличение выхода янтарной и уксусной кислот у мутанта SGECDt может быть одной из причин повышения аккумуляции кадмия в растительной биомассе.

Наименьшая по процентному выходу низкомолекулярных веществ, фракция аминокислот была представлена 20 протеиногенными аминокислотами (табл. 5). Биохимические тесты показали, что в процентном выражении, по отношению к контролю, воздействие ТМ в среднем в 3 раза увеличило выход аспарагина, в 6 раз – орнитина и в 14 раз – метионина. Известно, что последняя аминокислота участвует в адаптации растений к кадмиевому стрессу [30]. Среди экссудатов аминокислот мутанта SGECDt и дикой линии не удалось выявить цистеин и γ -аминомасляную кислоту. У сорта SGE также не был обнаружен L-триптофан, зато отмечен высокий выход пролина, как основной стрессовой аминокислоты.

Увеличение пула свободных аминокислот у мутанта SGECDt, вероятно, связано с отдельными аспектами детоксикации ТМ в тканях растений. Очевидно, что в равной степени это сопровождалось повышенным синтезом белков и других соединений в растении, в том числе фитогормонов. Этим можно объяснить более низкое ингибирование биомассы у мутанта и стимуляцию его роста, как механизма противодействия стрессу, связанного с эффектом разбавления токсиканта при нарастании биомассы растения. Кроме того, высокий уровень биодоступности накопления ТМ у мутанта

SGECDt – результат повышенной секреции аспарагиновой кислоты [28]. Напротив, снижение суммарного количества аминокислот у сорта Софья, вероятнее всего, обусловлено наибольшим уменьшением белковой биомассы при биметаллическом загрязнении среды, по сравнению с контролем.

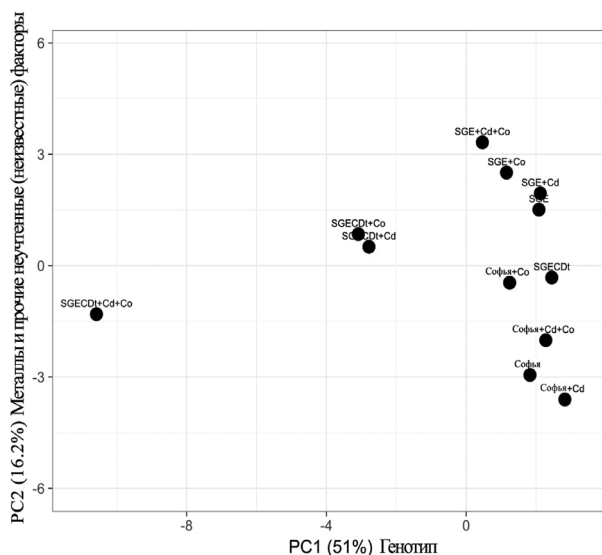


Рис. 3. Графическое представление данных анализа корневых экссудатов у различных генотипов *Pisum sativum* методом главных компонент.

Табл. 5. Содержание аминокислот (мкг/г сухих корней) в экзометаболитах изученных генотипов гороха, выращенных в гнотобиотических условиях в присутствии токсической концентрации ТМ*

Аминокислота	Вариант											
	Софья				SGE				SGECDt			
	контроль	CdCl ₂	CoCl ₂	CdCl ₂ + CoCl ₂	контроль	CdCl ₂	CoCl ₂	CdCl ₂ + CoCl ₂	контроль	CdCl ₂	CoCl ₂	CdCl ₂ + CoCl ₂
1	17,4±5,3	5,4±1,5	5,7±1,3	2,8±0,4	2,8±0,2	6,8±0,8	15,7±2,8	34,4±6,2	1,0±0,1	22,8±3,1	10,1±1,3	117,1±31,4
2	143,1±44,2	79,3±12,6	71,8±29,0	66,1±26,0	8,8±0,9	38,1±3,6	49,3±9,5	194,7±34,1	37,6±5,7	293,6±22,1	451,6±120,9	124,1±27,1
3	16,5±4,1	12,5±4,6	43,2±22,1	8,5±5,9	4,1±0,8	4,9±0,2	22,2±4,4	24,2±2,2	4,7±0,5	28,1±3,3	50,2±6,4	147,7±8,3
4	16,0±9,5	7,3±2,7	17,9±4,1	14,6±5,8	0,2±0,1	0,2±0,1	1,2±0,4	1,2±0,4	6,6±0,1	35,1±4,9	75,0±13,1	138,2±5,3
5	68,4±19,0	37,0±6,4	65,0±5,5	26,6±11,1	57,9±13,7	62,7±2,3	311,2±74,7	309,1±20,0	18,2±6,2	160,1±28,2	176,0±49,5	539,2±117,9
6	45,3±26,0	12,7±1,3	23,2±12,2	19,5±10,2	0,7±0,2	12,0±0,7	3,8±1,0	60,9±9,4	23,1±6,2	306,8±44,2	230,6±48,6	145,6±6,8
7	48,8±21,4	7,2±1,9	14,7±0,3	7,2±2,7	84,9±4,2	112,2±4,5	468,8±50,0	563,8±67,5	4,1±1,1	59,7±8,3	41,2±8,4	122,6±16,0
8	28,4±7,5	17,2±1,1	19,3±4,3	14,8±3,9	2,5±0,4	6,6±0,5	14,3±3,8	33,4±5,5	6,4±0,7	70,4±3,0	68,9±8,7	158,6±67,6
9	46,7±9,1	22,4±2,5	25,5±4,4	18,7±7,2	13,8±0,9	203,7±30,0	160,6±33,4	730,5±181,0	5,4±1,8	68,2±3,3	27,6±8,8	37,5±6,8
10	15,9±5,8	11,3±2,3	14,4±2,7	13,9±4,2	1,4±0,1	5,5±0,5	7,6±1,5	28,0±4,7	5,5±0,7	35,4±4,8	64,8±16,1	133,2±5,3
11	50,6±13,4	28,1±4,6	25,6±6,5	23,7±8,7	3,0±0,8	1,8±0,2	17,1±4,9	9,1±1,2	11,4±1,2	161,7±25,5	132,3±28,6	648,3±247,5
12	1,5±0,3	1,9±0,6	2,0±0,4	1,1±0,5	0,2±0,1	0,3±0,1	0,8±0,3	1,7±0,4	0,2±0,1	4,2±1,1	1,5±0,4	180,3±4,5
13	31,6±10,5	12,9±0,9	11,5±3,5	6,6±2,0	2,0±0,8	2,9±0,3	10,2±3,8	14,1±1,5	18,0±1,7	161,3±14,6	199,4±30,4	565,7±126,6
14	39,8±11,1	22,6±3,8	19,1±6,5	21,0±7,7	3,3±1,3	1,4±0,4	17,4±6,3	6,6±2,1	7,6±1,2	71,4±8,6	85,4±18,4	150,9±53,0
15	42,8±13,3	20,4±3,0	24,9±4,9	26,1±4,1	2,0±0,4	3,4±0,3	11,5±3,6	17,0±2,9	4,3±0,6	51,0±5,7	45,6±6,0	86,4±16,0
16	36,5±11,6	19,5±4,1	23,5±6,8	30,5±3,7	1,9±0,8	2,6±0,4	9,7±4,3	13,0±2,2	5,5±0,7	75,4±9,7	58,4±7,4	209,4±85,6
17	4,8±0,7	1,2±0,1	1,2±0,6	3,0±0,1	н/о	н/о	н/о	н/о	1,7±0,1	1,4±0,1	0,1±0,1	0,1±0,1
18	1,5±0,3	0,4±0,1	1,7±0,5	0,5±0,1	2,6 ± 0,6	11,1±1,0	14,6±4,6	56,5 ± 9,9	0,5±0,1	1,6±0,4	5,1±1,0	192,7±1,4
19	7,7±4,0	3,2±0,8	4,8±0,2	1,3±0,2	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
20	19,3±3,4	3,5±0,4	4,3±0,2	1,8±0,9	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
Σ	682,6±198,1	326,0±54,4	419,3±53,8	308,3±84,9	192,1±17,8	476,2±33,5	1136,0±108,6	2098,2±327,2	161,5±9,8	1608,2±98,6	1723,5±207,8	3697,8±674,7
Π	34,1±9,9	16,3±2,7	21,0±2,7	15,4±4,2	11,3±1,0	28,0±2,0	66,8±6,4	123,4±19,1	9,0±0,5	86,0±5,5	95,5±11,5	205,4±37,5

*н/о – не обнаружено; Π – среднее; 1 – Аспарагин; 2 – Серин; 3 – Глутамин; 4 – Глицин; 5 – Гистидин; 6 – Аргинин; 7 – Треонин; 8 – Аланин; 9 – Пролин; 10 – Тирозин; 11 – Валин; 12 – Метионин; 13 – Лизин; 14 – Изолейцин; 15 – Лейцин; 16 – Фенилаланин; 17 – L-триптофан; 18 – Орнитин; 19 – Цистеин; 20 – γ-аминоасляная кислота (ГАМК).

Анализ тепловой карты (рис. 2), построенной на основе матрицы корреляционных расстояний свидетельствует, что состав корневых экзометаболитов мутанта SGECDt образует при введении в питательную среду двух ТМ отдельный гомогенный кластер. У остальных генотипов по вариантам отмечено близкое сходство полученных данных.

Анализ главных компонент корневых экссудатов свидетельствует о значительном сдвиге координаты точки мутанта SGECDt в математическом пространстве. В

Табл. 6. Дисперсионный анализ экссудации низкомолекулярных веществ различных генотипов *Pisum sativum* при внесении в среду ТМ

Фактор	F	p
Сахара		
Генотип	1,184	0,323
ТМ	0,988	0,415
Генотип x ТМ	0,336	0,911
Органические кислоты		
Генотип	0,888	0,415
ТМ	0,263	0,852
Генотип x ТМ	0,222	0,969
Аминокислоты		
Генотип	11,897	< 0,001***
ТМ	9,352	< 0,001***
Генотип x ТМ	3,980	< 0,001***

***порог статистической значимости, ниже которого наблюдаемая разница между группами может считаться достоверной.

двумерной проекции, генотип играл более важную роль в распределении выхода корневых выделений растения, нежели внешнее воздействие поллютантов (рис. 3).

Результаты двухфакторного ANOVA-анализа и теста Tukey HSD при p < 0,05 показали наличие высоких

Табл. 7. Индексы биокооперации аминокислотного профиля корневых выделений различных генотипов *Pisum sativum* при внесении в среду ТМ

Вариант / генотип	I _F	r*
SGE	0,39±0,01	
SGE + Cd	0,34±0,01	0,49
SGE + Co	0,36±0,01	
SGE + Cd + Co	0,37±0,01	
SGECDt	0,31±0,01	
SGECDt + Cd	0,37±0,01	-0,38
SGECDt + Co	0,39±0,01	
SGECDt + Cd + Co	0,38±0,01	
Софья	0,29±0,01	
Софья + Cd	0,29±0,01	-0,53
Софья + Co	0,29±0,01	
Софья + Cd + Co	0,29±0,01	

*коэффициенты корреляции между индексом детерминированности экссудации аминокислот I_F и суммарной сухой массой растений по вариантам опыта.

статистически значимых ($p < 0,001$) различий в экскреции аминокислот корнями между вариантами (табл. 6). Наиболее отчетливо это проявилось при моно- или биметаллической интродукции токсикантов на мутанте SGECdt.

Анализ расчетных I_F аминокислотного профиля корневых выделений свидетельствует, что в контрольных вариантах наименьшая величина этого показателя характерна для сорта Софья (табл. 7). При добавлении в питательную среду солей ТМ, он никак не изменяется, что может свидетельствовать о стагнации роста растения и его переходе в состояние близкое к анабиозу. У генотипа SGE значения I_F индивидуально снижались под воздействием ТМ, а у мутанта SGECdt, наоборот, повышались. Корреляция I_F с суммарной сухой биомассой у мутантного генотипа и сорта Софья по вариантам опыта была отрицательной.

Выводы. В результате исследований впервые была детально охарактеризована биохимия корневых экссудатов различных по устойчивости к ТМ генотипов гороха посевного, в том числе уникального Cd-устойчивого мутанта SGECdt. Полученные фундаментальные знания об изменении показателей корневых выделений, вызванных загрязнением питательного субстрата в дальнейшем позволяют проводить селекционные мероприятия для поиска новых сортов, способных образовывать эффективные консорциумы с ризосферной микрофлорой, повышающие толерантность растительных культур к воздействию различных стрессов.

Аминокислоты обладают менее сильным сродством с ТМ в процессах адсорбции и десорбции, чем органические кислоты, и не так быстро, как углеводы, утилизируются почвенными микроорганизмами при образовании симбиосистем на ранних стадиях роста. Это делает их более стабильной формой для создания чувствительной тест-методики индикации внутренних изменений в таких тест-системах при металл-индуцированном стрессе, на протяжении полного цикла вегетации.

Расчет индексов фрактальной организованности механизмов в выделительной функции корневой системы растений, на примере аминокислот показал, что в контрольных вариантах наименьший показатель I_F характерен для сорта Софья. Отсутствие его изменения при добавлении в питательную среду солей ТМ может свидетельствовать о стагнации роста растения и его переходе в состояние близкое к анабиозу. Корреляция с суммарной сухой биомассой у мутантного генотипа и сорта Софья по вариантам опыта была отрицательной. Это означает, что растение затрачивает больше сил на накопление биомассы уже на ювенильной фазе своего роста с целью последующего проявления эффекта разбавления токсиканта при дальнейшем развитии.

Благодарности. Авторы признательны доктору А.А. Белимову за предоставление семенного материала.

Литература

1. Inderjit, Weston L.A. *Root Exudates: An Overview. Root Ecology. Ecological Studies (Analysis and Synthesis)*. Berlin: Springer-Heidelberg, 2003. Vol. 168. P. 235–255. doi: 10.1007/978-3-662-09784-7_10
2. *Root biomass and exudates link plant diversity with soil bacterial and fungal biomass* / N. Eisenhauer, A. Lanoue, T. Strecker, et al. // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7. URL: <https://www.nature.com/articles/srep44641> (дата обращения: 19.06.2022). doi: 10.1038/srep44641
3. Helal H.M., Sauerbeck D. *Effect of plant roots on carbon metabolism of soil microbial biomass* // *Zeitschrift Für*

4. *Pflanzenernährung Und Bodenkunde*. 1986. Vol. 149. No 2. P. 181–188. doi: 10.1002/jpln.19861490205
5. *Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly* / K. Zhalnina, K.B. Louie, Z. Hao, et al. // *Nat. Microbiol.* 2018. Vol. 3. P. 470–480. doi: 10.1038/s41564-018-0129-3
6. *Root exudation of primary metabolites: mechanisms and their roles in plant responses to environmental stimuli* / A. Canarini, W. Wanek, A. Merchant, et al. // *Front. Plant Sci.* 2018. Vol. 10. No 157. URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00157/full> (дата обращения: 19.06.2022). doi: 10.3389/fpls.2019.00157
7. *Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency* / L.C. Carvalhais, P.G. Dennis, D. Fedoseyenko, et al. // *J. Plant. Nutr. Soil Sci.* 2011. Vol. 174. P. 3–11. doi: 10.1002/jpln.201000085
8. *Gransee A. Effects of root exudates on nutrient availability in the rhizosphere. Plant Nutrition. Developments in Plant and Soil Sciences. Holland: Springer, 2001. P. 626–627.* doi: 10.1007/0-306-47624-X_303
9. *Nutrient availability in the rhizosphere: a review* / T. Mimmo, Y. Pii, F. Valentinuzzi, et al. // *Acta Hort.* 2018. Vol. 1217. P. 13–28. doi: 10.17660/ActaHortic.2018.1217.2
10. *Effects of cadmium stress on growth, anatomy and hormone contents in Glycine max (L.) Merr.* / M.V. Perez Chaca, A. Vigliocco, H. Reinoso, et al. // *Acta Physiol Plant.* 2014. Vol. 36. P. 2815–2826. doi: 10.1007/s11738-014-1656-z
11. *Cadmium: toxicity and tolerance in plants* / S.A. Hasan, Q. Fariduddin, B. Ali, et al. // *J. Environ. Biol.* 2009. Vol. 30. No 2. P. 165–174.
12. *Ранжирование химических элементов по их экологической опасности для почвы* / С.И. Колесников, К.Ш. Казеев, В.Ф. Вальков и др. // *Доклады Российской Академии сельскохозяйственных наук*. 2010. № 1. С. 27–29.
13. *Елькина Г.Я. Реакция растений на полиэлементное загрязнение подзолистых почв тяжелыми металлами* // *Агрохимия*. 2017. Т. 7. С. 78–85.
14. *Combined toxicity and underlying mechanisms of a mixture of eight heavy metals* / Q. Zhou, Y. Gu, X. Yue, et al. // *Mol. Med. Rep.* 2017. Vol. 15. No 2. P. 859–866. doi: 10.3892/mmr.2016.6089
15. *A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment* / X. Wu, S.J. Cobbina, G. Mao, et al. // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2016. Vol. 23. P. 8244–8259. doi: 10.1007/s11356-016-6333-x
16. *Cadmium spiked soil modulates root organic acids exudation and ionic contents of two differentially Cd tolerant maize (Zea mays L.) cultivars* / M.T. Javed, M.S. Akram, K. Tanwir, et al. // *Ecotoxicol Environ Saf.* 2017. Vol. 141. P. 216–225. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.03.027
17. *Seshadri B., Bolan N., Naidu R. Rhizosphere-induced heavy metal(loid) transformation in relation to bioavailability and remediation* // *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 2015. Vol. 15. No 2. URL: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-95162015005000043&lng=en&nrm=iso&tlng=en/ (дата обращения: 19.06.2022). doi: 10.4067/s0718-95162015005000043
18. *Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings* / L.P. Popova, L.T. Maslenskova, R.Y. Yordanova, et al. // *Plant Physiol.*

- Biochem.* 2009. Vol. 47. P. 224–231. DOI: 10.1016/j.plaphy.2008.11.007
18. Sugiyama A., Yazaki K. Root exudates of legume plants and their involvement in interactions with soil microbes. *Secretions and Exudates in Biological Systems, Signaling and Communication in Plants*. Berlin: Springer-Verlag, 2012. P. 27–48. doi: 10.1007/978-3-642-23047-9_2.
 19. A chemically induced new pea (*Pisum sativum* L.) mutant SGECDt with increased tolerance to and accumulation of cadmium / V.E. Tsyganov, A.A. Belimov, A.Y. Borisov, et al. // *Ann. Bot.* 2007. Vol. 99. P. 227–237. doi: 10.1093/aob/mcl261
 20. A sterile hydroponic system for characterising root exudates from specific root types and whole-root systems of large crop plants / A. Kawasaki, S. Okada, C. Zhang, et al. // *Plant Methods*. 2018. Vol. 14. URL: <https://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13007-018-0380-x/> (дата обращения: 19.06.2022). doi: 10.1186/s13007-018-0380-x
 21. Evaluation of a novel tool for sampling root exudates from soil-grown plants compared to conventional techniques / E. Oburger, M. Dell'mour, S. Hann, et al. // *Environ. Exp. Bot.* 2013. Vol. 87. P. 235–247. doi: 10.1016/j.envexpbot.2012.11.007
 22. Sharakshane A. An easy estimate of the PFDD for a plant illuminated with white LEDs: 1000 lx = 15 µmol/s/m² // *BioRxiv*. 2018. URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/289280v1.full/> (дата обращения: 19.06.2022). doi: 10.1101/289280
 23. Лаврентьева Г.В., Круглов С.В., Анисимов В.С. Динамика катионного состава почвенного раствора известкованной дерново-подзолистой почвы при загрязнении Co и Cd и изменении pH // *Почвоведение*. 2008. № 9. С. 1092–1100. doi: 10.1134/S106422930809007X
 24. Кондратьев М.Н., Роньжина Е.С., Ларикова Ю.С. Влияние абиотических стрессов на метаболизм вторичных соединений в растениях // *Известия КГТУ*. 2018. Т. 49. С. 203–219.
 25. Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants / P. Kieffer, J. Dommès, L. Hoffmann, et al. // *Proteomics*. 2008. Vol. 8. P. 2514–2530. doi: 10.1002/pmic.200701110
 26. Effects of Cadmium Exposure on Growth and Metabolic Profile of Bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) / Y. Xie, L. Hu, Z. Du, et al. // *PLoS One*. 2014. Vol. 9. URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0115279/> (дата обращения: 19.06.2022). doi: 10.1371/journal.pone.0115279
 27. Glucose alleviates cadmium toxicity by increasing cadmium fixation in root cell wall and sequestration into vacuole in *Arabidopsis* / Y.Z. Shi, X.F. Zhu, J.X. Wan, et al. // *JIPB*. 2015. Vol. 57. P. 830–837. doi: 10.1111/jipb.12312
 28. Wang S., Mulligan C.N. Effects of three low-molecular-weight organic acids (LMWOAs) and pH on the mobilization of arsenic and heavy metals (Cu, Pb, and Zn) from mine tailings // *Environ Geochem Health*. 2013. Vol. 35. No 1. P. 111–118. doi: 10.1007/s10653-012-9461-3
 29. Dynamics of three organic acids (malic, acetic and succinic acid) in sunflower exposed to cadmium and lead / Z. Niu, X. Li, L. Sun, et al. // *Int. J. Phytoremediation*. 2013. Vol. 15. No 7. P. 690–702. doi: 10.1080/15226514.2012.723066
 30. The significance of methionine, histidine and tryptophan in plant responses and adaptation to cadmium stress / V. Zemanova, M. Pavlik, D. Pavlikova, et al. // *Plant Soil Environ*. 2014. Vol. 60. No 9. P. 426–432. doi: 10.17221/544/2014-PSE

Поступила в редакцию 07.07.2022
 После доработки 01.09.2022
 Принята к публикации 07.11.2022