

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА  
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

**Никушин Олег Витальевич**

**ВЛИЯНИЕ ЛИГАНДОВ НА ПОГЛОЩЕНИЕ ИОНОВ МЕДИ  
КЛЕТОЧНЫМИ СТЕНКАМИ РАСТЕНИЙ ВИКИ  
(*VICIA SATIVA L.*)**

1.5.21 Физиология и биохимия растений

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
д.б.н., проф. Мейчик Н.Р.

Москва – 2024

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Определение тяжелых металлов и их токсическое действие на растительную клетку.....	12
1.2. Поступление ионов тяжелых металлов в клетку .....	15
1.3. Внутриклеточные механизмы детоксикации ионов меди и других тяжелых металлов .....	17
1.4. Роль клеточной стенки в защите растений от ТМ .....	19
1.4.1. Структура клеточной стенки .....	20
1.4.2. Целлюлозная сеть клеточной стенки .....	21
1.4.3. Пектиновая сеть клеточной стенки .....	22
1.4.4. Белковая сеть клеточной стенки.....	24
1.4.5. Типы клеточной стенки .....	25
1.4.6. Ионообменные группы клеточной стенки, связывающие ионы тяжелых металлов .....	26
1.4.7. Механизм защиты растительной клетки от ТМ с участием клеточной стенки .....	27
1.5. Роль органических лигандов в поглощении и транспорте ТМ .....	29
1.5.1. Низкомолекулярные лиганды, связывающие ТМ в растении.....	29
1.5.2. Выделение корневых экссудатов как внеклеточный механизм защиты растений от действия ТМ .....	33
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	37
2.1. Выращивание растений .....	37

2.2. Выделение полимерного матрикса клеточных стенок .....	37
2.3. Определение ионообменных групп в составе клеточных стенок .....	38
2.4. Поглощение ионов меди целыми растениями .....	40
2.5. Определение концентрации ионов меди в растворе с применением бис-(циклогексаноноксалил)дигидразона (купризонный метод) .....	41
2.6. Сухое озоление растительного материала .....	42
2.7. Поглощение ионов меди изолированными клеточными стенками .....	42
2.8. Анализ тритерпеновых гликозидов («сапонинов») в экссудатах корней вики	43
2.8.1. Подготовка проб .....	43
2.8.3. Методика анализа .....	43
2.9. Статистическая обработка результатов .....	45
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	46
3.1. Токсическое действие ионов меди на растения вики посевной .....	46
3.2. Анализ состава ионообменных групп в матриксе КС корней и побегов растений вики посевной .....	51
3.3. Накопление ионов меди в тканях растений вики посевной .....	54
3.4. Медь-связывающая способность клеточных стенок, изолированных из корней и побегов растений вики посевной .....	57
3.5. Сравнительный анализ потенциальной адсорбционной способности КС корней и эндогенного содержания ионов меди в корнях растений вики посевной .....	69
3.6. Масс-спектрометрический анализ экссудатов корней растений вики посевной .....	72

4. ОБСУЖДЕНИЕ .....	76
4.1. Токсическое действие ионов меди на сухую массу и оводненность корней и побегов растений вики посевной.....	76
4.2. Анализ состава ионообменных групп в матриксе КС корней и побегов растений вики посевной .....	80
4.3. Накопление ионов меди в тканях растений вики посевной .....	81
4.4. Медь-связывающая способность клеточных стенок, изолированных из корней и побегов растений вики посевной.....	83
4.5. Сравнительный анализ потенциальной адсорбционной способности КС корней и эндогенного содержания ионов меди в корнях растений вики посевной.....	89
4.6. Масс-спектрометрический анализ экссудатов корней растений вики посевной .....	92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	94
ВЫВОДЫ .....	96
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	97

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Во многих российских регионах, где развита промышленность и сельскохозяйственное производство, существует опасность загрязнения агроэкосистем тяжелыми металлами (ТМ). Попадая в экосистему, тяжелые металлы ведут себя как токсиканты или экотоксиканты, оказывая токсическое влияние на отдельный организм или на всю экосистему в целом. Токсическое действие ТМ на растения обусловлено в первую очередь нарушением ионного гомеостаза, водного баланса, функционирования ферментных систем и цитоскелета, что приводит к множественным нарушениям метаболизма. Вследствие этого на загрязненных почвах снижается всхожесть семян, скорость роста, продукция биомассы, урожайность. В то же время, некоторые ТМ являются микроэлементами, т.е. необходимыми для жизнедеятельности растений элементами минерального питания. Так, например, медь является кофактором многих ферментов и белков, таких как цитохромоксидаза электрон-транспортной цепи митохондрий, пластоцианин, некоторые формы супероксиддисмутаза.

В связи с тем, что растения ведут прикрепленный образ жизни, для выживания на почвах с повышенной концентрацией ТМ им необходимо развивать специализированные механизмы устойчивости. Внутриклеточные защитные механизмы, реализуемые у растений в ответ на металлический стресс, широко изучаются и обсуждаются научным сообществом, и освещены в достаточном количестве обзоров (Migocka, Malas, 2018; Viehweger, 2014). Многие исследователи полагают, что в ответе на действие ТМ внутриклеточные механизмы защиты играют главенствующую роль (Guigues et al., 2014; Migocka, Malas, 2018). Эти механизмы включают метаболическую инактивацию ионов металлов путем их хелатирования и/или компартментализации в вакуоли (Hall, 2002). Как правило, в подобного рода исследованиях растения помещают на среду с повышенной концентрацией металла и исследуют ответы растений на действие стресса, избавляясь каким-либо способом от клеточной стенки, чтобы устранить ее влияние.

Однако именно клеточная стенка является первой клеточной структурой, взаимодействующей с окружающей средой. В связи с этим ряд авторов считает, что именно клеточная стенка играет одну из ключевых ролей в защите растений от ТМ, обусловленную их высокой катионообменной способностью (Krzesłowska, 2011; Meuschik et al., 2021). В подтверждение этого тезиса часто приводятся данные по растениям-металлофитам, т.е. произрастающим на почвах с естественно высоким содержанием ТМ, и эволюционно приспособленным к данному фактору среды. Для многих металлофитов показано преимущественное связывание ТМ в клеточной стенке, что предотвращает проникновение металлов в цитозоль и, следовательно, препятствует токсическому действию этих элементов (Krämer et al., 2000; Konno et al., 2010; Li et al., 2013).

Другим механизмом защиты растений от ТМ является выделение корнями лигандов, связывающих металлы в почвенном растворе, таких как цитрат, малат, некоторые аминокислоты (Yang et al., 2000; Tsednee et al., 2014). Несмотря на то, что имеется большое количество исследований о влиянии органических лигандов на накопление и доступность ТМ, тонкие механизмы этих явлений до сих пор не установлены. Как органические лиганды участвуют в поглощении ТМ растениями из раствора? Поглощаются ли целые комплексы или свободные ионы металла? С какими органическими лигандами связаны катионы при движении по апопласту, сосудам ксилемы и флоэмы и в клетках других тканей растения? Способны ли комплексы лигандов с ТМ взаимодействовать с клеточной стенкой? На все эти вопросы до сих пор нет однозначных ответов.

**Цель и задачи исследования.** Цель настоящей работы состояла в изучении влияния лигандов на адсорбцию ионов меди клеточными стенками корней и побегов растений вики посевной (*Vicia sativa* L.).

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать влияние гистидина и глутамина на накопление ионов меди в тканях растений;
2. Определить медь-связывающую способность клеточных стенок, изолированных из корней и побегов растений;

3. Установить влияние гистидина и глутамина на адсорбцию ионов меди изолированными клеточными стенками корней и побегов;
4. Исследовать изменения в структуре клеточных стенок корней и побегов растений вики в ответ на действие ионов меди.
5. Определить состав экссудатов корней и установить их влияние на поглощение ионов меди растениями вики.

**Научная новизна.** Выявлено влияние гистидина и глутамина на поступление ионов меди в растения вики. Впервые исследована медь-связывающая способность клеточных стенок корней и побегов растений вики и определен качественный и количественный состав ионообменных групп в КС.

Впервые изучено влияние гистидина и глутамина на адсорбцию ионов меди клеточными стенками корней и побегов растений. Получены данные о модификации клеточных стенок корней и побегов вики в ответ на поступление в растение избытка ионов меди. Впервые показано выделение тритерпеновых гликозидов корнями растений вики посевной в ответ на присутствие в среде ионов меди.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Материалы диссертационного исследования расширяют и углубляют современное понимание роли лигандов в защите растений от действия  $\text{Cu}^{2+}$ . Результаты исследования могут быть использованы в практике растениеводства при выращивании растений на территориях с высоким содержанием ТМ в почве, а сделанные на их основе теоретические обобщения – для разработки курсов лекций по экологической физиологии растений для студентов биологических и экологических специальностей.

**Методология диссертационного исследования.** Диссертационная работа выполнена с использованием физиолого-биохимических, физико-химических и статистических методов, а также анализа данных литературы.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. У растений вики посевной основным местом накопления ионов меди является корневая система. При этом действие гистидина и глутамина направлено на ограничение поступления металла в корень;
2. Клеточные стенки корней и побегов растений *V. sativa* характеризуются высокой связывающей способностью в отношении ионов меди;
3. Избыток  $\text{Cu}^{2+}$  в среде приводит к модификации структуры клеточной стенки: при 10 и 50 мкМ Cu усиливается биосинтез клеточной стенки корней без изменения соотношения её компонентов, а при 100 мкМ увеличивается степень лигнификации КС корня;
4. Присутствие гистидина и глутамин в среде выращивания приводит к снижению медь-связывающей способности КС корней и побегов, тем самым дополнительно ограничивая поступление  $\text{Cu}^{2+}$  в растение;
5. В ответ на присутствие в среде ионов меди корнями растений вики посевной выделяются тритерпеновые гликозиды, главным образом Soyasaponin I.

**Апробация работы.** Результаты исследования были представлены на 4 международных конференциях:

1. Всероссийской научной конференция с международным участием "Биология растений в эпоху глобальных изменений климата" (Уфа 2023);
2. Международной конференции «VII Съезд биофизиков России» (Краснодар 2023);
3. III Международная научно-практическая конференция «Клеточная биология и биотехнология растений» (Минск 2022);
4. XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2021" (Москва 2021).

**Публикации по теме диссертации.** По теме диссертации опубликовано четыре статьи из них три в научных журналах рекомендованных ВАК, а также 4 тезисов в сборниках материалов конференций.

**Личный вклад соискателя** заключается в критическом обзоре литературы, постановке цели и задач работы, в планировании и проведении экспериментальных исследований, статистической обработке экспериментальных результатов, подготовке основных публикаций по выполненной работе. графической работе с полученными данными и активном участии в анализе и осмыслении результатов; написании диссертационной работы Представленные в работе результаты получены самим автором или при его непосредственном участии. Фамилии и имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов исследования, заключение, выводы, список литературы. Материалы диссертации изложены на 109 страницах машинописного текста и содержат 12 таблиц и 16 рисунков. Список цитируемой литературы включает 140 наименований, из которых 134 – на иностранном языке.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации:**

**Статьи в рецензируемых изданиях, индексируемых в базах данных WoS, Scopus, RSCI:**

1. Мейчик Н. Р., Николаева Ю. И., Ефимова М. В., Данилова Е. Д., **Никушин О.В.** и Кушунина М. А. Влияние брассиностероидов на ионообменные свойства клеточных стенок корней и побегов ячменя на фоне действия тяжелых металлов // Физиология растений. – 2023. – Т. 70, № 1. – С. 91 – 99 (1,04 п.л./ вклад автора заключается в критическом обзоре литературы, в планировании и проведении экспериментальных исследований, статистической обработке экспериментальных результатов, графической работе с полученными данными и активном участии в анализе и осмыслении результатов), ИФ (РИНЦ) = 1,794. Meichik N. R., Nikolaeva Yu. I., Efimova M. V., Danilova E. D., **Nikushin O. V.**, Kushunina M. A. Influence of

brassinosteroids on the ion-exchange properties of the cell walls of roots and shoots of barley against the background of the action of heavy metals // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2023. – Vol. 70, № 1. – P. 91 – 99 (IF (WoS, Scopus) = 1,4).

2. Мейчик Н. Р., Николаева Ю. И., **Никушин О. В.** и Кушунина М. А. Влияние полиметаллического загрязнения на ионообменные свойства клеточных стенок корней и побегов ячменя // *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни*. – 2021. – Т. 501, № 1. – С. 547–550 (0,462 п. л./ вклад автора заключается, в планировании и проведении экспериментальных исследований, оценке влияния тяжелых металлов на растения ячменя, статистической обработке экспериментальных результатов, и активном участии в анализе и осмыслении результатов), ИФ (РИНЦ) = 0,868. Meychik N. R., Nikolaeva Yu. I., **Nikushin O. V.**, Kushunina M. A. The effect of polymetallic pollution on ion-exchange properties of barley root and shoot cell walls // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2021. – Vol. 501, № 1. – P. 415–418 (IF (WoS, Scopus) = 0,8).

3. Мейчик Н. Р., Николаева Ю. И., **Никушин О. В.** и Кушунина М. А. Роль физико-химических свойств клеточных стенок корней в поглощении меди растениями вики нарбонской // *Биофизика*. – 2021. – Т. 66, № 1. – С. 137–146 (1,04 п. л./ вклад автора заключается в планировании и проведении экспериментальных исследований, статистической обработке экспериментальных результатов, определении медь-связывающей способности клеточных стенок корней вики нарбонской, графической работе с полученными данными и активном участии в анализе и осмыслении результатов), ИФ (РИНЦ) = 0,808. Meichik N. R., Nikolaeva Yu. I., **Nikushin O. V.**, Kushunina M. A. The role of the physicochemical properties of root cell walls in the uptake of copper by narbon vetch plants // *Biophysics*. – 2021. – Vol. 66, № 1. – P. 117–124 (IF (Scopus) = 0,2).

#### **Прочие публикации:**

1. **Никушин О. В.**, Мейчик Н. Р., Николаева Ю. И. и Кушунина М. А. Влияние лигандов на адсорбцию ионов меди клеточными стенками растений вики посевной (*Vicia sativa* L.). // В сб.: Сборник научных трудов VII съезда биофизиков России: в

2 томах. – Краснодар: Типография ФГБОУ ВО КубГТУ. – 2023. – Т. 2. – С. 104–105.

2. **Никушин О.В.**, Мейчик Н.Р., Николаева Ю.И. и Кушунина М.А. Влияние гистидина и глутамина на сорбционную способность клеточных стенок корней и побегов растений вики посевной (*Vicia sativa* L.). // В сб.: Клеточная биология и биотехнология растений: тез. докл. III Междунар. науч.-практ. конф. – Минск: БГУ. – 2022. – С. 29.

3. **Никушин О.В.** (2021). Влияние гистидина на сорбцию ионов тяжелых металлов клеточными стенками корней растений вики посевной (*Vicia sativa* L.). // В сб.: Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2021». – Москва: МАКС Пресс, (электронный сборник). – 2021.

4. **Никушин О.В.** Исследование ионообменной способности клеточных стенок корней вики нарбонской (*Vicia narbonensis* L.) // В сб: Материалы Международного научно-исследовательского конкурса / ред.: Соловьева И.А. и др. – Уфа: НИЦ Вестник науки. – 2020. – С. 30–46.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Определение тяжелых металлов и их токсическое действие на растительную клетку

К группе тяжелых металлов (ТМ) принято относить элементы с плотностью более  $5 \text{ г/см}^3$  (Adriano, 2001). Наиболее обширная классификация относит к группе природных тяжелых металлов и металлоидов 57 элементов периодической таблицы Д.И. Менделеева, начиная с V с атомной массой 50,9 а.е.м. заканчивая U с атомной массой 238 а.е.м., исключая галогены и благородные газы (Водяницкий и др., 2012).

Большая часть ТМ относится к группе жизненно необходимых элементов минерального питания, такие как медь, никель, цинк, железо. Эти элементы в физиологических концентрациях полезны для растений, но при высоком содержании оказывают токсическое влияние на клетку. Не участвующие в метаболизме ТМ, такие как кадмий, ртуть, мышьяк и свинец, обладают схожими с элементами минерального питания физико-химическими свойствами (Rivetta et al., 1997), что позволяет этим элементам влиять на поведение других питательных веществ в системе почва-растение. Взаимоотношения между металлом и элементом минерального питания могут носить синергетический или антагонистический характер (Marschner, 1995). Например, известно, что Cd способен ингибировать поглощение растениями таких металлов как: K, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu и Mn (Rivetta et al., 1997).

Многие авторы сходятся во мнении, что в основе токсического действия ТМ лежит их способность связываться с серосодержащими молекулами с образованием стабильных комплексов, а также замещать ионы других металлов, которые могут входить в состав биомолекул, в частности ферментов (Migocka, Malas, 2018). Кроме того, некоторые переходные металлы, такие как медь, способны участвовать в окислительно-восстановительных процессах в клетке или вступать в реакции Габера-Вейса и Фентона, с образованием активных форм кислорода и, тем самым, вызывать окислительный стресс (Gaetke et al., 2014).

В настоящее время принято различать растения по их способности накапливать ТМ в своей биомассе на три группы (Viehweger, 2014).

1. Аккумуляторы (накопители).

Аккумуляторы – растения, накапливающие ТМ в основном в надземной части. Такие растения в ходе эволюции, произрастая на почвах с высоким фоновым содержанием тяжелых металлов, сформировали конститутивные механизмы устойчивости к ним, позволяющие этим растениям накапливать ионы металлов в метаболически инертных органах, либо образовывать безопасные хелатные комплексы.

2. Индикаторы.

Содержание ТМ в растениях-индикаторах отражает их концентрацию в почве.

3. Исключатели.

У растений-исключателей поступление ионов металлов в побеговую систему ограничено, несмотря на высокую концентрацию ТМ в почве. В таком случае барьерную функцию выполняет корневая система.

Помимо приведенных выше, выделяется еще одна группа растений – гипераккумуляторы (Baker, Brooks, 1989). Эти растения способны накапливать ТМ в количестве, во много раз превышающем их летальную концентрацию для обычных видов. Способность таких видов аккумулировать высокие концентрации ТМ в настоящее время интенсивно изучается. Повышенный интерес к этим видам объясняется проблемой фиторемедиации почв. Фиторемедиация – это метод очистки почв от ТМ, основанный на удалении ионов путем выращивания растений-аккумуляторов на загрязненной территории.

Важным фактором защиты растений от действия ТМ являются бактерии и грибы, обитающие в ризосфере. Бактерии и грибы способны выдерживать значительно более высокие концентрации токсичных металлов, по сравнению с растениями (Muñoz et al., 2012; Oladipo et al., 2018). Высокая устойчивость микроорганизмов обусловлена с одной стороны сниженной биодоступностью ионов металлов ввиду выделения бактериями различных соединений, а с другой –

эффективным механизмом выведения ТМ из клеток. Такие особенности бактерий могут быть использованы самими растениями. Так, например, в экспериментах по внесению в почву металл-устойчивых видов бактерий родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* и *Ralstonia* приводило к снижению эндогенного содержания ТМ в тканях люпина (Kure et al., 2018).

Устойчивость растений к избытку ТМ на этапах прорастания семян и роста проростков варьирует в зависимости от вида растения, типа металла и его концентрации. Например, Cu и Zn в диапазоне концентраций от 1,5 до 10 мкМ ингибируют прорастания семян и ранние этапы роста ячменя, риса и пшеницы (Mahmood et al., 2007). В тоже время растения рода *Vicia* демонстрируют высокую устойчивость к действию ТМ даже на ранних этапах жизни. Например, семена *Vicia faba* и *Vicia sativa* способны прорасти при обработке растворами 9 мМ Cu(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> в течение 5 дней. Снижение доли проросших семян *V. faba* наблюдается при увеличении концентрации Cu<sup>2+</sup> в среде выращивания до 18 мМ, для *V. sativa* токсичной оказалась концентрация 28 мМ медного купороса (Jalali et al., 2018).

В настоящее время процесс роста растений, особенно рост корня, принято считать наиболее чувствительным к действию ТМ. Рост главного корня, как правило, более чувствителен, чем процесс образования боковых корней (Иванов и др., 2003). Основываясь на многочисленных исследованиях (Barcelo, Poschenrieder, 1990; Punz, Sieghardt, 1993; Zhang, Yang, 1994; Кожевникова и др., 2009), мы можем вывести основные морфологические и структурные изменения в корневой системе растений, вызванные избытком ТМ:

1. Замедление роста и снижение биомассы корней;
2. Уменьшение диаметра сосудов ксилемы (De Silva et al., 2012);
3. Повреждение апикальной меристемы корня;
4. Сокращение числа корневых волосков;
5. Изменение в степени ветвления корневой системы;
6. Лигнификация и суберинизация клеточных стенок;
7. Изменения структуры гиподермы и эндодермы корней.

Избыток ТМ в среде оказывает негативное влияние на рост побеговой системы (Rout et al., 1997; Клаус и др., 2013). Влияние металлов на надземные органы связано со снижением длины корней, меньшим поступлением элементов минерального питания и нарушением водного транспорта в растении. Транспортируясь в побеги ионы металлов способны оказывать прямое воздействие на метаболизм клеток, сокращая рост надземной части растений (Shanker et al., 2005).

Известно, что ТМ ингибируют процесс фотосинтеза путем нарушения ультраструктуры хлоропластов, тормозя синтез пигментов и ферментов фотосинтеза (Клаус и др., 2013). Кроме того, было показано негативное влияние ТМ на фиксацию  $\text{CO}_2$  через снижение активности ферментов цикла Кальвина (Angelov et al., 1993) и закрытие устьиц (Seregin, Ivanov, 2001; Linger et al., 2005; Bertrand, Poirier, 2005).

В высоких концентрациях ТМ оказывают влияние на содержание воды в клетках растений (Gajewska et al., 2006; Rucińska-Sobkowiak, 2016). Негативное влияние ТМ на водный баланс растений связано с изменением диаметра сосудов ксилемы под действием ТМ (De Silva et al., 2012). Адсорбция ТМ клеточной стенкой приводит к уменьшению её эластичности, что негативно сказывается на поступлении воды в клетки корня (Krzesłowska, 2011; Rucińska-Sobkowiak, 2016). Ограничение роста корня ТМ приводит к снижению площади всасывающей поверхности и, как следствие, меньшему поступлению воды.

## **1.2. Поступление ионов тяжелых металлов в клетку**

Транспорт ТМ через мембрану представляет собой сложный процесс. Для ТМ, необходимых растительной клетке для нормального метаболизма, на плазмалемме присутствуют специфические транспортеры. Для металлов, не включенных в метаболизм клетки (Cd, Hg и др.), специальных транспортных систем нет. Однако, из-за схожести физико-химических характеристик, не

участвующие в метаболизме клетки металлы способны пересекать плазмалемму, используя «чужие» транспортные системы. На растениях риса было показано, что транспортер OsNRAMP5, который в нормальных условиях транспортирует Mn, Fe и Zn, способен переносить внутрь клетки и Cd при его высокой концентрации в среде (Gong et al., 2020).

У двудольных и части однодольных растений ионы меди (после восстановления до  $Cu^+$  мембранными  $Cu(II)$ -хелатредуктазами FRO4 и FRO5) транспортируются внутрь клетки белками семейства COPT (Printz et al., 2016). Это одно из самых крупных семейств медных транспортеров растительной клетки. Известно, что геном риса содержит 7 генов этих транспортеров (*COPT1-7*; Yuan et al., 2011). Экспрессия генов *COPT* зависит от факторов окружающей среды, а точнее от состава среды выращивания. Так, дефицит ионов марганца индуцирует экспрессию *COPT1* в корнях и *COPT3* и *COPT7* в стеблях, а также слабо ингибируют экспрессию *COPT2* и *COPT4* в корнях (Yuan et al., 2011). Дефицит Cu в среде индуцирует экспрессию *COPT1*, *COPT2* и *COPT6*, в то время как экспрессия *COPT3* и *COPT5* не зависит от экзогенной концентрации металла (Printz et al., 2016). Интересно, что ни один из белков COPT не участвует в транспорте железа и цинка (Yuan et al., 2011). В литературе есть указания на то, что ионы меди могут транспортироваться переносчиками других металлов, например, транспортерами семейства ZIP, YSL и другими (Printz et al., 2016). Роль ZIP транспортеров в транспорте  $Cu(II)$  до конца не выяснена (Milner et al., 2013), а симпортеры семейства YSL возможно переносят через плазмалемму комплексы  $Cu(II)$  с хелаторами у злаков и некоторых других однодольных (DiDonato et al., 2004).

В транспорте ТМ принимают участие также АТФазы Р-типа (heavy metal ATPases, HMAs). В настоящее время о них известно относительно немного. Транспортер HMA5 располагается в плазмалемме клетки и осуществляет загрузку ионов металлов в ксилему. Также этот белок, вероятно, может участвовать в выбросе ТМ из клеток в апопласт (Migocka, Malas, 2018). Известно, что белки семейства HMA различаются между собой не только по локализации, но и по специфичности своей работы, так как в большинстве случаев наряду с  $Cu^{2+}$  могут

переносить ионы  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  и  $Cd^{2+}$ , хотя для тонопластной АТФ-азы OsHMA4 характерна высокая специфичность по отношению к Cu (Huang et al., 2016). Было показано, что AtHMA6/PAA1 и AtHMA8/PAA2 ответственны за перенос ТМ из цитоплазмы в хлоропласты (Shikanai et al., 2003). AtHMA7/RAN1 локализуется на эндомембранах и осуществляет доставку ионов меди к рецептору этилена (Hirayama et al., 1999).

### **1.3. Внутриклеточные механизмы детоксикации ионов меди и других тяжелых металлов**

Одним из основных внутриклеточных защитных механизмов от избытка ТМ является их изолирование в вакуоли. Так, загрузку ионов Cu в вакуоль осуществляют HMA АТФ-азы, что было непосредственно показано для тонопластной OsHMA4 у растений риса (Huang et al., 2016). Основным местом экспрессии гена *OsHMA4* являются клетки центрального цилиндра корня, при этом экспрессия индуцируется при избытке меди в среде и подавляется при ее дефиците. У мутантных по данному гену линий обнаруживалось большее накопление ионов меди в надземной части по сравнению с диким типом (Huang et al., 2016). Таким образом, можно заключить, что работа OsHMA4 обеспечивает изолирование ионов металла в вакуоли клеток корня, и тем самым участвует в регуляции транспорта меди в надземную часть растения.

Попадая в растительную клетку, ТМ оказывают пагубное воздействие практически на все физиологические процессы клетки. Для предотвращения этого в клетках существует еще одна система защиты, основанная на способности некоторых органических молекул связывать ТМ в цитозоле. Наиболее изученными из таких соединений являются фитохелатины и металлотioneины.

Фитохелатины (ФХ) представляют собой низкомолекулярные пептидные лиганды, синтезирующиеся в ответ на обработку растения ТМ. Следует отметить, что эти соединения не синтезируются на матрице РНК, их синтез осуществляют

ферменты фитохелатинсинтазы, которые используют глутатион как субстрат (Hasan et al., 2017). Синтез ФХ играет существенную роль в поддержании устойчивости растений к ТМ (Clemens, 2006). Как уже было сказано, ФХ являются лигандами, т.е. они осуществляют связывание ТМ в цитозоле, что приводит к инактивации ионов. Однако механизм детоксикации ТМ не ограничивается только их связыванием, он также включает аккумуляцию и стабилизацию ионов металлов в вакуоли через формирование высокомолекулярных комплексов с ФХ, транспорт которых через тонопласт осуществляется специализированными АВС-транспортерами (Hasan et al., 2017).

Вторым внутриклеточным хелатором ТМ являются металлотионеины (МТ). Они представляют собой низкомолекулярные полипептиды, богатые остатками цистеина, SH-группы которых связывают ионы металлов (Hasan et al., 2017). Важным отличием МТ от ФХ является тот факт, что первые имеют матричный синтез, т.е. их структура кодируется генами. Растительные МТ известны уже на протяжении трех десятков лет, тем не менее, их физиологическая функция до сих пор полностью не изучена. Среди предполагаемых ролей МТ в растительных клетках можно выделить:

1. Поддержание гомеостаза жизненно необходимых переходных тяжелых металлов;
2. Изолирование токсичных ТМ;
3. Защита клетки растений от окислительных повреждений, вызванных металл-стрессом (Hasan et al., 2017).

МТ связывают ионы металлов достаточно прочно, но в тоже время часть ионов может передаваться другим белкам, что дает основание предполагать наличие регуляторной функции МТ в гомеостазе ТМ (Hasan et al., 2017). В экспериментах с трансгенными растениями, оверэкспрессирующими гены МТ, были обнаружены изменения в стратегиях накопления и распределения ионов металлов (Hasan et al., 2017).

Относительно недавно было обнаружено, что белки дефензины также способны связывать ТМ. Дефензины представляют собой цистеин-обогащенные

белки, широко распространенные в природе. Эта группа белков известна своим участием в неспецифическом иммунном ответе и противогрибковыми свойствами (Luo, 2018).

Белок CAL1 (cadmium (Cd) accumulation in leaf 1), обнаруженный у риса, относится к группе дефензинов и участвует в защите растений от кадмия. Экспрессия гена *CAL1* наблюдается в экзодерме корня и паренхимных клетках центрального цилиндра. В клетках CAL1 локализуется в цитоплазме, он несет N-концевой сигнальный пептид, способствующий транспорту белка из клетки в апопласт. Механизм транспорта неизвестен. CAL1 несет 4 остатка цистеина, при этом в связывании кадмия принимает участие лишь 3 тиольных группы (Luo, 2018).

Предположительной функцией CAL1 является связывание кадмия в протопласте и транспорт комплекса CAL1-Cd в апопласт. Можно предположить, что комплекс CAL1-Cd является транспортной формой ионов кадмия у растений риса. Дальний транспорт кадмия осуществляется исключительно по ксилеме, что приводит к накоплению металла в листьях, но при этом не позволяет ему транспортироваться в семена (Luo, 2018).

Таким образом, внутриклеточные механизмы защиты растений от ТМ сводятся к изолированию токсичных элементов в вакуоле или в апопласте. Ионы металлов, попадая в цитоплазму, связываются с различными лигандами, с последующим транспортом комплексов в вакуоль или в апопласт, или непосредственно транспортируются АТФ-азами тонопласта.

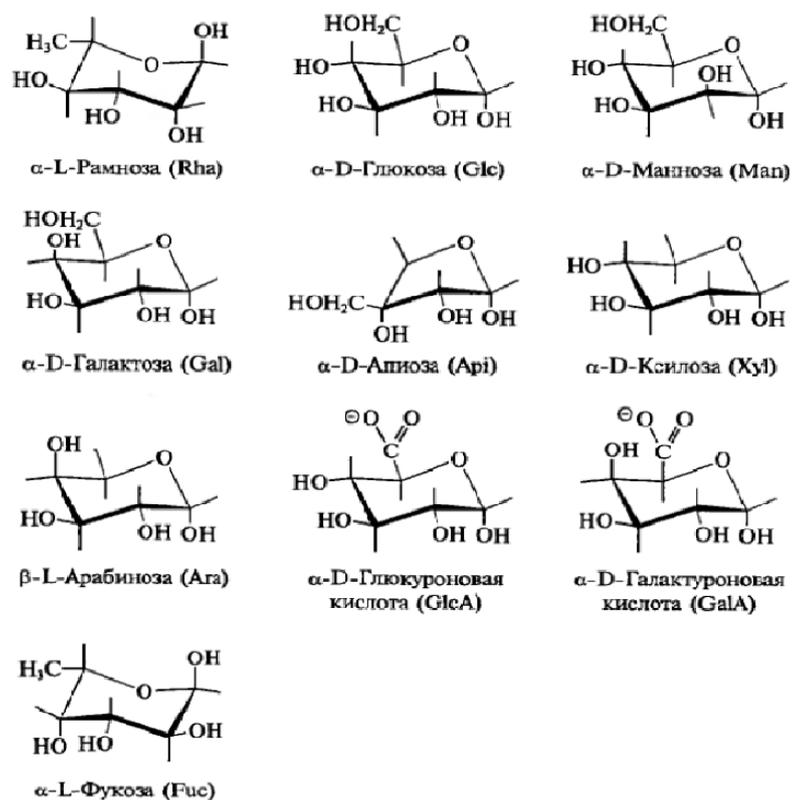
#### **1.4. Роль клеточной стенки в защите растений от ТМ**

Клеточная стенка (КС) представляет собой сложную трехмерную структуру, состоящую из полисахаридов, структурных белков и ароматических веществ. Выделяют первичную клеточную стенку, которая у двудольных растений состоит в среднем из 15–40% целлюлозы, 30–50% пектинов, 20–30% сшивочных гликанов (гемицеллюлоз) и 2–10% структурных белков. КС злаков и некоторых других однодольных характеризуется более низким содержанием пектинов (2–10%), но

более высоким содержанием гемицеллюлоз (до 50%), а также наличием ароматических соединений – гидроксикоричных кислот (McNeil et al., 1984; Cosgrove, Jarvis, 2012). Во вторичной КС содержание целлюлозы выше, а гемицеллюлоз, пектинов и белков – ниже, чем в первичной КС, и также присутствуют полимеры фенольной природы – лигнин и суберин. Клеточная стенка растений выполняет множество различных функций, среди которых опорная, регуляция водного статуса клетки, транспорт веществ, сигнальная (Carpita, Gibeaut, 1993). КС корня растений являются компартментом, химические, физические и физико-химические характеристики которого определяют его участие в процессах первичного поглощения элементов минерального питания. Поэтому в условиях избыточного содержания ТМ в среде КС корня выступают как защитный барьер, эффективность которого обусловлена их сорбционной способностью в отношении ионов ТМ.

#### *1.4.1. Структура клеточной стенки*

Клеточная стенка растений построена преимущественно из полисахаридов, формирующих главный ее структурный остов. Известно, что в построении всех углеводных компонентов КС принимает участие 10–11 моносахаридов (рисунок 1.1.). В настоящее время в рамках общей модели КС представляется как трехмерная структура, состоящая из трех взаимодействующих сетей – целлюлозной, пектиновой и белковой.



**Рисунок 1.1. Моносахариды, участвующие в построении углеводного компонента клеточной стенки (из Ермаков, 2005).**

#### 1.4.2. Целлюлозная сеть клеточной стенки

Целлюлоза представляет собой неразветвленный полимер, состоящий из (1,4)- $\beta$ -глюкана. Такая структура подразумевает поворот каждого последующего остатка на  $180^\circ$ , что позволяет отдельным цепям образовывать между собой водородные связи (Carpita, Gibeaut, 1993). Согласно общей модели, молекулы целлюлозы образуют микрофибриллы, которые исполняют роль своего рода каркаса, предоставляющего механическую жесткость первичной КС. Современные данные предполагают, что кристаллическое ядро микрофибриллы окружено субкристаллическим слоем целлюлозы, с которой связываются гемицеллюлозы (Ding, Himmel, 2006). Следует отметить, что существует некоторая гетерогенность, или неоднородность, в структуре полисахаридной цепи и степени кристалличности микрофибрилл. Несмотря на это, сущность структуры целлюлозных фибрилл в КС разных видов растений идентична (Burton et al., 2010).

Гемицеллюлозы, или сшивочные гликаны, представляют собой разветвленные полимеры, состоящие из пентоз и гексоз (Carpita, Gibeaut, 1993). Молекулы гемицеллюлоз способны образовывать водородные связи не только друг с другом, но и с микрофибриллами целлюлозы. Во вторичной КС гемицеллюлозы участвуют также в формировании ковалентных связей с лигнином. У цветковых растений обнаружено три типа гемицеллюлоз: ксилоглюканы, глюкуроноарабиноксиланы (гетероксиланы) и (1,3;1,4)- $\beta$ -глюканы. Считается, что ксилоглюканы несут основную структурную роль в первичной КС, поскольку способны образовывать нековалентные связи с молекулами целлюлозы. Структура ксилоглюканов представляет собой 1,4- $\beta$ -глюкановую основную цепь с присоединением в О-6-положении остатка D-ксилозы. Типичная базовая подструктура включает присоединение трех остатков ксилозы к трем следующим друг за другом остаткам глюкозы, с последующим незамещенным глюкозным остатком. Базовая структура ксилоглюканов может нести относительно широкий диапазон углеводных и ацетильных замен (Burton et al., 2010). Ксилоглюканы характерны для всех двудольных и примерно половины однодольных растений. Глюкуроноарабиноксиланы имеют 1,4- $\beta$ -ксилановую основную цепь, к которой могут присоединяться одиночные остатки  $\alpha$ -арабинофуранозила,  $\alpha$ -глюкуроновой или 4-метил- $\alpha$ -глюкуроновой кислот. Их присоединение к основной цепи происходит в О-3- или О-2-положении, в некоторых случаях ксилозные остатки могут иметь заместителей в обоих положениях (Burton et al., 2010). (1,3;1,4)- $\beta$ -глюканы специфичны для семейства злаковые. Исследования показали, что такие полисахариды содержат около 72% 1,4- $\beta$ -связанных и 28% 1,3- $\beta$ -связанных остатков глюкозы, последние всегда фланкированы 1,4- $\beta$ -глюкозильными остатками (Burton et al., 2010).

#### *1.4.3. Пектиновая сеть клеточной стенки*

Пектины представляют собой один из основных компонентов первичной КС растений, особенно двудольных. Они участвуют в формировании механической

устойчивости клеточной стенки, в процессах межклеточной адгезии, определяют проницаемость стенки, участвуют в межклеточном сигналинге (Carpita, Gibeaut, 1993).

Пектины представлены полимерными разветвленными молекулами, обогащенными остатками галактуроновой кислоты. Они содержат большое количество карбоксильных групп, которые могут участвовать в формировании межмолекулярных связей через ионы двухвалентных металлов (главным образом  $\text{Ca}^{2+}$ ). Карбоксильные группы участвуют в ионнообменных реакциях, определяющих участие КС в поглощении и транспорте катионов, в том числе ТМ (Sattelmacher, 2001).

Выделяют три основных типа пектиновых веществ (Caffall, Mohnen, 2009):

1. Гомогалактуронаны – это соединения, состоящие из галактуроновой кислоты, связанных между собой  $\alpha$ -1,4-связью. Карбоксильные группы могут быть метилированы или ацетилированы.
2. Рамногалактуронаны I (RG I). Основная цепочка этих соединений представляет собой повторяющиеся последовательности из 1,2-L-Rha-1,4-D-GalA. В структуре RG I к остаткам рамнозы в O-4-положении присоединены остатки нейтральных сахаров – арабианов, галактанов и арабиногалактанов первого типа.
3. Рамногалактуронаны II (RG II) отличаются чрезвычайным разнообразием сахаров, входящих в состав этих соединений, и типов связей между ними. Основная цепочка состоит из остатков галактуроновой кислоты, к которым в C-2 и C-3 положениях присоединены боковые заместители, которые могут содержать арабинозу, апиозу, фукозу и другие моносахариды, и часто разветвлены.

Также в отдельную группу иногда выделяют ксилогалактуронаны – полимеры галактуроновой кислоты, содержащие ксилозу, присоединенную  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-связью к некоторым из остатков галактуроновой кислоты.

Пектины синтезируются в аппарате Гольджи, а затем транспортируются в КС. Карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты во время синтеза могут подвергаться метилированию, в результате чего образуется несколько фракций (Burton et al., 2010). Высокометилированные пектины могут модифицироваться

специфичными пектинметилэстеразами и пектинацетилазами. В низкометилированных пектинах карбоксильные группы как правило участвуют в формировании кальциевых мостиков. Такое взаимодействие приводит к формированию гелевой структуры и придает прочность клеточной стенке, а также играет существенную роль в клеточной адгезии (Krzesłowska, 2011). Напротив, присоединение метилового остатка способствует снижению отрицательного заряда полигалактуроновой цепи, вследствие чего уменьшается катионообменная способность КС.

Таким образом, пектиновая сеть КС представляет собой смесь разветвленных сложных полимеров, которые разделяют на три большие группы. Различия в структуре пектиновых веществ наблюдаются не только между группами этих соединений, но и внутри них. Растительные клетки имеют специализированные механизмы, обеспечивающие неоднородность в структуре пектиновых веществ, что способствует осуществлению ряда важных функций, таких как клеточная адгезия.

#### *1.4.4. Белковая сеть клеточной стенки*

Последними составляющими клеточной стенки, согласно общей модели, являются белки. В настоящее время известно, что в состав КС растений входит четыре основных класса структурных белков:

1. Гидроксипролинобогатые гликопротеиды;
2. Пролинобогатые белки;
3. Глицинобогатые белки;
4. Арабиногалактановые белки.

Наиболее изученным белком среди гидроксипролиновых белков является экстенсин. Экстенсин состоит из повторяющихся последовательностей Ser-(Hyp)<sub>4</sub> и Tyr-Lys-Tyr, что имеет большое значение для формирования вторичной и третичной структуры белка (Lamport et al., 2011).

Глицинобогатые белки содержат более 70% глицина и, предположительно, имеют  $\beta$ -складчатую структуру. Считается, что, как и экстенсин, эти белки выполняют в основном структурную функцию, «склеивая» другие полимеры КС за счет образования нековалентных связей. Также показано участие глицинобогатых белков в межклеточном сигналинге, в частности при атаке патогенов (Mangeon et al., 2010).

Арабиногалактановые белки (АГБ) – это обширный класс высокогликозилированных белков, которые обладают сложной структурой и множественной локализацией, которая, в свою очередь, динамично регулируется в ходе онтогенеза растений (Румянцева, 2005). Некоторые исследователи относят этот класс соединений к гидроксипролинобогатым белкам. Как правило, в структуре АГБ можно выделить центральный полипептид, который может составлять от 1 до 10% массы всей молекулы. Разделение АГБ на классы базируется на аминокислотном составе белковой части молекулы. Классические АГБ содержат в основном Asp, Pro, Ala, Ser, Thr и Gly. Неклассические АГБ содержат коровий полипептид, сильно вариативный по аминокислотному составу. Полисахаридные и олигосахаридные единицы АГБ присоединены к коровому полипептиду через кислород гидроксипролина (Румянцева, 2005).

#### *1.4.5. Типы клеточной стенки*

Принято выделять два типа клеточной стенки растений. Первичная КС характеризуется наличием целлюлозы, пектина и сшивочных гликанов. Первичная КС характерна для активно растущих клеток растений. Вторичная КС представляет собой специализированную структуру, синтезируемую в момент прекращения роста растяжением. Такие КС ответственны за придание механической жесткости клетке и ткани в целом, главным образом за счет накопления лигнина. Главными компонентами вторичной клеточной стенки являются целлюлоза, ксиланы и лигнин (Cosgrove, Jarvis, 2012).

Ряд авторов выделяет третий тип КС, который был найден в специализированных клетках и/или в ответ на механический стимул. Этот тип КС представляет собой студенистый слой (G-слой), характеризующийся наличием толстого слоя кристаллической целлюлозы, и обычно обнаруживается в растянутых волокнах древесины. Клетки с G-слоем также обнаружены в стеблях волокнистых культур, таких как конопля, лен и крапива (Mellerowicz, Gorshkova, 2012).

#### *1.4.6. Ионообменные группы клеточной стенки, связывающие ионы тяжелых металлов*

В структуре клеточной стенки растений найдено четыре типа ионообменных групп, участвующих в поглощении ионов из почвенного раствора (Meuchik, Yermakov, 2001). Одна из этих групп является анионообменной, три других катионообменными. Анионообменные группы ( $pK_a < 3$ ) представлены первичными аминогруппами белков и аминокислот, входящих в состав КС. Катионообменные группы представлены двумя типами карбоксильных групп – полигалактуроновой (ПГК,  $pK_a$  4–5) и гидроксикоричных кислот (ГКК,  $pK_a$  6–7), а также гидроксильными группами фенольных соединений клеточной стенки ( $pK_a \approx 10$ ). У растений разных видов соотношение количества функциональных групп в КС разное: в частности, у бобовых растений полимерный матрикс содержит в 2–7 раза больше карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты, чем у злаковых (Meuchik, Yermakov, 2001). В физиологических условиях связывание тяжелых металлов клеточной стенкой сосудистых растений осуществляется в основном карбоксильными группами полигалактуроновой кислоты в составе пектинов (Sattelmacher, 2001; Krzesłowska, 2011; Meuchik et al., 2014). В поглощение ионов металлов, например никеля, ощутимый вклад могут вносить также гидроксикоричные кислоты (Мейчик и др., 2011).

Исследования связывания тяжелых металлов с КС выявили, что среди двухвалентных элементов наиболее прочные связи с карбоксильными группами

ПГК образуют ионы меди и свинца (Kartel et al., 1999). Связывание идет по принципу ионного обмена: более слабо связанные с карбоксильными группами ионы кальция и одновалентные катионы замещаются катионами ТМ. Карбоксильные группы ПГК могут подвергаться метилированию и ацетилированию, что влияет на способность КС связывать ионы. Свободные карбоксильные группы ПГК вовлечены в формирование кальциевых мостиков. При повышенном содержании ТМ в среде ионы кальция, связанные карбоксильными группами ПГК, замещаются ионами металлов, что и определяет защитную роль клеточной стенки от металл-стресса.

Связанные клеточной стенкой тяжелые металлы могут образовывать кристаллический осадок, видимый в электронный микроскоп как электронно-плотные пятна неправильной формы. Наиболее крупные частицы характерны для ионов свинца. Этот металл способен образовывать в КС чрезвычайно крупные кристалл-подобные отложения различного размера и формы. В большинстве случаев такие отложения формируются в специальных участках или утолщениях КС (Krzesłowska et al., 2010).

#### *1.4.7. Механизм защиты растительной клетки от ТМ с участием клеточной стенки*

Клеточная стенка – это первый клеточный компартмент, который взаимодействует с окружающей средой. Из предыдущих разделов ясно, что она представляет собой чрезвычайно сложную систему. В настоящее время принято считать, что клеточная стенка играет одну из ключевых ролей в защите растений от ТМ (Krzesłowska, 2011; Meychik et al., 2021).

Связывание клеточной стенкой тяжелых металлов с их последующим осаждением способствует предотвращению их токсического действия. Однако недавние исследования показали, что некоторые компоненты КС, в частности фрагменты пектиновых веществ, могут транспортироваться внутрь клетки путем эндоцитоза. В таком случае ионы ТМ, связанные с карбоксильными группами ПГК,

проникают в цитоплазму клеток, как было показано для протонем мха *Funaria hygrometrica* (Krzesłowska et al., 2010). Проникшие таким образом в клетку ТМ могут снова выбрасываться в апопласт, или транспортироваться в вакуоль.

Многими исследователями было показано, что растения-гипераккумуляторы, способные накапливать большое количество ионов ТМ, связывают их в большей степени в КС, что предотвращает катионов проникновение в цитозоль и, следовательно, препятствует токсическому действию этих элементов. Например, было показано, что мох *Scopelophila cataractae* способен произрастать в областях с высоким содержанием меди. При этом большая часть ионов меди связывается клеточной стенкой (Konno et al., 2010). Схожие результаты были получены для папоротника *Lycopodium japonicum*. Установлено, что клеточная стенка данного вида способна аккумулировать до 66% меди от ее общего содержания в клетке (Konno et al., 2005). Также было показано, что в клеточных стенках гипераккумулятора никеля *Thlaspi caerulescens* накапливается более 50% ионов металла (Krämer et al., 2000), а у другого накапливающего Ni вида, *Leptoplax emarginata*, апопластное накопление ионов Ni<sup>2+</sup> составляет 93% от общего содержания металла в корне (Redjala et al., 2009).

Известно, что количество пектиновых веществ в КС растений может меняться под действием ионов металлов. Для чувствительных к воздействию ТМ сортов и видов растений было показано увеличение массовой доли пектинов в КС корня при воздействии меди (Colzi et al., 2012), алюминия (Eticha et al., 2005) и кадмия (Parrotta et al., 2015). В то же время, воздействие таких металлов как алюминий и кадмий может приводить к росту активности пектинметилэстераз и деметилированию карбоксильных групп ПГК, что способствует связыванию ионов ТМ с клеточной стенкой (Horst et al., 2010, Parrotta et al., 2015). Для некоторых устойчивых к ТМ растений, напротив, было показано уменьшение количество пектинов в клеточной стенке клеток корня в ответ на избыток металла в среде (Eticha et al., 2005; Konno et al., 2010; Colzi et al., 2012). Интересно, что различие в устойчивости к ТМ и соответствующих механизмах модификации КС корня может наблюдаться между популяциями одного вида, в зависимости от концентрации ТМ

в почве в месте произрастания. Так, у растений устойчивой популяции *Silene paradoxa* при выращивании на среде с избыточной концентрацией меди, уменьшалось количество пектина клеточной стенки (Colzi et al., 2012), что приводило к уменьшению количества сайтов связывания ТМ и, как следствие, меньшему поступлению ионов металлов из окружающей среды в апопласт и далее в симпласт корней. У представителей не устойчивой к ионам меди популяции, наоборот, количество пектиновых веществ в КС увеличивалось. При этом у растений из обеих популяций степень метилирования пектинов не изменялась (Colzi et al., 2012).

Таким образом, накопление ионов тяжелых металлов в клеточной стенке показано как для растений-накопителей и устойчивых к ТМ видов, так и для неустойчивых к воздействию этих токсикантов. При этом осуществляется модификация состава клеточной стенки, способствующая реализации различного ответа на ТМ – механизма ограничения его накопления в тканях корня или, напротив, преобладающего связывания в клеточной стенке.

## **1.5. Роль органических лигандов в поглощении и транспорте ТМ**

### *1.5.1. Низкомолекулярные лиганды, связывающие ТМ в растении*

Свободные ионы ТМ обладают высокой реакционной способностью, поэтому их перемещение внутри растения возможно только в хелатированном состоянии. Это было показано во многих исследованиях (Ryan et al., 2013; Callahan et al., 2006; Liao et al. 2000; Krämer et al., 1996; и др.). В зависимости от ТМ и его степени окисления, органа и ткани растения, видовой принадлежности в хелатировании ТМ участвуют разные соединения, однако ключевыми являются аминокислоты (гистидин, глутамин), низкомолекулярные органические кислоты (лимонная, яблочная), глутатион и его производные (фитохелатины), а также никотианамин и его производное мугеновая кислота. Прочность комплексов ионов металлов и S-, N- и O-содержащими лигандами изменяется в так называемом ряду Ирвинга-Уильямса ( $Zn^{2+} < Cu^{+} > Cu^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+} > Fe^{2+} > Mn^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+}$ ), из

которого следует, что при равной концентрации металлов с подобными соединениями в растворе будут связываться в первую очередь катионы меди. Наибольшее сродство к Cu(II) имеют N-содержащие лиганды – гистидин (His) и никотианамин (NA). При pH 5,6 His способен связать 98,9% ионов Cu<sup>2+</sup> в растворе, NA – 99,6% (Liao et al., 2000). Комплексы Cu(II) с данными соединениями являются основной транспортной формой меди у растений при перемещении по ксилеме из корня в надземную часть (Ryan et al., 2013). В нейтральной и слабощелочной среде константы устойчивости комплексов ионов меди и других ТМ с N-содержащими лигандами существенно выше, чем комплексов ТМ с органическими кислотами (лимонной и яблочной). Однако при понижении pH их стабильность падает, поэтому в вакуолярном соке вклад органических кислот в связывание ТМ весьма существенен, чему способствует их высокая концентрация в этом компартменте клетки (Flis et al., 2016; Seregin, Kozhevnikova, 2021).

Среди работ, посвященных хелаторам ТМ у растений, большое внимание отводится вопросу содержания комплексов металл-лиганд в ксилемной пасоке и их роли в транслокации ионов ТМ в побеги. Известно, что в растворе внутри сосудов ксилемы концентрация малата, оксалата и цитрата находится, в зависимости от вида растения, в диапазоне 0,1–1,7 мМ, глутамин – 0,7 мМ, аспартата, глутамата – до 0,1 мМ, гистидина – 0,01–1 мМ, никотианамина 0,02–0,05(1,3) мМ (White et al., 1981; Cataldo et al., 1988; Liao et al., 2000; Centofanti et al., 2013; Kerkeb, Krämer, 2003).

Молекулы никотианамина, являющегося биосинтетическим предшественником мугеновой кислоты (ключевого фитосидерофора у злаковых растений), имеют оптимальную структуру для хелатирования ионов металлов, позволяющую образовывать устойчивые октаэдрические комплексы. Поэтому NA считается основным хелатором для ионов железа, цинка, меди и никеля и у одно-, и у двудольных растений (Flis et al., 2016; Seregin, Kozhevnikova, 2021). Так, например, в ксилемном соке гороха с NA связано 75–90% ионов Cu<sup>2+</sup>, 30–50% Ni<sup>2+</sup>, 30–40% Co<sup>2+</sup> и 55–80% Zn<sup>2+</sup> (Flis et al., 2016). Интересно, что биосинтез NA в зависимости от вида растения может индуцироваться как при дефиците (Wintz et

al., 2003; Irtelli et al., 2009), так и при избытке ТМ в почвенном растворе (Pich, Scholz, 1996; Liao et al., 2000). В обоих случаях это как правило приводит к возрастанию скорости транспорта ТМ в побеги. Для *Brassica carinata* было показано, что при избытке меди в среде ионы металла в ксилемном соке связаны в основном с гистидином и пролином, а при дефиците – с никотианамином (Irtelli et al., 2009). У некоторых видов-сверхнакопителей Ni и Zn (*Noccaea caerulea*, *Arabidopsis halleri*) была обнаружена положительная корреляция экспрессии генов никотианаминсинтаз с накоплением металлов в побегах (Seregin, Kozhevnikova, 2021). В то же время, у нескольких видов-аккумуляторов из рода *Alyssum* NA и другие хелаторы (гистидин, малат, цитрат) по-видимому не принимают существенного участия в транспорте никеля по ксилеме, поскольку концентрация хелаторов и их комплексов с Ni в ксилемном экссудате в 10–100 раз ниже, чем концентрация свободных катионов Ni<sup>2+</sup> (Centofanti et al., 2013; Krämer et al., 1996).

Гистидин является тридентатным лигандом благодаря наличию карбоксильной группы, первичной аминогруппы и имидазольного кольца, и образует с дивалентными катионами ТМ комплексы вида ТМ-(His)<sub>2</sub> и ТМ-His (Callahan et al. 2006). Стабильность комплексов ТМ с His ниже, чем комплексов с NA, и наибольшую среди всех ТМ аффинность к гистидину, при характерных для ксилемного сока и цитозоля значениях pH, проявляет никель (Flis et al., 2016). Также как и в случае с NA, для многих изученных видов растений было показано, что связывание ТМ с His в цитозоле клеток коры корня препятствует их загрузке в вакуоль и таким образом ускоряет радиальное перемещение ТМ по симпласту к ксилеме. В таких случаях обнаруживается положительная корреляция содержания His в корне, скорости перемещения ТМ (никеля) в побеги и его накопления в надземной части, причем такой эффект может наблюдаться как при усилении биосинтеза аминокислоты в корне (Krämer et al. 1996, Wycisk et al. 2004), так и при добавлении ее в среду выращивания растений (Krämer et al., 2000; Kerkeb, Krämer, 2003). Индукция синтеза гистидина при увеличении концентрации никеля в среде была показана у *Alyssum lesbiacum* (Krämer et al., 1996), при увеличении концентрации меди – у цикория и томатов (Liao et al., 2000). С другой стороны,

между экотипами *Noccaea caerulescens*, значительно отличающимися по способности к сверхнакоплению Ni, Zn и Cd, содержание His и в корнях, и в побегах существенно не различается (Richau et al., 2009).

Следует отметить, что присутствие хелаторов, образующих комплексы с катионами ТМ, может оказывать влияние на адсорбцию металлов клеточными стенками, в частности в сосудах ксилемы. По-видимому, в них существует рН-зависимое равновесие между свободной формой катиона ТМ, его комплексами с низкомолекулярными хелаторами, свободной формой этих веществ и металлсвязывающими сайтами в КС (Clemens et al., 2002). Константы устойчивости комплексов ТМ с органическими кислотами и аминокислотами в среднем выше, чем с ПГК (Davarski et al., 1994; Field et al., 1974; Callahan et al., 2006), поэтому количество металла, связанного полимерами КС, снижается в присутствии этих соединений. Для КС ксилемы дуба *Quercus ilex* показано примерно десятикратное снижение количества адсорбированного Ni в присутствии His, Asp или лимонной кислоты (Araújo et al., 2009). В то же время с КС корня могут связываться сами комплексы металлов с хелаторами. Так, было показано, что в корнях *Thlaspi arvense* из загрязненного медью местообитания 90% меди в клетках корня содержалось в виде  $\text{Cu}(\text{His})_2$  комплекса, адсорбированного на КС (Manceau et al., 2013). Связывание комплексов алюминия с малатом было обнаружено в апопласте корней пшеницы (Kopittke et al., 2017), что может являться механизмом детоксикации этого металла, т.к. связывание комплексов с КС не приводит к увеличению ее жесткости, в отличие от связывания свободных катионов  $\text{Al}^{3+}$ . О возможности перемещения комплексов ТМ с низкомолекулярными лигандами по апопласту корня к ксилеме почти ничего не известно. Теоретически, в присутствии лигандов, связывающих ТМ прочнее, чем карбоксильные группы в составе КС, подвижность ТМ в апопласте корня должна возрастать. Прямой апопластный транспорт комплексов до ксилемы минуя эндодерму возможен в молодых частях корня, где пояски Каспари у клеток эндодермы не до конца сформированы и не являются препятствием на пути движения ионов по апопласту в центральный цилиндр, а также в местах отхождения боковых корней, где происходят разрывы эндодермы

(White, 2001). В случае, если такой механизм действия эндогенных хелаторов действительно функционирует в корне, то добавление в среду синтетических низкомолекулярных хелаторов, образующих более стойкие комплексы с ТМ, должно приводить к значительному повышению концентрации ТМ (в составе комплекса) в ксилемном экссудате. Однако, Kerkeb и Krämer (2003) показали, что при добавлении в среду нитрилоацетата, который образует с Ni более устойчивый комплекс, чем, например, гистидин, не приводило к изменению содержания Ni в ксилемном соке по сравнению с обработкой раствором, содержащим только никель. Поэтому данные авторы заключили, что вклад прямого апопластного пути загрузки комплексов никеля, в том числе и Ni-His, в ксилему незначителен, а стимулирующее действие His на транслокацию Ni в побеги связано с увеличением подвижности Ni в симпласте корня. В целом же влияние низкомолекулярных хелаторов на способность КС корней связывать ионы ТМ изучено крайне слабо, хотя такое взаимодействие очевидно отчасти определяет поглощение и транслокацию ТМ в растении.

#### *1.5.2. Выделение корневых экссудатов как внеклеточный механизм защиты растений от действия ТМ*

Последним и самым внешним, по отношению к растению, механизмом защиты от ТМ являются корневые экссудаты. В настоящее время роль экссудатов корней в защите растений от ТМ активно изучается, так как может иметь практическое применение в технологии фиторемедиации загрязненных металлами почв. Известно, что в состав экссудатов корней могут входить органические кислоты, аминокислоты, витамины, нуклеозиды, фенольные соединения, моно- и олигосахариды (Dakora, Phillips, 2002). Концентрация аминокислот в почвенном растворе обычно находится в микромолярном диапазоне, причем самыми распространенными являются глутаминовая кислота, серин, глицин, аланин и аспарагиновая кислота (Jämtgård et al., 2008). Интересно, что хелаторы могут выделяться корнем в среду как при дефиците микроэлементов и в таком случае

усиливать их поглощение, так и при избытке металлов в среде и при этом ограничивать поступление данных элементов в растение. Первая стратегия хорошо изучена на примере поглощения железа у злаков (Marschner, 1995). Стимулирующее действие фитосидерофора мугеновой кислоты и аминокислот на поглощение таких ТМ как Cu, Fe, Pb, Cd, Mn, Zn было показано и для других видов растений (Shah et al., 2001, Luo et al., 2017; Fu et al., 2018). С другой стороны, взаимодействие хелаторов с ТМ может переводить их в недоступную для поглощения корнем форму, хотя механизм данного явления почти не изучен. Например, малат снижает накопление Cd в корнях мискантуса (*Miscanthus sacchariflorus*, Guo et al., 2017), цитрат – никеля у *Halimione portulacoides* и *Thlaspi arvense* (Duarte et al., 2007; Salt et al., 2000), фитосидерофор дезоксимугеновая кислота – кадмия у кукурузы (Hill et al., 2002), гистидин – никеля у *Thlaspi arvense* (Salt et al., 2000). Выделение малата и цитрата является механизмом защиты от высоких концентраций алюминия у многих видов растений (Delhaize, Ryan, 1995; Kopittke et al. 2017). Выделение никотианамина во внешнюю среду у двудольных растений наблюдается редко, однако было показано для металлофита *Arabidopsis halleri* при избытке цинка в среде. В таких условиях никотианамин предотвращает поступление Zn в клетки корня, так как у данного вида цинк может поглощаться только в свободной ионной форме, но не в составе комплекса (Tsednee et al., 2014). Следует отметить, что изменение состава корневых экссудатов в ответ на повышение концентрации ТМ в среде видоспецифично. Так, избыточные концентрации меди в среде могут вызывать в зависимости от вида растения выделение корнями в среду органических кислот (щавелевой, лимонной, муравьиной и яблочной; Qin et al. 2007, Meier et al. 2012), фенольных соединений (катехина, коричной и кумаровой кислот; (Meier et al., 2012) или аминокислот (гистидина; Salt et al., 2000), препятствующих поглощению данного металла корнем.

Влияние экзогенного гистидина на поглощение ТМ лучше всего изучено для никеля и, в основном, для видов-гипераккумуляторов. При этом у некоторых из них добавление His в среду не ингибирует, а стимулирует поглощение металла корнем

из нее и/или ускоряет его перемещение в побеги. Так, у пшеницы внесение His в среду выращивания приводило к значительному возрастанию содержания Ni в корнях и надземной части растений (Dalir, Khoshgoftarmanesh, 2015). Предобработка гистидином способствовала усилению загрузки Ni в ксилему (но не влияла на общее количество металла, поглощенного корнями) у *Brassica juncea*, *Noccaea caerulescens* и *Lepidium ruderale*, при этом другая аминокислота (аланин) такого эффекта не вызывала (Kerkeb, Krämer, 2003, Richau et al., 2009, Seregin et al., 2022). В то же время, влияние экзогенного His на содержание никеля в ксилемной пасоке и его избирательное накопление в побегах может существенно различаться даже у близкородственных видов что, например, было показано для ряда видов-гипернакопителей Ni из рода *Alyssum* (Серегин и др., 2019). Такой разный ответ может быть связан как с различным эндогенным уровнем His в корнях, так и с особенностями транспорта и распределения металла у разных видов. В случае с *Brassica juncea* Kerkeb и Krämer (2003) заключили, что клетками корня поглощаются свободные катионы металла, а не комплекс Ni-His, поскольку при добавлении в среду D-гистидина (который хуже поглощается клетками, чем L-гистидин) или L-гистидина совместно с избытком аланина (который конкурирует с His за транспортеры), содержание никеля в корне не меняется по сравнению с обработкой Ni + L-His, эти данные свидетельствует о том, что комплекс Ni-His распадается перед поступлением металла в клетки. Возможно, что интенсификация поглощения ТМ из среды с хелаторами может быть связана с ускорением диффузии в прилежащем к поверхности корня неподвижном слое раствора (или же в апопласте клеток ризодермы). Количество свободных ионов ТМ в этом слое быстро исчерпывается, а лабильные комплексы способны диссоциировать в нем, восполняя запас катионов ТМ и ускоряя диффузионный ток. Так, например, было обнаружено, что при постоянной активности  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  и  $Zn^{2+}$  в растворе их поглощение корнями шпината происходило быстрее всего в растворах с хелаторами, образующими лабильные комплексы с этими ТМ, это указывает на то, что именно диффузия свободных катионов к поверхности корня ограничивает скорость их поглощения (Degryse et al., 2006). Экзогенный гистидин (L-His)

хорошо поглощается клетками корня из внешней среды (Richau et al., 2009; Dalir, Khoshgoftarmanesh, 2015) и, поступив в корень, His может ускорять транспорт Ni по симпласту к ксилеме, как показано в цитированных выше работах (Kerkeb, Krämer, 2003; Richau et al., 2009).

Таким образом, присутствие низкомолекулярных органических хелаторов в среде выращивания может оказывать различный эффект на поглощение и передвижение ионов ТМ в корне в зависимости от конкретного вида растения, ТМ и хелатора. Данных о влиянии гистидина и глутамина на поглощение меди у бобовых растений, в частности у вики, нам найти не удалось.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Выращивание растений

Объектом исследования служили растения вики посевной (*Vicia sativa* L.) сорта Льговская-22.

Семена вики проращивали на влажной фильтровальной бумаге в термостате при 24°C в темноте в течение 3 суток. После этого проростки пересаживали в 3 л сосуды (50 растений на сосуд) на низкосолевой раствор с концентрацией ионов  $K^+$ ,  $NO_3^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Na^+$ ,  $PO_4^{3-} \sim 0,01$  г/л. Растения выращивали в климатической камере (24°C, освещенность  $\sim 110$  мкмоль квантов/м<sup>2</sup>×с, 14-часовой день) при постоянной аэрации растворов и их замене каждые 7 дней.

### 2.2. Выделение полимерного матрикса клеточных стенок

Проводили из побегов и корней 10-дневных растений по описанному ранее методу (Meuchik, Yermakov, 2001). Навески растительного материала помещали в колбы и промывали последовательно 90%-ым этанолом (только побеги,  $\sim 0,1$  л на колбу в течение 48 ч, при постоянном перемешивании), 1%-ым раствором NaOH ( $\sim 0,3$  л, в течение 24 ч, при постоянном перемешивании), H<sub>2</sub>O ( $\sim 2$  л), 1%-ым раствором HCl ( $\sim 0,3$  л, в течение 24 ч, при постоянном перемешивании) и дистиллированной водой до исчезновения в промывных водах хлорид-ионов. Затем препараты КС высушивали при 60°C до постоянного веса. Данный метод выделения позволяет получить препараты КС, в которых сохранена архитектура тканей, но удалено внутриклеточное содержимое, при этом все катионообменные группы полимеров КС присутствуют в H<sup>+</sup>-форме, анионообменные (аминогруппы) – в форме свободного амина (Meuchik, Yermakov, 2001). Также применение данной методики позволяет сохранить исходную степень метилирования карбоксильных групп ПГК в составе пектинов. Обоснование методики и результаты ее применения на различных объектах приведены в статьях Мейчик и др. (2003, 2006), Meuchik,

Yermakov (1999, 2001), Meychik et al. (2014). Долю сухой массы КС ( $G_{КС}$ , %) определяли по формуле:

$$G_{КС} = (m_{кк} / m_к) \times 100 \quad (2.1),$$

где  $m_к$  и  $m_{кк}$  – сухая масса частей растений и масса выделенных из них КС соответственно (г).

### 2.3. Определение ионообменных групп в составе клеточных стенок

Потенциометрическое титрование осуществляли согласно методике, описанной в работе Meychik & Yermakov (1999). Сухие навески КС массой  $40 \pm 0,1$  мг помещали в бюксы и заливали 12,5 мл раствора NaOH или HCl с концентрацией от 0 до 10 mM и одинаковой ионной силой (10 mM), которую создавали добавлением необходимого количества NaCl. Образцы выдерживали в растворах в течение 48 ч при постоянном перемешивании на качалке. Диапазон равновесных значений pH в растворах составлял от 3,2 до 12,0 единиц. Исходную и равновесную концентрацию кислоты определяли титрованием с индикатором метиловым красным, а концентрацию щелочи – потенциометрическим титрованием. Ионообменную способность КС рассчитывали по формуле:

$$S_i^{кат,ан} = \frac{|(C_o - C_i)| \times V}{g} \quad (2.2),$$

где  $S_i^{кат,ан}$  – катионо-(анионо-)обменная способность КС, мкмоль/г сухой массы КС;  $C_o$  и  $C_i$  – исходная и соответствующая равновесная концентрация NaOH или HCl в растворе, mM;  $V$  – объем раствора для инкубации КС, мл;  $g$  – сухая масса образца КС, г.

Число типов ионообменных групп в КС ( $j$ ), а также их количество ( $\Delta S^j$ ) определяли по дифференциальным кривым ( $dS_j/dpH_i = f(pH_i)$ ), как описано ранее (Meychik, Yermakov, 2001). Степень ионизации ( $\alpha_i$ ) для каждой группы рассчитывали по формуле:

$$\alpha_i = S_i^j / \Delta S^j, \quad (2.3),$$

где  $S_i^j$  – количество диссоциированных групп  $j$ -го типа при  $\text{pH}_i$ .

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

$$\text{pH} = \text{p}K_a + n \lg(\alpha / (1 - \alpha)), \quad (2.4),$$

где  $\text{p}K_a$  – кажущаяся константа ионизации ионообменной группы полимера;  $\alpha$  – степень ее ионизации;  $n$  – константа, зависящая от строения полимерной матрицы и природы противоиона (Шатаева и др., 1979).

Используя установленные значения параметров ( $\Delta S^j$ ,  $\text{p}K_a^j$ ,  $n^j$ ), рассчитывали  $S_i^{pac}$  по суммарному уравнению (Meuchik, Yermakov, 2001):

$$S_i^{pac} = S_o^{kam} - \sum_{j,i=1}^{k,m} \frac{\Delta S^j}{1 + 10^{\frac{\text{p}K_a^j - \text{pH}_i}{n^j}}} \quad (2.5),$$

где  $S_i^{pac}$  – расчетное значение ионообменной способности КС при соответствующем значении  $\text{pH}_i$ ;  $S_o^{kam}$  – максимальная катионообменная способность КС;  $\Delta S^j$  – количество ионообменных групп  $j$ -го типа;  $S_o^{kam}$ ,  $\Delta S^j$  и  $S_i^{pac}$  выражены в мкмоль/г сухой массы КС;  $\text{p}K_a^j$  – кажущаяся константа ионизации ионообменных групп  $j$ -го типа;  $n^j$  – константа уравнения (2.4) 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:

$$S_i^{pac} = B \times S_i^{эксн} + A \quad (2.6),$$

где  $S_i^{pac}$  и  $S_i^{эксн}$  – рассчитанная по уравнению (2.5) и экспериментально определенная ионообменная способность при соответствующем значении  $\text{pH}_i$ , мкмоль/г сухой массы КС;  $A$  и  $B$  – параметры регрессии.

## 2.4. Поглощение ионов меди целыми растениями

Растения вики девятидневного возраста переносили на растворы  $\text{CuCl}_2$  (150 мл, по 9 растений на сосуд) с концентрацией меди 10, 50 или 100 мкМ, или на растворы 10 или 100 мкМ  $\text{CuCl}_2$  с добавлением L-гистидина или L-глутамина. В опытах с His использовались концентрации 0,5 мМ и 1 мМ, с Gln – 1 мМ и 5 мМ. Вне зависимости от состава растворов исходный рН составлял  $5,0 \pm 0,1$ . Растения выдерживали в климатической камере 24 часа при непрерывной аэрации. В качестве контроля использовали растения, находившиеся в течение 10 суток на низкосолевым растворе. Опыты проводили в 6-12 биологических повторах.

Концентрации ионов меди в экспериментальных растворах были выбраны на основании предыдущих исследований нашей научной группы на других объектах (маш, пшеница), в которых было обнаружено, что воздействие 10 мкМ Cu в течение 24 ч не приводит к ингибированию роста, тогда как концентрация Cu в среде 100 мкМ является токсичной (Meuchik et al., 2016). Данных о том, какие количества аминокислот, в частности гистидина и глутамина, способны выделять корни растений, нам в литературе найти не удалось, поэтому в экспериментальных растворах концентрация His соответствовала той, что наблюдается в ксилемной пасоке большинства видов растений (до 1 мМ, см. например Kerkeb, Krämer (2003)). Концентрация Gln в растворе внутри сосудов ксилемы не превышает 1 мМ (White et al., 1981, Liao et al., 2000), однако в предварительных экспериментах нами было обнаружено, что при таких концентрациях глутамин не оказывает значимого влияния на поглощение меди растениями и изолированными КС, поэтому для работы были выбраны более высокие концентрации.

По истечении 24 часов растения извлекали из раствора, разделяли на надземную часть и корни, взвешивали, а затем высушивали в термостате при температуре  $60^\circ\text{C}$  до постоянного веса, после чего определяли сухую массу частей растений и рассчитывали оводненность корней и надземной части ( $K_{\text{H}_2\text{O}}$ ) по формуле:

$$K_{H_2O} = \frac{(m_{сыр} - m_{сух})}{m_{сух}} \quad (2.7),$$

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

Часть опытных и контрольных растений использовали для выделения клеточных стенок корней и побегов, остальные подвергали сухому озолению.

Объём раствора  $CuCl_2$ , который уменьшался вследствие транспирации растений и испарения воды с поверхности жидкости, доводили до 150 мл. Затем в растворах определяли концентрацию ионов меди фотоколориметрическим методом.

## **2.5. Определение концентрации ионов меди в растворе с применением бис-(циклогексаноноксалил)дигидразона (купризоновый метод)**

Точную аликвоту раствора, содержащего ионы меди, переносили в мерную колбу на 25 мл, в которую добавляли последовательно 2,5 мл 0,1% раствора купризона и 2,5 мл 10% раствора цитрата аммония. Раствор в мерной колбе доводили дистиллированной водой до метки и перемешивали. Через 10 минут измеряли оптическую плотность окрашенного раствора при 600 нм на фотоколориметре КФК-3-01 (ЗОМЗ, Россия). В качестве контроля использовали раствор, приготовленный в мерной колбе на 25 мл, как указано выше, но без добавления ионов меди. Предварительно прибор калибровали по растворам хлорида меди с содержанием от 2 до 10 мкг  $Cu^{2+}$  в пробе, которые готовили в соответствии с методикой спектрофотометрического определения  $Cu^{2+}$  в растворе (Марченко, 1971).

Определение проводили в 2 – 3 аналитических повторах. Затем рассчитывали поглощение меди растениями по убыли её содержания из экспериментального раствора. Расчеты проводили на единицу сырой и сухой массы корней.

## **2.6. Сухое озоление растительного материала**

Сухой растительный материал измельчали, взвешивали и помещали в фарфоровый тигель, куда затем добавляли 2 мл концентрированной азотной кислоты и оставляли его под тягой на 30–60 мин. Затем тигель с образцом переносили в муфельную печь (СНОЛ 3/10-В, Россия), которую нагревали до температуры 50–60°C. Тигель с растительным материалом выдерживали в муфельной печи при указанной температуре до прекращения выделения оксидов азота. Затем температуру в муфельной печи постепенно поднимали до 400°C и выдерживали там тигель с образцом в течение 12 часов. Если в образовавшейся золе присутствовали темные образования, то в тигель снова добавляли 2 мл концентрированной азотной кислоты и проводили минерализацию пробы как описано выше.

После полного озоления растительного материала в тигель добавляли 2 мл концентрированной соляной кислоты, оставляли на 30 минут под тягой, а затем содержимое тигля переносили в мерную колбу на 25 мл, многократно промывая стенки тигля дистиллированной водой до соответствующего мерной колбе объёма. рН в каждом растворе доводили до значения, равного  $3,0 \pm 0,1$  концентрированным аммиаком, фиксировали изменение объёма и затем определяли в растворах концентрацию ионов меди как описано выше. После этого производили расчёт содержания меди на единицу сухой массы растительного материала. Определение проводили в 3–6 аналитических повторах.

## **2.7. Поглощение ионов меди изолированными клеточными стенками**

Выделение клеточных стенок проводили из корней и побегов десятидневных растений вики, выращенных на растворах с низким содержанием элементов минерального питания (т.е. контрольных растений), или после экспериментов по поглощению растениями  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$  совместно с His или Gln (т.е. опытных

растений). Для выделения КС брали по 9 растений на биологическую повторность, т.е. количество растений в эксперименте с изолированными клеточными стенками было равно их числу в экспериментах с целыми растениями. Растений разделяли на корни и надземную часть, определяли их сырую массу и проводили выделение клеточных стенок, как описано выше, но не проводили высушивания образцов КС.

Препараты изолированных клеточных стенок корней и побегов «контрольных растений» помещали в растворы  $\text{CuCl}_2$  тех же составов, что и в экспериментах по поглощению  $\text{Cu}^{2+}$  целыми растениями, на 24 часа. Образцы КС «опытных» растений обрабатывали в течение 24 часов медьсодержащим раствором того же состава, что и при обработке целых растений, из которых выделяли клеточную стенку. По истечении 24 часов, препараты клеточных стенок корней и побегов переносились в растворы 0,1 н  $\text{HCl}$  на 48 – 72 часа. Медь-связывающую способность клеточных стенок корней и побегов определяли по десорбции  $\text{Cu}^{2+}$  в 0,1 н  $\text{HCl}$ .

## **2.8. Анализ тритерпеновых гликозидов («сапонинов») в экссудатах корней вики**

### *2.8.1. Подготовка проб*

Экссудаты корней сушили лиофильно (аппарат FreeZone, Labconco). Полученный сухой остаток растворяли в 2 мл смеси метанол-вода (1:1, по объему), центрифугировали при 15 000 об./мин 15 минут (центрифуга Elmi CM-50, Латвия). Супернатант переносили в виалы для анализа.

### *2.8.3. Методика анализа*

Анализ проводили на хроматографе ACQUITY UPLC H-Class PLUS (Waters, США), оснащенный гибридным времяпролетным масс-спектрометром Xevo G2-XS Tof (Waters, США). Пробу в объеме 0,3 мкл наносили на колонку ACQUITY UPLC

ВЕН C18 (50×2,1 мм, 1,7 мкм; Waters, США). Температура колонки составляла 40°C, объемная скорость потока подвижной фазы – 0,4 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали 0,1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в воде (растворитель А) и 0,1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (растворитель Б). Для подготовки растворителя «А» использовали деионизированную воду (получена на установке Simplicity UV, Millipore, Франция). Ацетонитрил квалификации «LC-MS», фирмы Panreac (Испания). Хроматографическое разделение проводили в режиме градиентного элюирования. В процессе анализа состав подвижной фазы менялся следующим образом (Б, % по объему): 0-1 мин. – 5→15%, 1-5 мин. – 15→30%, 5-15 мин. – 30→38%, 15-23 мин. – 38→65%, 23-25,5 мин. – 65→95%. Анализ осуществляли в режиме детектирования отрицательных ионов (диапазон  $m/z$  100-1900). Параметры источника ионизации: температура источника ионизации – 150°C, температура десольвации – 650°C напряжение на капилляре – 3,0 кВ, напряжение на конусе ввода пробы – 30 В, скорость подачи азота (десольвационный газ) 1101 л/час. Обработку полученных результатов производили с помощью программы MassLynx (Waters, США). Количественное определение содержания индивидуальных тритерпеновых гликозидов проводили методом внешней калибровки против стандартного образца Soyasaponin I (Sigma-Aldrich, США). Относительные стандартные отклонения времени удерживания хроматографического пика Soyasaponin I не превышали 3%. Для определения площадей пиков тритерпеновых гликозидов использовали значения  $m/z$  для соответствующих ионов [M-H+46]- (для Soyasaponin I  $m/z$  987). В рабочем диапазоне концентраций (0,028-28 мкг/мл) калибровочные кривые аппроксимировались прямыми линиями с коэффициентами детерминации ( $R^2$ ) выше 0,999. Минимальная детектируемая концентрация стандарта 0,0028 мкг/мл.

## 2.9. Статистическая обработка результатов

Опыты проводили в 6–12 биологических повторах для каждого варианта обработки. Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программ Microsoft Excel, R studio и языка программирования R. На графиках и в таблицах приведены средние значения и их стандартные ошибки. На всех иллюстрациях значения с одинаковыми буквами не отличаются в соответствии с t-критерием Уэлча для независимых выборок с уровнем вероятности  $p > 0,05$ . Значения с разными буквами указывают на статистически значимые различия с  $p \leq 0,05$ .

Исследования проводилось согласно схеме, представленной на рисунке 2.1.

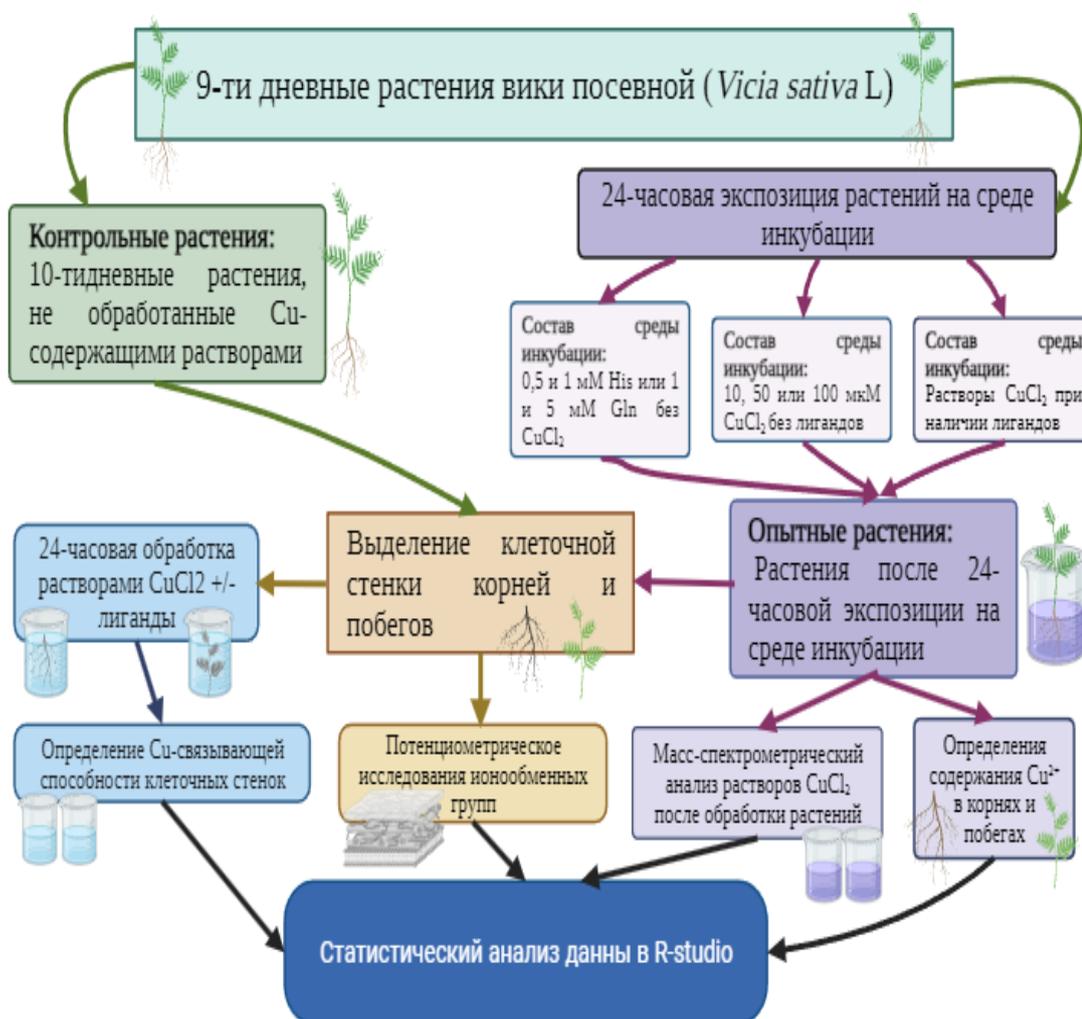


Рисунок 2.1. Схема проведения исследования.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1. Токсическое действие ионов меди на растения вики посевной

Результаты исследования показали, что обработка растений *V. sativa* растворами  $\text{Cu}^{2+}$  в исследуемом диапазоне концентраций приводит к снижению сухой массы как корней, так и побегов (таблица 3.1.). По мере роста концентрации металла в среде инкубации сухая масса органов снижается, при достижении максимального уровня обработки в 100 мкМ в отсутствие лигандов этот показатель для корней и побегов на 20% и 6% ниже по сравнению с контролем, соответственно (таблица 3.1.).

Таблица 3.1. Сухая масса корней ( $m_{\text{корни}}$ , г) и побегов ( $m_{\text{побеги}}$ , г) 9 растений вики после 24 ч обработки растворами  $\text{Cu}^{2+}$  с разной концентрацией ( $C_{\text{Cu}}$ , мкМ).

$C_{\text{Cu}}$	$m_{\text{корни}}$	$m_{\text{побеги}}$
0 (Контроль)	$0,082 \pm 0,002^a$	$0,201 \pm 0,004^{ab}$
10 мкМ	$0,073 \pm 0,018^b$	$0,209 \pm 0,004^a$
50 мкМ	$0,069 \pm 0,019^{bc}$	$0,190 \pm 0,005^b$
100 мкМ	$0,066 \pm 0,020^c$	$0,189 \pm 0,005^b$

В отсутствие  $\text{Cu}^{2+}$  добавление лигандов в среду изменяет сухую массу корней, но не влияет на этот показатель у побегов. Так, в отсутствие  $\text{Cu}^{2+}$  внесение 1 мМ гистидина в среду приводит к снижению сухой массы корней на 9,5%, а добавление глутамин (5 мМ), наоборот, – к увеличению этого показателя на 13% по отношению к контролю (таблица 3.2.).

В присутствии ионов меди в среде инкубации, исследуемые лиганды нивелируют токсическое действие металла на корни растений *V. sativa* (таблица 3.3.). Так, при добавлении His или Gln в среду с начальной концентрацией  $\text{Cu}^{2+}$  10 мкМ сухая масса корней опытных растений не отличается от сухой массы контрольных (таблица 3.3.). Сухая масса побегов в этих условиях увеличивается на

8,5% и 12% при добавлении 1 мМ His и 1 мМ Gln, соответственно, по сравнению с контрольными растениями (таблица 3.3.).

Таблица 3.2. Влияние концентрации лигандов ( $C_{\text{лиганда}}$ , мМ) на сухую массу корней ( $m_{\text{корни}}$ , г) и побегов ( $m_{\text{побеги}}$ , г) девяти растений вики после 24 ч обработки растворами His или Gln в отсутствие  $\text{Cu}^{2+}$ .

$C_{\text{лиганда}}$	$m_{\text{корни}}$ , Г	$m_{\text{побеги}}$ , Г
0 (Контроль)	0,082±0,002 <sup>a</sup>	0,201±0,004 <sup>a</sup>
His 0,5 мМ	0,076±0,004 <sup>ab</sup>	0,201±0,009 <sup>a</sup>
His 1 мМ	0,074±0,001 <sup>b</sup>	0,187±0,01 <sup>a</sup>
Gln 1 мМ	0,087±0,001 <sup>c</sup>	0,194±0,002 <sup>a</sup>
Gln 5 мМ	0,093±0,003 <sup>c</sup>	0,206±0,005 <sup>a</sup>

Таблица 3.3. Влияние лигандов на сухую массу корней ( $m_{\text{корни}}$ , г) и побегов ( $m_{\text{побеги}}$ , г) растений в присутствии 10 мкМ или 100 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$  ( $C_{\text{Cu}}$ , мкМ).

$C_{\text{Cu}}$	$m_{\text{корни}}$ , Г	$m_{\text{побеги}}$ , Г
0 (Контроль)	0,082 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,201 ± 0,004 <sup>a</sup>
10 мкМ	0,073 ± 0,018 <sup>b</sup>	0,209 ± 0,004 <sup>ab</sup>
10 мкМ + His 0,5 мМ	0,081 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,213 ± 0,008 <sup>a</sup>
10 мкМ + His 1 мМ	0,080 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,218 ± 0,006 <sup>bc</sup>
10 мкМ + Gln 1 мМ	0,083 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,224 ± 0,005 <sup>c</sup>
10 мкМ + Gln 5 мМ	0,083 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,210 ± 0,006 <sup>ab</sup>
100 мкМ	0,066 ± 0,020 <sup>c</sup>	0,189 ± 0,005 <sup>a</sup>
100 мкМ + His 0,5 мМ	0,079 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,184 ± 0,009 <sup>a</sup>
100 мкМ + His 1 мМ	0,081 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,195 ± 0,007 <sup>a</sup>
100 мкМ + Gln 1 мМ	0,075 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,195 ± 0,007 <sup>a</sup>
100 мкМ + Gln 5 мМ	0,083 ± 0,005 <sup>a</sup>	0,205 ± 0,013 <sup>a</sup>

При максимальной концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  в среде (100 мкМ), действие лигандов также направлено на снижение токсического действия металла (таблица 3.3). При добавлении гистидина и глутамина в среду инкубации сухая масса корней и побегов растений вики не отличалась от контрольных значений (таблица 3.3).

Результаты свидетельствуют, что избыток  $\text{Cu}^{2+}$  в среде инкубации затрудняет поглощение и дальний транспорт воды в надземные органы *V. sativa* (таблица 3.4.). В отсутствии лигандов по мере увеличения концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  в среде, содержание воды в растениях вики уменьшается и при максимальном уровне обработки (100 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$ ) этот показатель у корней и побегов был ниже контрольных значений на 14,4% и 3%, соответственно (таблица 3.4.). В отсутствии ионов меди в среде обе концентрации гистидина незначительно снижают оводненность корней, не оказывая влияния на дальний транспорт воды. Глутамин, напротив, либо увеличивает содержание воды в корнях (1 мМ Gln), либо не оказывает влияния (5 мМ Gln) (таблица 3.4.).

Таблица 3.4. Оводненность корней ( $K_{\text{корни}}$ , г  $\text{H}_2\text{O}$  / г сухой массы корня) и побегов ( $K_{\text{побеги}}$ , г  $\text{H}_2\text{O}$  / г сухой массы побега) девяти растений вики после 24 ч обработки растворами, содержащими  $\text{Cu}^{2+}$  или лиганды в разной концентрации

Состав среды инкубации	$K_{\text{корни}}$	$K_{\text{побеги}}$
0 (Контроль)	15,871 ± 0,144 <sup>a</sup>	8,941 ± 0,045 <sup>a</sup>
10 мкМ $\text{Cu}^{2+}$	14,905 ± 0,169 <sup>b</sup>	8,759 ± 0,051 <sup>b</sup>
50 мкМ $\text{Cu}^{2+}$	13,725 ± 0,279 <sup>c</sup>	8,801 ± 0,065 <sup>b</sup>
100 мкМ $\text{Cu}^{2+}$	13,593 ± 0,169 <sup>c</sup>	8,686 ± 0,076 <sup>b</sup>
His 0,5 мМ	15,533 ± 0,0001 <sup>b</sup>	8,758 ± 0,072 <sup>a</sup>
His 1 мМ	15,069 ± 0,0055 <sup>c</sup>	8,675 ± 0,215 <sup>a</sup>
Gln 1 мМ	16,411 ± 0,1491 <sup>d</sup>	9,048 ± 0,155 <sup>a</sup>
Gln 5 мМ	15,691 ± 0,0965 <sup>a</sup>	8,957 ± 0,039 <sup>a</sup>

При наличии в среде ионов меди, исследуемые лиганды не оказывают влияния на содержание воды в корнях. Однако, при минимальной обработке растений раствором меди (10 мкМ) обе концентрации гистидина снижают оводненность побегов в среднем на 7% по сравнению с вариантом без лиганда (таблица 3.5). При увеличении концентрации металла до 100 мкМ, His также не оказывает влияния на оводненность корней по сравнению с вариантом без лиганда, а Gln в концентрации 5 мМ ограничивает поглощение воды корнями на 18% по сравнению с контролем (таблица 3.5). В этих же условиях лиганды не оказывали влияния на дальний транспорт воды в побеге по сравнению с вариантом без добавления лигандов (таблица 3.5).

Таблица 3.5. Оводненность корней ( $K_{\text{корни}}$ , г  $\text{H}_2\text{O}$  / г сухой массы корня) и побегов ( $K_{\text{побеги}}$ , г  $\text{H}_2\text{O}$  / г сухой массы побега) растений в зависимости от состава среды инкубации.

Состав среды инкубации	$K_{\text{корни}}$	$K_{\text{побеги}}$
0 (Контроль)	15,871 ± 0,144 <sup>a</sup>	8,941 ± 0,045 <sup>a</sup>
10 мкМ $\text{Cu}^{2+}$	14,905 ± 0,169 <sup>b</sup>	8,759 ± 0,051 <sup>b</sup>
10 мкМ $\text{Cu}^{2+}$ + His 0,5 мМ	15,529 ± 0,249 <sup>a</sup>	8,566 ± 0,07 <sup>c</sup>
10 мкМ $\text{Cu}^{2+}$ + His 1 мМ	15,352 ± 0,206 <sup>b</sup>	8,512 ± 0,051 <sup>c</sup>
10 мкМ $\text{Cu}^{2+}$ + Gln 1 мМ	14,747 ± 0,282 <sup>b</sup>	8,678 ± 0,08 <sup>b</sup>
10 мкМ $\text{Cu}^{2+}$ + Gln 5 мМ	15,197 ± 0,169 <sup>b</sup>	8,696 ± 0,058 <sup>b</sup>
100 мкМ $\text{Cu}^{2+}$	13,593 ± 0,169 <sup>c</sup>	8,686 ± 0,076 <sup>b</sup>
100 мкМ $\text{Cu}^{2+}$ + His 0,5 мМ	13,652 ± 0,264 <sup>c</sup>	8,503 ± 0,11 <sup>b</sup>
100 мкМ $\text{Cu}^{2+}$ + His 1 мМ	13,999 ± 0,286 <sup>c</sup>	8,570 ± 0,09 <sup>b</sup>
100 мкМ $\text{Cu}^{2+}$ + Gln 1 мМ	12,828 ± 0,144 <sup>d</sup>	8,714 ± 0,20 <sup>ba</sup>
100 мкМ $\text{Cu}^{2+}$ + Gln 5 мМ	13,045 ± 0,187 <sup>d</sup>	8,488 ± 0,157 <sup>b</sup>

В ответ на избыток  $\text{Cu}^{2+}$  в среде, в корнях и побегах растений *V. sativa* увеличивается массовая доля КС, при максимальном уровне обработки (100 мкМ

меди) в отсутствие лигандов этот показатель для корней и побегов на 28% и 39% выше контрольных значений, соответственно (таблица 3.6.).

Таблица 3.6. Влияние состава среды инкубации растений на массовую долю клеточной стенки корней ( $D_{корн}$ ) и побегов ( $D_{поб}$ ) в общей массе органа.

Состав среды инкубации	$D_{корн}$	$D_{поб}$
Контроль	0,46±0,003 <sup>a</sup>	0,42±0,007 <sup>a</sup>
10 мкМ Cu <sup>2+</sup>	0,56±0,004 <sup>b</sup>	0,49±0,004 <sup>b</sup>
10 мкМ Cu <sup>2+</sup> + His 1 мМ	0,49±0,007 <sup>e</sup>	0,47±0,004 <sup>d</sup>
10 мкМ Cu <sup>2+</sup> + Gln 5 мМ	0,47±0,009 <sup>ae</sup>	0,44±0,01 <sup>a</sup>
50 мкМ Cu <sup>2+</sup>	0,51±0,02 <sup>c</sup>	—
100 мкМ Cu <sup>2+</sup>	0,59±0,006 <sup>d</sup>	0,59±0,004 <sup>c</sup>
100 мкМ Cu <sup>2+</sup> + His 1 мМ	0,42±0,003 <sup>f</sup>	0,48±0,003 <sup>e</sup>
100 мкМ Cu <sup>2+</sup> + Gln 5 мМ	0,49±0,004 <sup>e</sup>	0,49±0,005 <sup>be</sup>
His 0,5 мМ	0,47±0,008 <sup>a</sup>	—
His 1 мМ	0,44±0,018 <sup>a</sup>	—
Gln 1 мМ	0,46±0,007 <sup>a</sup>	—
Gln 5 мМ	0,45±0,009 <sup>a</sup>	—

В отсутствие ионов меди лиганды не оказывают влияния на массовую долю КС корней. В тоже время, в случае внесения гистидина или глутамина в медьсодержащие растворы этот показатель снижается по сравнению с вариантом без лигандов, как для корней, так и для побегов. Так, у растений на среде инкубации, содержащей 10 мкМ Cu<sup>2+</sup> и 5 мМ Gln, массовая доля КС корней и побегов снижается по сравнению с вариантом без лиганда до контрольных значений. Эффект His в этих условиях проявляется слабее по сравнению с Gln: при 1 мМ His массовая доля КС корней и побегов снижается по сравнению с вариантом без лиганда, однако остается выше контрольных значений на 6,5% и 12%, соответственно (таблица 3.6.).

Аналогичное действие лигандов на массовую долю КС корней и побегов проявляется при увеличении концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  до 100 мкМ (таблица 3.6.) Следует отметить, что эффект гистидина в этом случае проявляется сильнее, чем при минимальном уровне обработки (10 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$ ). При инкубации растений в среде, содержащей 100 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$  и 1 мМ His, массовая доля КС корней ниже контрольных значений на 10% (таблица 3.6.).

### **3.2. Анализ состава ионообменных групп в матриксе КС корней и побегов растений вики посевной**

Экспериментальные кривые потенциометрического титрования имели сложную полисигмоидную форму, что свидетельствует о наличии нескольких типов ионообменных групп в составе структурных полимеров КС. При  $\text{pH} > 10$  значения катионообменной способности КС по  $\text{Na}^+$  достигали максимального уровня ( $S_o^{\text{кат}}$ , таблица 3.7. и 3.8.). Это означает, что все ионогенные группы заняты  $\text{Na}^+$ .  $S_o^{\text{кат}}$  характеризует общее количество кислотных групп, которые имеются в полимерной структуре КС корней вики. Эти группы могут включаться в реакции ионного обмена при соответствующих значениях pH среды.

Обработки растений растворами с концентрацией 10 мкМ и 100 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$  без лигандов оказывают различное влияние на количество ионообменных групп в клеточных стенках корней: в первом случае оно не изменяется, а во втором количество свободных карбоксильных групп ПГК снижается на 4% (таблица 3.7.). Внесение и 1 мМ гистидина, и 5 мМ глутамин в раствор обработки растений с 10 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$  приводит к формированию КС корней со сниженным на 35% или на 29%, соответственно, содержанием карбоксильных групп ПГК по сравнению с вариантом без добавления лигандов (таблица 3.7.). В то же время присутствие His и Gln в среде инкубации растений приводит к возрастанию содержания в КС корней фенольных ОН-групп на 54%. Добавление лигандов к 100 мкМ раствору ионов меди не оказывает влияния на количество карбоксильных групп ПГК по сравнению

с содержанием этих групп в варианте без лигандов, однако приводит к снижению содержания фенольных ОН-групп (таблица 3.7.).

Таблица 3.7. Содержание катионообменных групп каждого типа ( $\Delta S^j$ , мкмоль/г сухой массы КС), значения  $pK_a^j$  для каждой группы и общее содержание катионообменных групп ( $S_o^{kam}$ , мкмоль/г сухой массы КС) в клеточных стенках корней растений вики в зависимости от состава среды инкубации растений.

Состав среды инкубации	$j$	$pK_a^j$	$\Delta S^j$	$S_o^{kam}$
Контроль	1	4,69	520	1590
	2	7,3	420	
	3	9,45	650	
10 мкМ $Cu^{2+}$	1	4,69	520	1590
	2	7,30	420	
	3	9,45	650	
10 мкМ $Cu^{2+}$ + His 1 мМ	1	4,9	340	1840
	2	7,2	500	
	3	9,0	1000	
10 мкМ $Cu^{2+}$ + Gln 5 мМ	1	4,26	370	1870
	2	6,87	500	
	3	9,13	1000	
100 мкМ $Cu^{2+}$	1	4,59	500	1800
	2	7,1	400	
	3	8,85	900	
100 мкМ $Cu^{2+}$ + His 1 мМ	1	4,63	500	1400
	2	7,01	400	
	3	9,53	500	
100 мкМ $Cu^{2+}$ + Gln 5 мМ	1	4,76	500	1400
	2	7,06	400	

	3	9,04	500	
--	---	------	-----	--

$j$  – тип группы; 1 – карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты, 2 – карбоксильные группы гидроксикоричных кислот, 3 – фенольные ОН-группы.

Обработка растений вики 10 мкМ раствором меди без лигандов вызывает увеличение количества свободных карбоксильных групп ПГК в составе КС побегов, при этом содержание гидроксикоричных кислот (ГКК) снижается по сравнению с контролем. Добавление лигандов в среду инкубации дополнительно увеличивает количество ПГК (таблица 3.8.). Содержание фенольных ОН-групп максимально в КС побегов контрольных растений.

Таблица 3.8. Содержание катионообменных групп каждого типа ( $\Delta S^j$ , мкмоль/г сухой массы КС), значения  $pK_a^j$  для каждой группы и общее содержание катионообменных групп ( $S_o^{кат}$ , мкмоль/г сухой массы КС) в клеточных стенках побегов растений вики в зависимости от состава среды инкубации растений.

Состав среды инкубации	$j$	$pK_a^j$	$\Delta S^j$	$S_o^{кат}$
Контроль	1	4,69	625	2158
	2	7,5	533	
	3	9,75	1000	
10 мкМ	1	4,34	670	2020
	2	7,09	450	
	3	9,75	900	
10 мкМ + His 1 мМ	1	4,28	720	2040
	2	7,25	570	
	3	9,54	750	
10 мкМ + Gln 5 мМ	1	4.43	710	1990
	2	7.31	480	

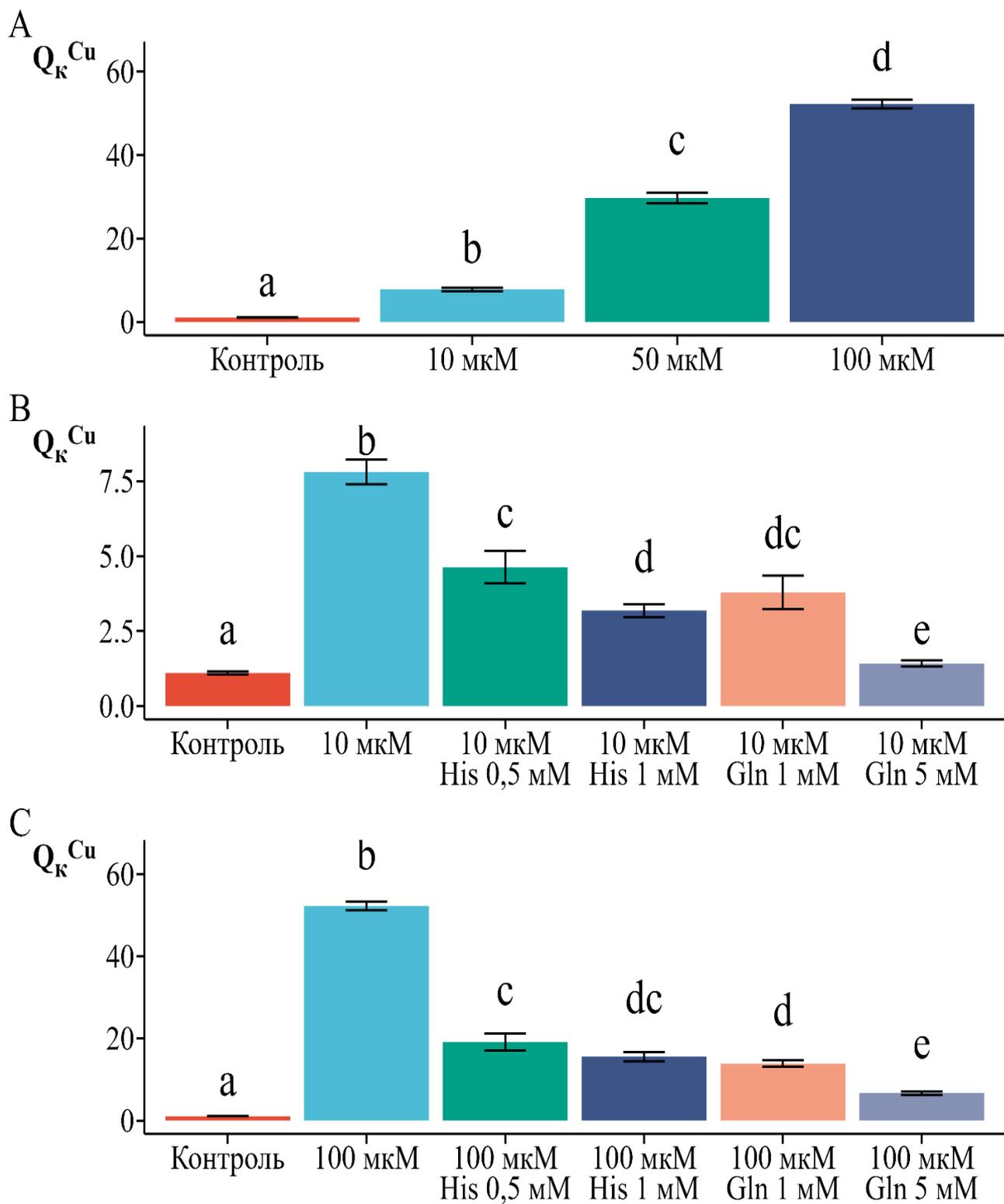
	3	9.35	800	
--	---	------	-----	--

*j* – тип группы: 1 – карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты, 2 – карбоксильные группы гидроксикоричных кислот, 3 – фенольные ОН-группы. Приведены средние значения из 3 биологических повторностей.

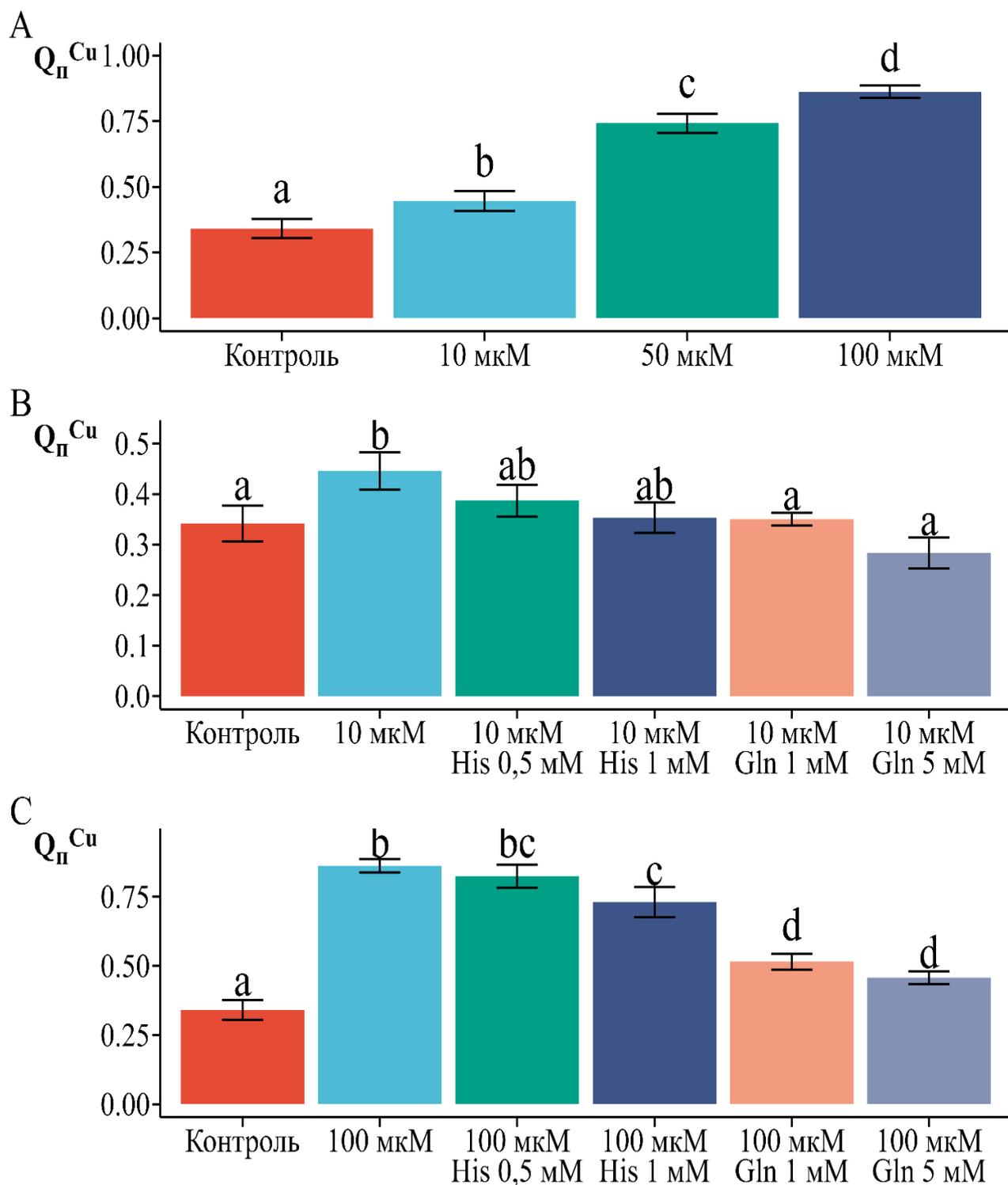
### 3.3. Накопление ионов меди в тканях растений вики посевной

Полученные результаты свидетельствуют, что по мере увеличения концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  в среде, её содержание в корнях также увеличивается (рисунок 3.1. А). При максимальном уровне обработки (100 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$ ) без лигандов эндогенное содержание меди в корнях достигает 52 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$  на 1 г сухой массы органа (рисунок 3.1. А). Часть  $\text{Cu}^{2+}$  транспортируется в побеги, что выражается в увеличении содержания металла в надземной части растений (рисунок 3.2. А), которое не превышает 0,9  $\text{Cu}^{2+}$  на 1 г сухой массы органа. Таким образом, можно заключить, что у растений *V. sativa*  $\text{Cu}^{2+}$  накапливаются преимущественно в корнях, так как при максимальной обработке в корнях накапливается более чем в 50 раз больше металла, чем транспортируется в надземные органы (рисунок 3.1. А и рисунок 3.2. А).

Действие исследуемых лигандов направлено на ограничение поступления ионов меди в растения *V. sativa* и дальнего транспорта иона. Так, при начальной концентрации металла в среде 10 мкМ, добавление 1 мМ гистидина или 5 мМ глутамин приводит к снижению содержания  $\text{Cu}^{2+}$  в тканях корней соответственно в 2,5 или 5,5 раз по сравнению с вариантом без лигандов (рисунок 3.1. В). В этих условиях содержание металла в надземных органах снижается по сравнению с вариантом без лигандов до контрольных значений (рисунок 3.2. В).



**Рисунок 3.1. Эндогенное содержание  $\text{Cu}^{2+}$  ( $Q_K^{\text{Cu}}$  – мкмоль  $\text{Cu}^{2+}$  на г сухой массы органа) в корнях растений *V. sativa* в зависимости от состава среды инкубации: А – Эндогенное содержание  $\text{Cu}^{2+}$  в корнях в зависимости от концентрации меди в среде; В – Эндогенное содержание  $\text{Cu}^{2+}$  в корнях в зависимости от концентрации лигандов при начальной концентрации меди 10 мкМ; С – Эндогенное содержание  $\text{Cu}^{2+}$  в корнях в зависимости от концентрации лигандов при концентрации меди 100 мкМ.**



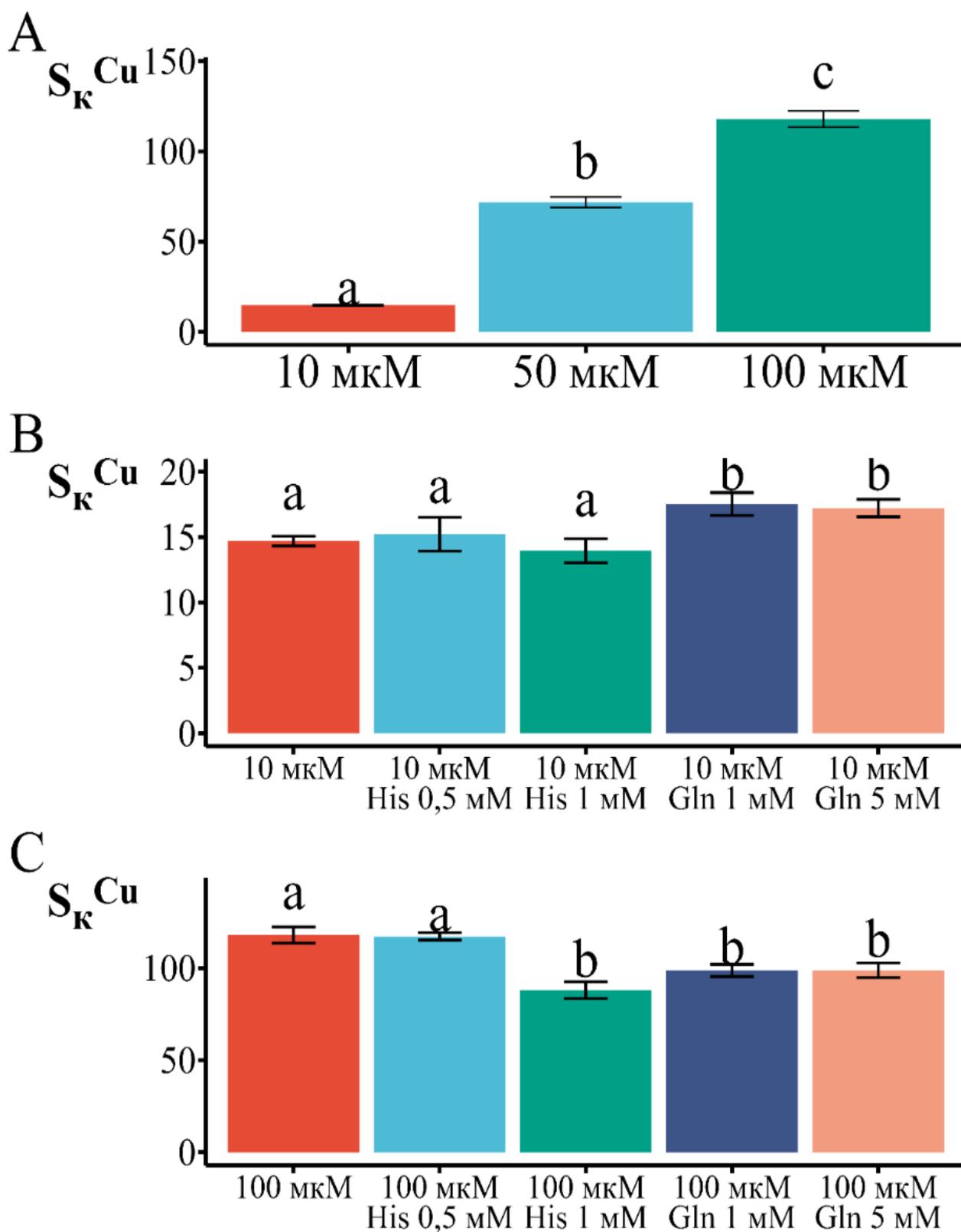
**Рисунок 3.2.** Эндогенное содержание  $Cu^{2+}$  ( $Q_{II}^{Cu}$  – мкмоль  $Cu^{2+}$  на г сухой массы органа) в побегах растений *V. sativa* в зависимости от состава среды инкубации: А – Эндогенное содержание  $Cu^{2+}$  в побегах в зависимости от концентрации меди в среде; В – Эндогенное содержание  $Cu^{2+}$  в побегах в зависимости от концентрации лигандов при начальной концентрации меди 10 мкМ; С – Эндогенное содержание  $Cu^{2+}$  в побегах в зависимости от концентрации лигандов при концентрации меди 100 мкМ.

При концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  100 мкМ, действие лигандов проявляется сильнее, чем при 10 мкМ, так как внесение в среду 1 мМ гистидина или 5 мМ глутамин приводит к снижению содержания  $\text{Cu}^{2+}$  в корне в 3 или 8 раз, соответственно, по сравнению с вариантом без лигандов (рисунок 3.1. С). В этих условиях лиганды ограничивают и дальний транспорт  $\text{Cu}^{2+}$ . Также как в корнях, в надземных органах внесение в среду 1 мМ гистидина или 5 мМ глутамин приводит к снижению содержания металла в побегах на 47% или в 2 раза соответственно по сравнению с вариантом без лиганда (рисунок 3.2. С).

### **3.4. Медь-связывающая способность клеточных стенок, изолированных из корней и побегов растений вики посевной**

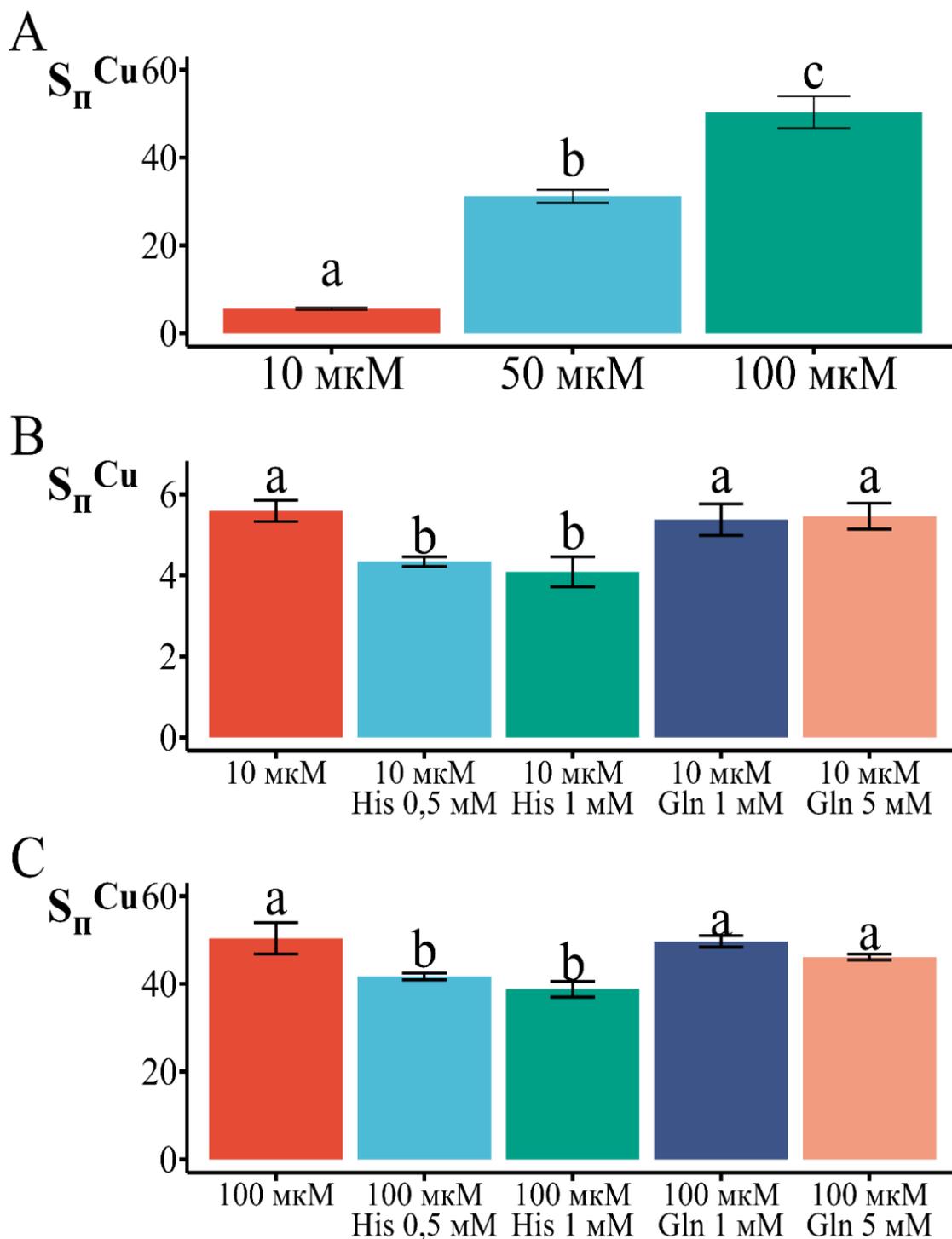
Также как в случае с целыми растениями, по мере роста концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  в растворе обработки клеточных стенок адсорбция металла в КС корней и побегов увеличивается (рисунок 3.3. А и рисунок 3.4 А). Важно отметить, что во всех вариантах обработки в отсутствие лигандов медь-связывающая способность КС корней в среднем в 2 раза выше, чем КС побегов (рисунок 3.3. А и рисунок 3.4 А). Так, например, при наличии в растворе обработки 100 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$ , адсорбционная способность КС корней достигает 118 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$  на 1 г сухой массы корня, в тоже время для КС побегов этот показатель составляет лишь 50,4 мкмоль  $\text{Cu}^{2+}$  на 1 г сухой массы побега.

При начальной концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  10 мкМ гистидин не оказывает влияния на адсорбцию металла КС корней (рисунок 3.3. В), однако для КС побегов этот показатель снижается в среднем на 24% по сравнению с вариантом без лиганда (рисунок 3.4. В). Присутствие глутамин в среде незначительно увеличивает адсорбцию ионов меди КС корней (~4%), не оказывая влияния на этот показатель у КС побегов (рисунок 3.3. В и рисунок 3.4 В).



**Рисунок 3.3.** Адсорбционная способность КС корней ( $S_k^{Cu}$  – мкмоль  $Cu^{2+}$  на г сухой массы корня) в зависимости от состава среды инкубации: А – адсорбционная способность КС корней в отсутствии лигандов; В – влияние лигандов на адсорбцию  $Cu^{2+}$  КС корней при начальной концентрации ионов меди

10 мкМ; С – влияние лигандов на адсорбцию  $\text{Cu}^{2+}$  КС корней при начальной концентрации ионов меди 100 мкМ.



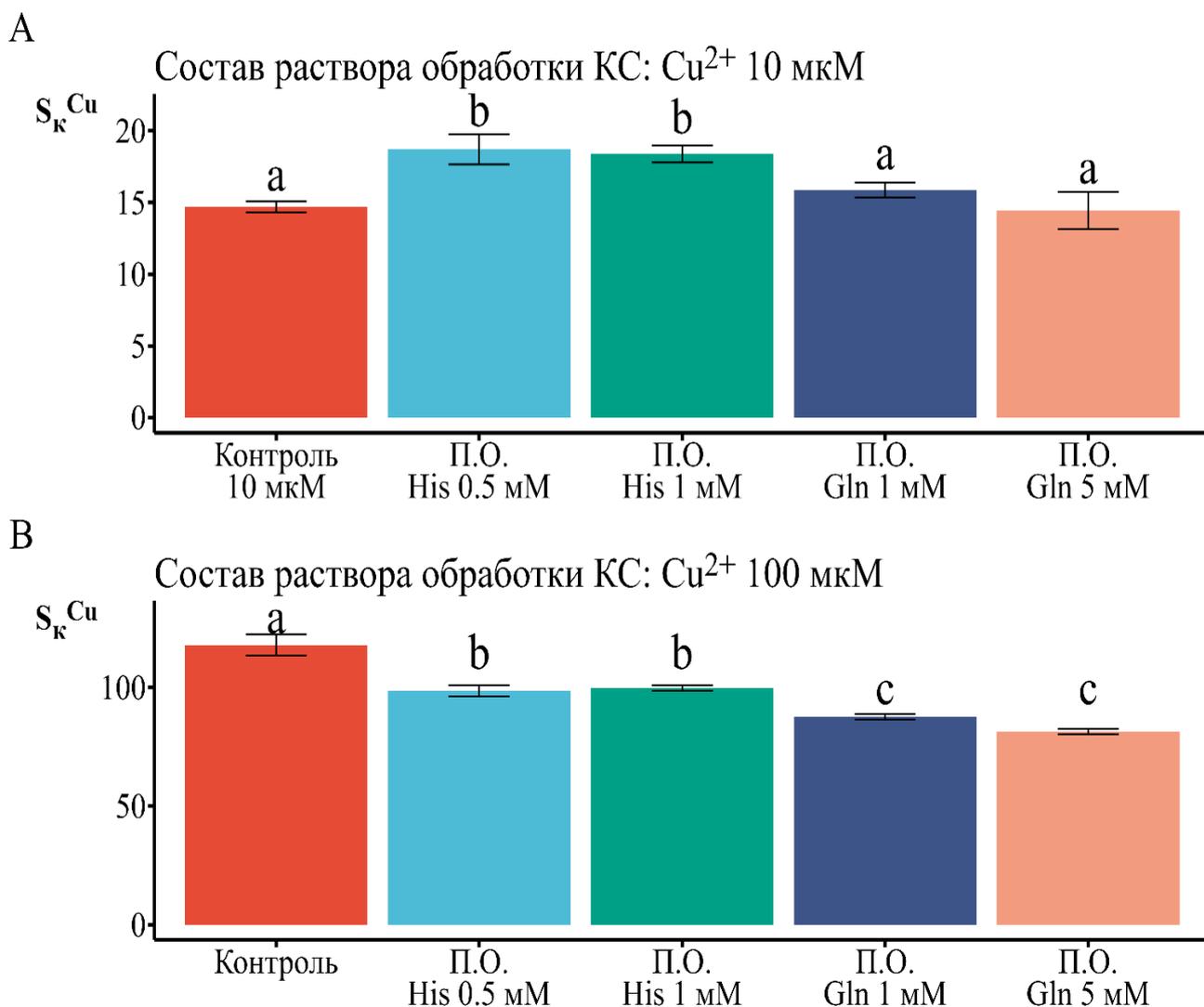
**Рисунок 3.4.** Адсорбционная способность КС побегов ( $S_{\text{II}}^{\text{Cu}}$  – мкмоль  $\text{Cu}^{2+}$  на г сухой массы побега) в зависимости от состава раствора обработки: А – адсорбционная способность КС побегов в отсутствии лигандов; В – влияние лигандов на адсорбцию  $\text{Cu}^{2+}$  КС побегов при начальной концентрации ионов меди 10 мкМ; С – влияние лигандов на адсорбцию  $\text{Cu}^{2+}$  КС побегов при начальной концентрации ионов меди 100 мкМ.

При максимальном уровне обработки КС ( $100 \text{ мкМ Cu}^{2+}$ ) внесение как  $1 \text{ мМ}$  гистидина, так и обеих концентраций глутамина приводит к снижению адсорбционной способности клеточных стенок корней на  $25\%$  и  $\sim 17,5\%$ , соответственно, по сравнению с вариантом без добавления лиганда (рисунок 3.3. С). Обе концентрации глутамина не оказывают влияния на адсорбционную способность КС побегов при начальной концентрации металла  $100 \text{ мкМ}$ , а присутствие гистидина в среде приводит к снижению адсорбции  $\text{Cu}^{2+}$  в этих условиях в среднем на  $20\%$  по сравнению с вариантом без лиганда (рисунок 3.4. С).

На рисунке 3.5. представлены данные о влиянии гистидина и глутамина на модификацию КС корней в отсутствие  $\text{Cu}^{2+}$ . Эксперимент проводили следующим образом: девятидневные растения вики пересаживали на среду инкубации, содержащую исследуемые лиганды, но не содержащую ионов меди. По истечении 24 часов из корней обработанных растений выделяли КС, препараты которой затем помещались в растворы меди  $10 \text{ мкМ}$  и  $100 \text{ мкМ}$  в отсутствие лигандов. На рисунке 3.5. «П.О.» отражает адсорбционную способность КС корней растений, предварительно обработанных растворами лигандов.

Клеточные стенки, изолированные из корней растений после предобработки  $0,5$  и  $1 \text{ мМ}$  растворами гистидина поглощают на  $\sim 21\%$  больше металла из  $10 \text{ мкМ}$  раствора  $\text{Cu}^{2+}$  по сравнению с КС контрольных, т.е. необработанных раствором лиганда корней. Предобработка растений растворами глутамина не оказывала влияния на адсорбционную способность КС корней в отношении ионов меди при начальной концентрации металла в растворе обработки КС  $10 \text{ мкМ}$  (рисунок 3.5.А).

При максимальном уровне обработки ( $100 \text{ мкМ Cu}^{2+}$ ) КС корней растений, предварительно обработанных растворами лигандов, происходит снижение адсорбционной способности КС. Так, предобработка растений растворами гистидина и глутамина в отсутствие  $\text{Cu}^{2+}$  снижает адсорбционную способность КС корней на  $16\%$  и  $28\%$ , соответственно, по сравнению с контрольными значениями (рисунок 3.5 В).



**Рисунок 3.5. Адсорбционная способность КС корней растений *V. sativa*, предварительно обработанных растворами лигандов в отсутствии  $\text{Cu}^{2+}$ : А – Влияние предобработки растений лигандами на адсорбционную способность КС корней при 10 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$  в среде инкубации КС; В – Влияние предобработки растений лигандами на адсорбционную способность КС корней при 100 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$  в среде инкубации КС.**

Клеточные стенки, выделенные из корней растений, обработанных растворами меди 10 и 50 мкМ в отсутствие лигандов, характеризуются более высокой медь-связывающей способностью в расчете на 1 г сухой массы корня по сравнению с «контрольной» КС (таблица 3.9.). Однако эта разница становится статистически незначимой в пересчете на 1 г сухой массы КС (таблица 3.9.), что обусловлено большей массовой долей КС в сухой массе корня у опытных растений по сравнению с контрольными (таблица 3.6). Обработка растений 100 мкМ меди

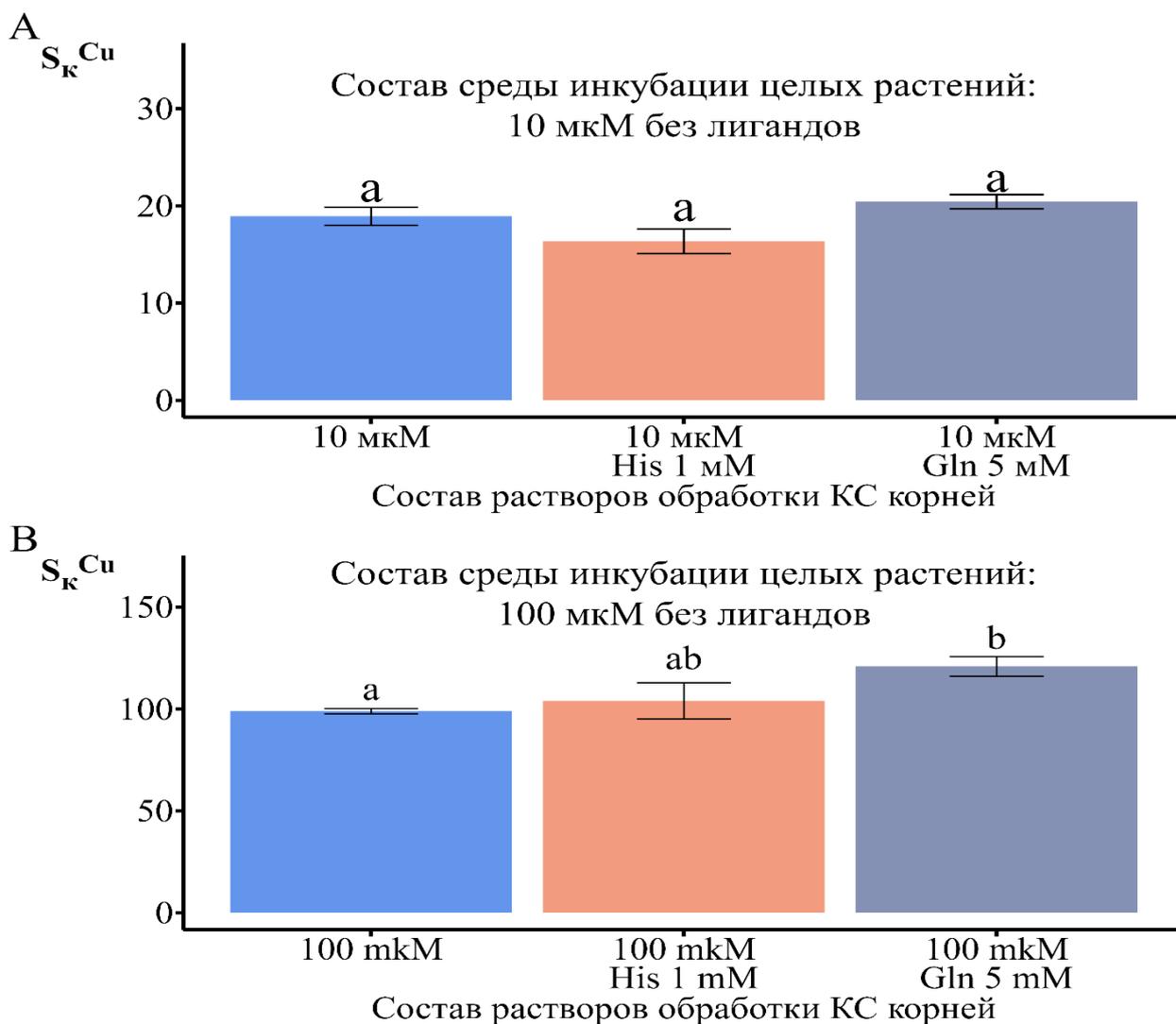
вызывает снижение медь-связывающей способности клеточных стенок корней, и этот эффект сохраняется и в расчете на 1 г сухой массы КС (таблица 3.9.).

Таблица 3.9. Сравнительный анализ адсорбционной способности клеточных стенок корней растений ( $S_{Cu}$ ), выращенных в контрольных и опытных условиях при разной концентрации  $Cu^{2+}$  ( $C_{Cu}$ , мкМ) в среде.

$C_{Cu}$	Растения	$S_{Cu}$ (мкмоль/г сухой массы корней)	$S_{Cu}$ (мкмоль/г сухой массы КС корней)
10 мкМ	Контроль	15,25±0,43 <sup>a</sup>	34,90±0,94 <sup>a</sup>
	Опыт	18,93±0,93 <sup>b</sup>	40,15±4,23 <sup>a</sup>
50 мкМ	Контроль	71,87±2,94 <sup>c</sup>	158,78±4,15 <sup>b</sup>
	Опыт	88,28±2,73 <sup>d</sup>	163,47±5,27 <sup>b</sup>
100 мкМ	Контроль	117,94±4,41 <sup>e</sup>	241,19±10,85 <sup>c</sup>
	Опыт	98,87±1,33 <sup>f</sup>	195,34±2,32 <sup>d</sup>

*Примечание: В таблице «Контроль» отражает адсорбцию ионов меди клеточными стенками, выделенными из контрольных 10-дневных растений. Опыт – растения с 9 на 10 день пересаживали на растворы меди без добавления лигандов с последующим (через 24 часа) выделением КС из корней. Адсорбционную способность измеряли по раствору того же состава, что и растворы для обработки растений.*

Добавление лигандов в раствор обработки КС корней растений, обработанных 10 мкМ  $Cu^{2+}$  не оказывает влияния на адсорбцию металла КС (рисунок 3.6. А). При увеличении концентрации меди до 100 мкМ, внесение глутамина в раствор обработки клеточной стенки, изолированной из корней опытных растений, незначительно увеличивает связывание ионов меди КС корней (рисунок 3.6. В).

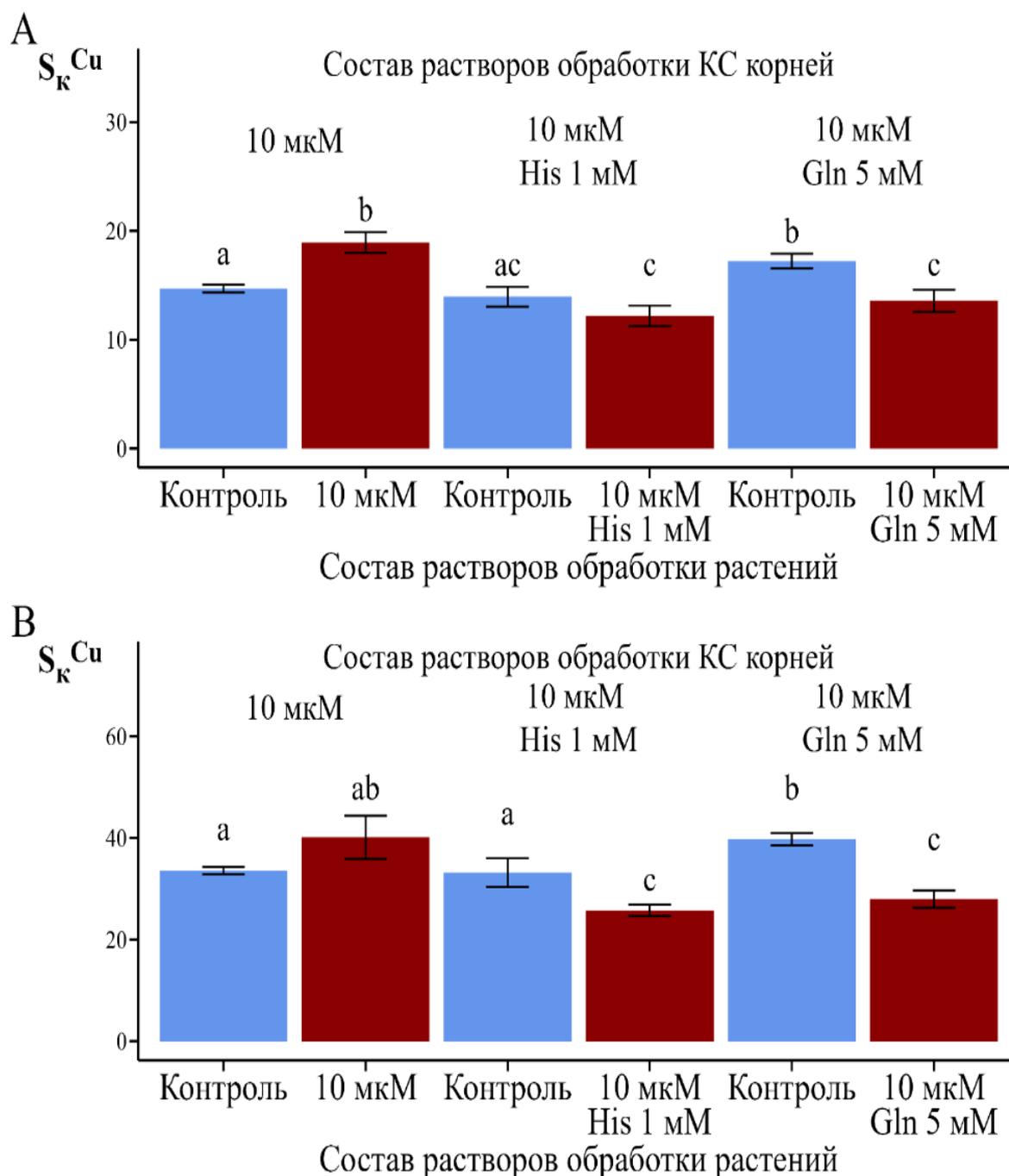


**Рисунок 3.6. Влияние лигандов на адсорбцию  $\text{Cu}^{2+}$  КС корней растений, предварительно обработанных растворами 10 (А) или 100 мкМ (В)  $\text{Cu}^{2+}$ .**

*Примечание: Растения с 9 на 10 день пересаживали на растворы меди 10 и 100 мкМ без добавления лигандов с последующим (через 24 часа) выделением КС из корней. Адсорбционную способность КС измеряли по раствору  $\text{CuCl}_2$  с добавлением 1 мМ His или 5 мМ Gln.*

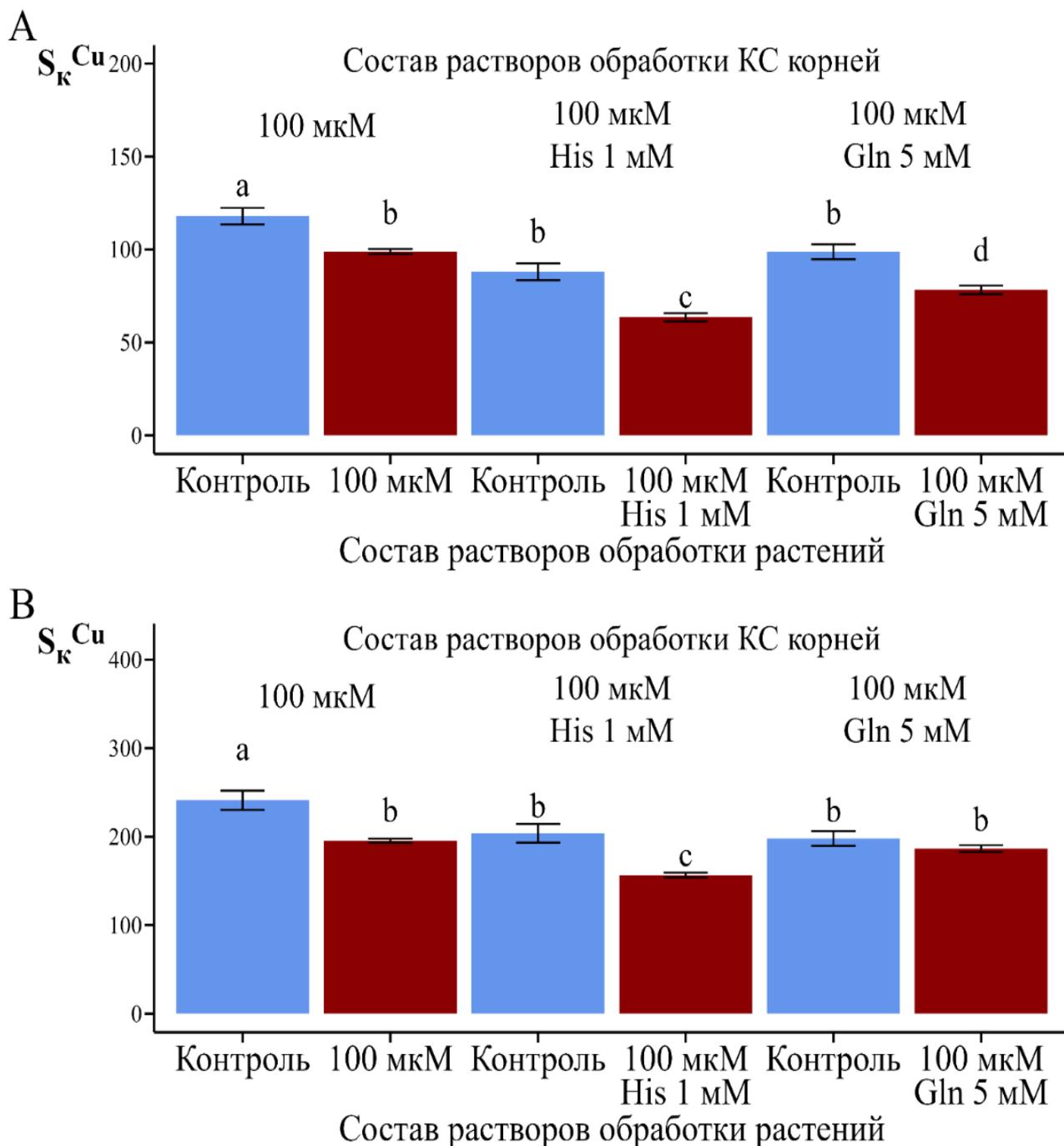
Внесение лигандов в раствор обработки растений с концентрацией меди 10 мкМ приводит к формированию КС корней со сниженной на ~22% адсорбционной способностью по сравнению с КС контрольных растений (рисунок 3.7 А). В пересчете на 1 г сухой массы КС в этих же условиях разница увеличивается до 30% (рисунок 3.7. В). Внесение лигандов в среду инкубации, содержащую 100 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$ , приводило к снижению Cu-связывающей способности КС корней при расчете

на 1 г сухой массы корня (рисунок 3.8 А), однако при расчете на единицу массы КС снижение наблюдалось только для 1 мМ гистидина (рисунок 3.8 В).



**Рисунок 3.7. Влияние лигандов на Cu-связывающую способность ( $S_k^{Cu}$ , мкмоль  $Cu^{2+}$ /г сухой массы) КС корней контрольных и опытных растений, инкубированных в среде, содержавшей 10 мкМ: А – расчет  $S_k^{Cu}$  в мкмоль  $Cu^{2+}$  на 1 г сухой массы корня; В – расчет  $S_k^{Cu}$  в мкмоль  $Cu^{2+}$  на 1 г сухой массы клеточной стенки корня.**

*Примечание:* «Контроль» – КС, изолированная из корней растений, выращенных на среде без  $CuCl_2$ . «Опыт» – КС, изолированная из корней растений, обработанных растворами 10 мкМ  $CuCl_2$  в присутствии лигандов.



**Рисунок 3.8.** Влияние лигандов на **Cu-связывающую способность** ( $S_{\text{к}}^{\text{Cu}}$ ,  $\mu\text{моль Cu}^{2+}/\text{г}$  сухой массы) КС корней контрольных и опытных растений, инкубированных в среде, содержащей 100  $\mu\text{мМ}$ : А – расчет  $S_{\text{к}}^{\text{Cu}}$  в  $\mu\text{моль Cu}^{2+}$  на 1 г сухой массы корня; В – расчет  $S_{\text{к}}^{\text{Cu}}$  в  $\mu\text{моль Cu}^{2+}$  на 1 г сухой массы клеточной стенки корня.

*Примечание:* «Контроль» – КС, изолированная из корней растений, выращенных на среде без  $\text{CuCl}_2$ . «Опыт» – КС, изолированная из корней растений, обработанных растворами 100  $\mu\text{мМ}$   $\text{CuCl}_2$  в присутствии лигандов.

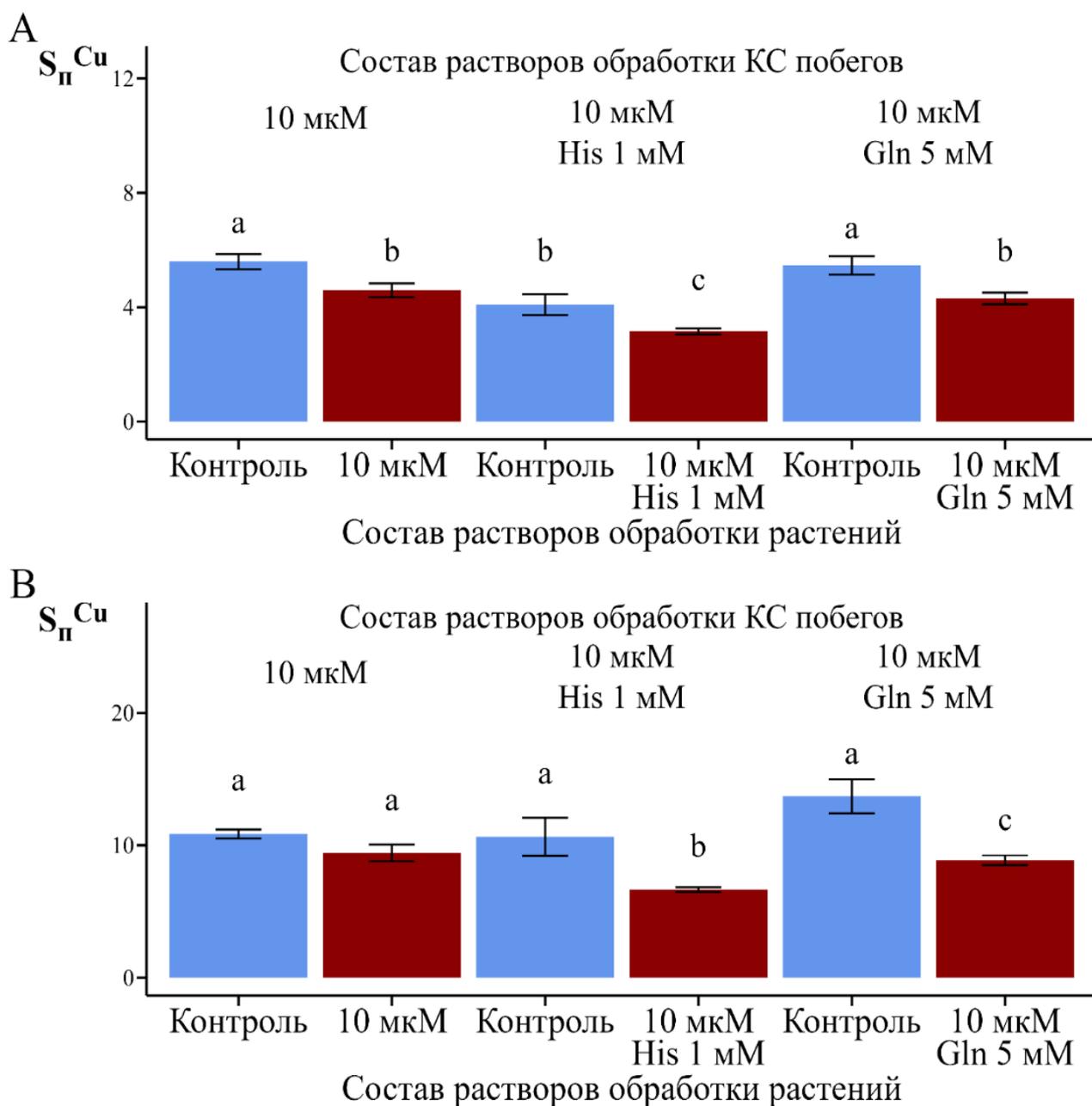
В отсутствии лигандов обработка растений растворами меди 10 и 100 мкМ приводит к снижению адсорбционной способности КС побегов на ~18% по сравнению с контрольными растениями в расчете на 1 г сухой массы надземных органов (таблица 3.10.). Однако, в пересчете на 1 г сухой массы КС побегов медь-связывающая способность «опытных» КС не отличается от «контроля» (таблица 3.10.).

Таблица 3.10. Сравнительный анализ адсорбционной способности клеточных стенок побегов растений ( $S_{Cu}$ ), выращенных в контрольных и опытных условиях при разной концентрации  $Cu^{2+}$  ( $C_{Cu}$ , мкМ) в среде.

$C_{Cu}$	Растения	$S_{Cu}$ (мкмоль $Cu^{2+}$ /г сухой массы побегов)	$S_{Cu}$ (мкмоль $Cu^{2+}$ /г сухой массы КС побегов)
10	Контроль	5,59±0,27 <sup>a</sup>	10,86±0,33 <sup>a</sup>
	Опыт	4,59±0,24 <sup>b</sup>	9,42±1,4 <sup>a</sup>
100	Контроль	50,36±3,56 <sup>c</sup>	94,31±4,35 <sup>b</sup>
	Опыт	41,79±1,6 <sup>d</sup>	89,39±5,06 <sup>b</sup>

*Примечание. В таблице «Контроль» отражает адсорбцию ионов меди клеточными стенками, выделенными из побегов контрольных 10-дневных растений. Опыт – 9-дневные растения пересаживали на растворы меди без добавления лигандов с последующим (через 24 ч) выделением КС из побегов. Адсорбционную способность КС измеряли в растворах того же состава, что и для обработки растений.*

Добавление гистидина и глутаминна к растворам обработки растений, содержащим 10 мкМ меди, приводит к снижению адсорбционной способности КС побегов в отношении  $Cu^{2+}$  в среднем на 22% по сравнению с контролем (рисунок 3.9. А). В пересчете на 1 г сухой массы клеточной стенки побега это различие увеличивается до 37,6% (рисунок 3.9. В).

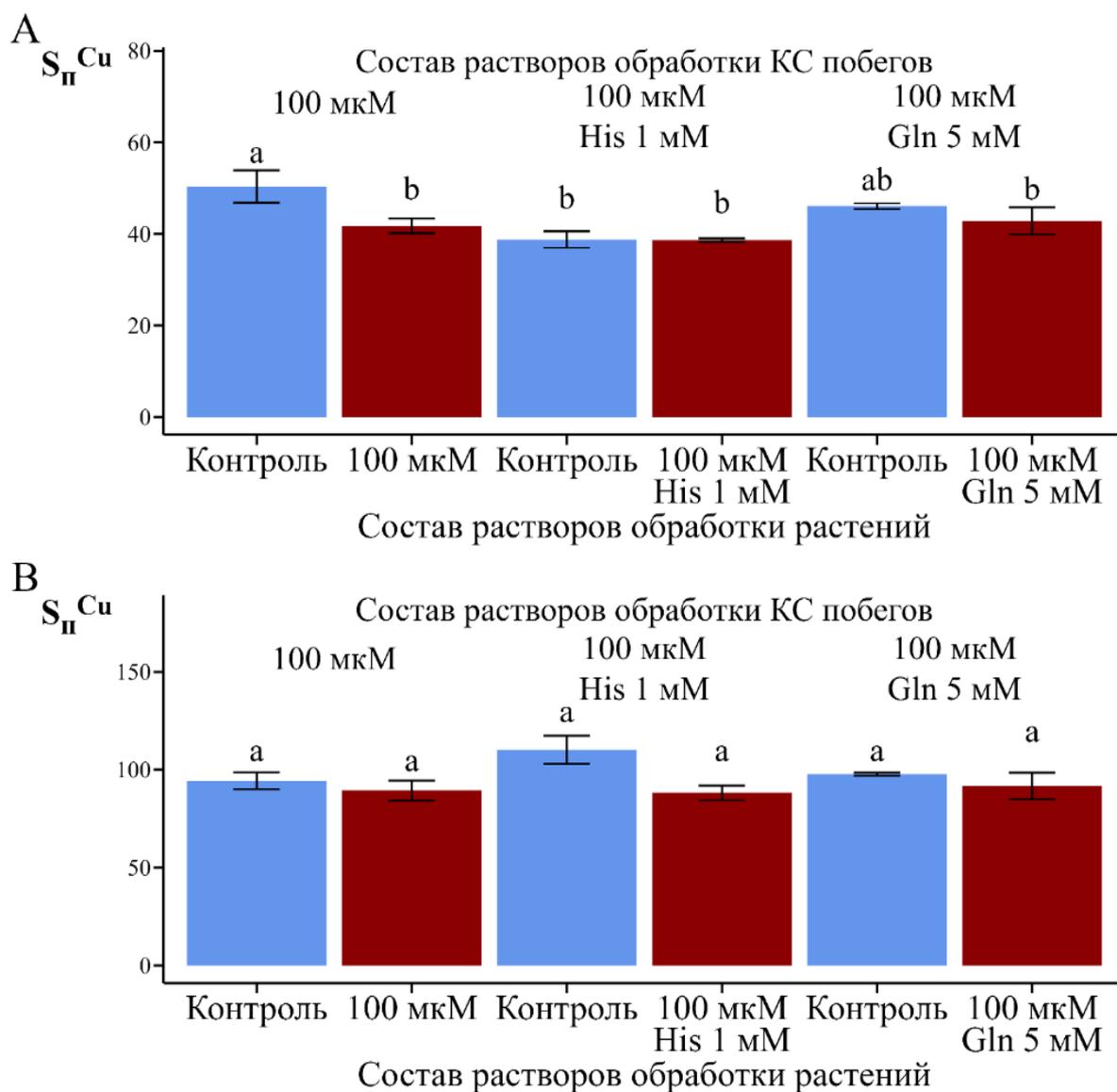


**Рисунок 3.9.** Влияние лигандов на  $\text{Cu}$ -связывающую способность ( $S_{\text{II}}^{\text{Cu}}$ ,  $\mu\text{моль Cu}^{2+}/\text{г}$  сухой массы) КС побегов контрольных и опытных растений, при концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  в растворах 10  $\mu\text{М}$ : А – расчет на 1 г сухой массы побегов; В – расчет на 1 г сухой массы КС побегов.

«Контроль» – КС, изолированная из побегов растений, выращенных на среде без  $\text{CuCl}_2$ . «Опыт» – КС, изолированная из побегов растений, обработанных растворами 10  $\mu\text{М}$   $\text{CuCl}_2$  с добавлением 1  $\text{мМ}$  гистидина или 5  $\text{мМ}$  глутамина.

Однако, в отличие от КС корней, медь-связывающая способность КС, выделенных из побегов растений, обработанных растворами 100  $\mu\text{М}$   $\text{Cu}^{2+}$  с добавлением 1  $\text{мМ}$  гистидина или 5  $\text{мМ}$  глутамина, достоверно не отличалась от

контроля в расчете на 1 г сухой массы КС (рисунок 3.10 В). Следует отметить, что массовая доля КС в побегах снижается при добавлении лигандов и к 10, и к 100 мкМ меди в среде по сравнению с вариантами без лигандов. Таким образом, в побегах модификация состава КС происходит только в случае добавления лигандов в среду выращивания с 10 мкМ меди.



**Рисунок 3.10. Влияние лигандов на Cu-связывающую способность ( $S_{II}^{Cu}$ , мкмоль/г сухой массы КС побега) КС побегов контрольных и опытных растений, при концентрации  $Cu^{2+}$  в растворах 100 мкМ: А – расчет на 1 г сухой массы побегов; В – расчет на 1 г сухой массы КС побегов.**

«Контроль» – КС, изолированная из побегов растений, выращенных на среде без  $CuCl_2$ . «Опыт» – КС, изолированная из побегов растений, обработанных растворами 100 мкМ  $CuCl_2$  с добавлением 1 мМ гистидина или 5 мМ глутамина.

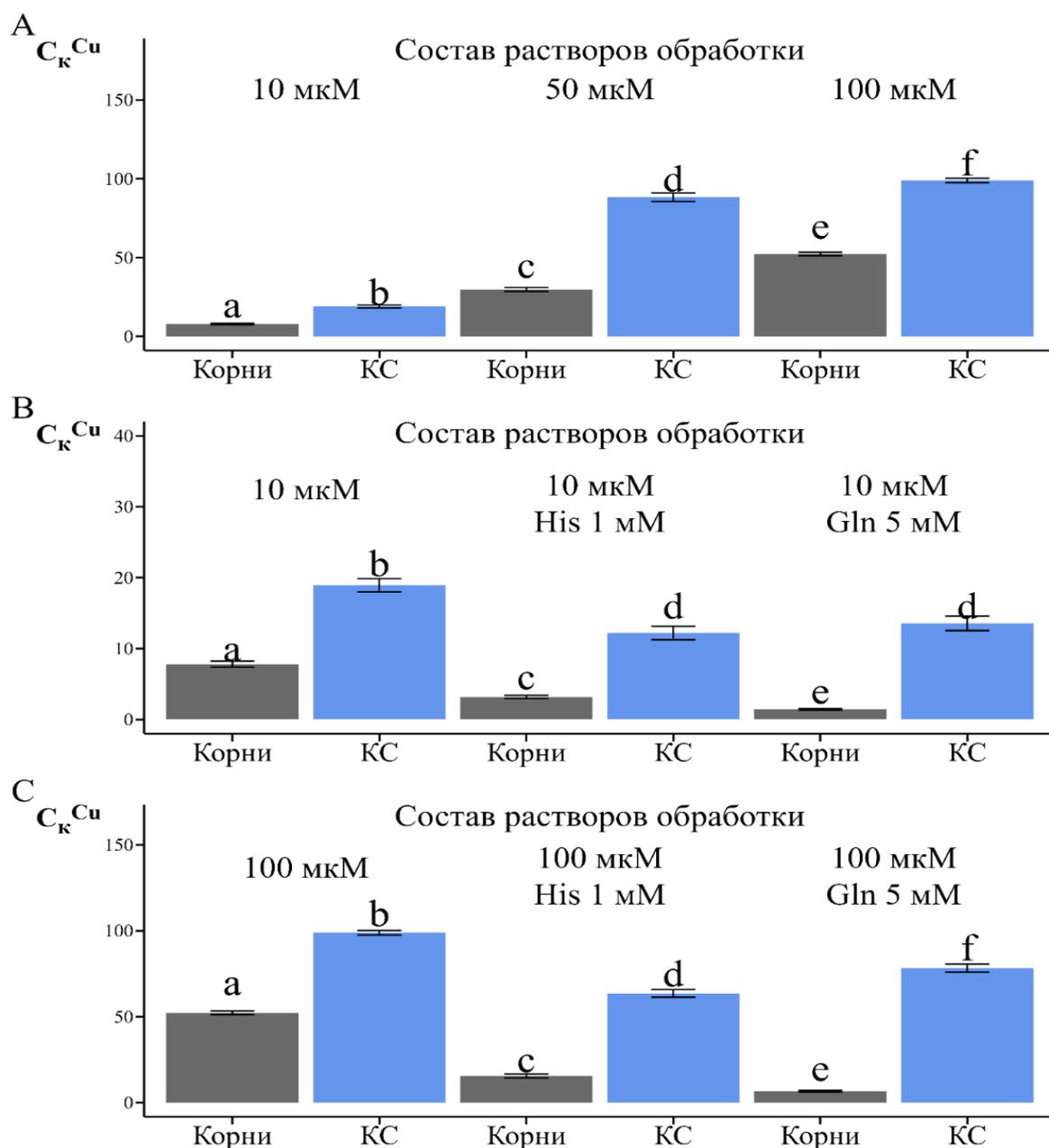
### **3.5. Сравнительный анализ потенциальной адсорбционной способности КС корней и эндогенного содержания ионов меди в корнях растений вики посевной**

Сравнительный анализ данных показывает, что потенциальная адсорбционная способность КС корней в отношении ионов меди во много раз превосходит эндогенное содержание металла в корнях интактных растений. Например, при начальной концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  100 мкМ, потенциальная способность КС корней адсорбировать  $\text{Cu}^{2+}$  в 2,25 раз выше содержания металла в корнях растений, обработанных таким же по составу раствором (рисунок 3.11. А).

Добавление лигандов снижает как содержание металла в корнях, так и в КС корней. Тем не менее, как показано на рисунке 3.11. В, внесение лигандов в среду, содержащую  $\text{Cu}^{2+}$ , увеличивает разницу между потенциальной адсорбционной способностью КС корней и содержанием металла в тканях корня. Например, при добавлении 5 мМ глутамина к растворам меди с концентрацией 10 мкМ, потенциальная способность КС корней связывать ионы металла в ~13 раз превосходит содержание меди в корнях интактных растений (рисунок 3.11. В). При увеличении уровня обработки до 100 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$  разница между адсорбционной способностью КС и эндогенным содержанием металла в корнях еще больше увеличивается (рисунок 3.11. С).

Наличие столь значимых различий между адсорбцией ионов меди КС корней и содержанием металла в корнях указывает на то, что в растениях *V. sativa* Cu-связывающая способность КС корней не реализуется в полной мере.

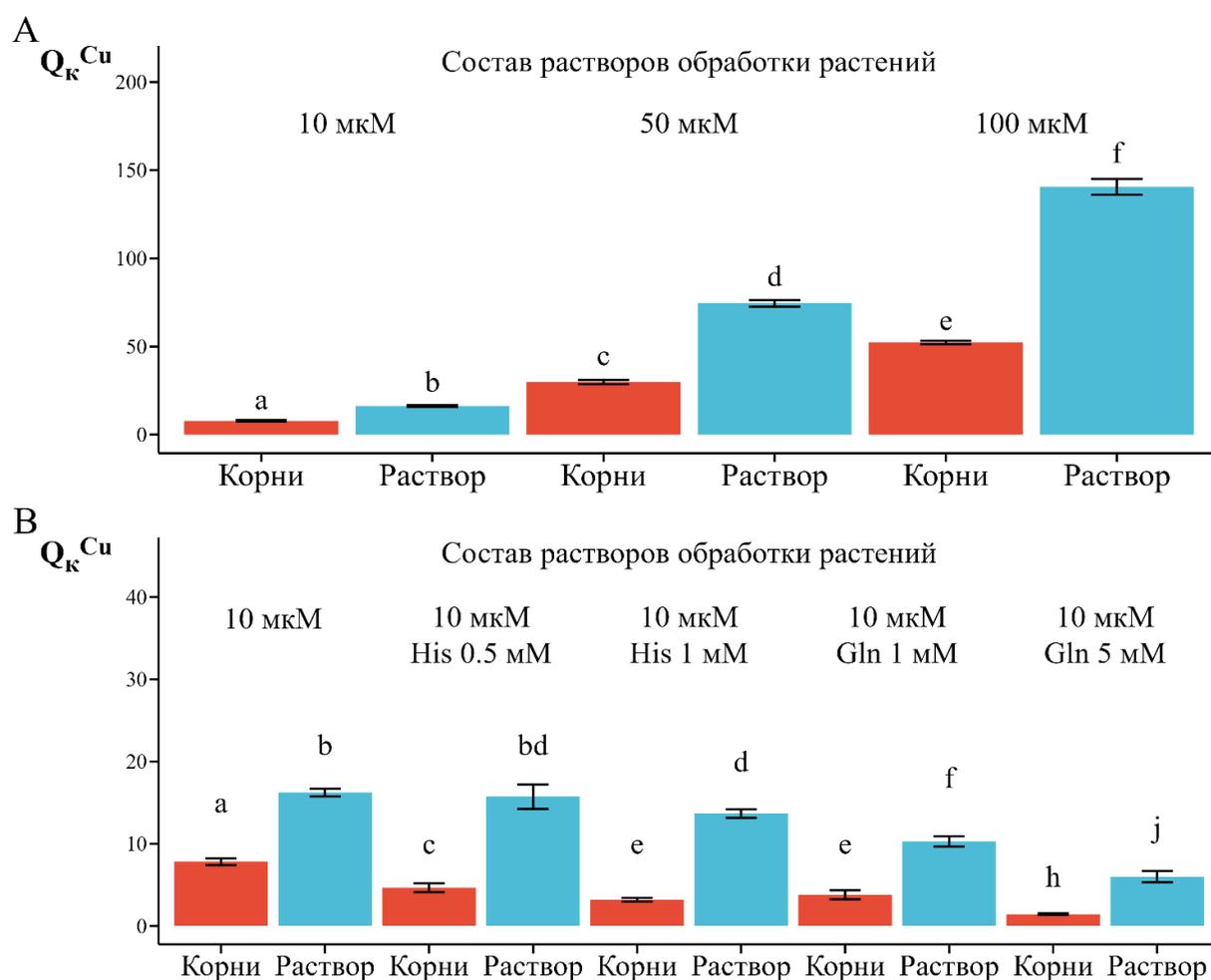
Измерение поглощения  $\text{Cu}^{2+}$  корнями растений возможно проводить двумя методами: по убыли металла из раствора обработки растений и по определению эндогенного содержания меди в тканях растений (рисунок 3.12.).



**Рисунок 3.11. Сравнение адсорбционной способности клеточной стенки корней с эндогенным содержанием  $Cu^{2+}$  в интактных корнях растений вики посевной: А – без лигандов; В – при внесении лигандов, концентрация  $Cu^{2+}$  10 мкМ; С – при внесении лигандов, концентрация  $Cu^{2+}$  100 мкМ.**

На рисунке 3.12. показано сравнение экспериментальных данных по убыли  $Cu^{2+}$  из среды инкубации с данными по накоплению металла в корнях обработанных растений. В наших предыдущих исследованиях на других видах оба метода показывали одинаковые значения поглощения металла растениями (Meuchik et al. 2016, 2019). Как можно видеть на рисунке 3.12, в корнях растений вики, обработанных медьсодержащим раствором, накапливается значительно

меньше ионов меди, чем убывает из среды инкубации во время обработки. При начальной концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  100 мкМ, в корнях накапливается ~52 мкмоль  $\text{Cu}^{2+}$  на 1 г сухой массы корня, часть металла транспортируется в надземные органы, однако в этих условиях в побегах обнаруживается лишь ~0,85 мкмоль  $\text{Cu}^{2+}$  на 1 г сухой массы органа. В тоже время, данные по убыли металла из среды инкубации указывают на то, что в соответствии с материальным балансом корни должны содержать примерно 140,5 мкмоль  $\text{Cu}^{2+}$  на 1 г сухой массы корня (рисунок 3.12. А), что почти в 3 раза больше, чем наблюдается в действительности.



**Рисунок 3.12. Сравнение фактического эндогенного содержания  $\text{Cu}^{2+}$  в корнях с данными, полученными по убыли  $\text{Cu}^{2+}$  из среды инкубации целых растений ( $Q_{\text{к}}^{\text{Cu}}$  – мкмоль  $\text{Cu}^{2+}$  на 1 г сухой массы корня): А – без лигандов, В – в присутствии лигандов.**

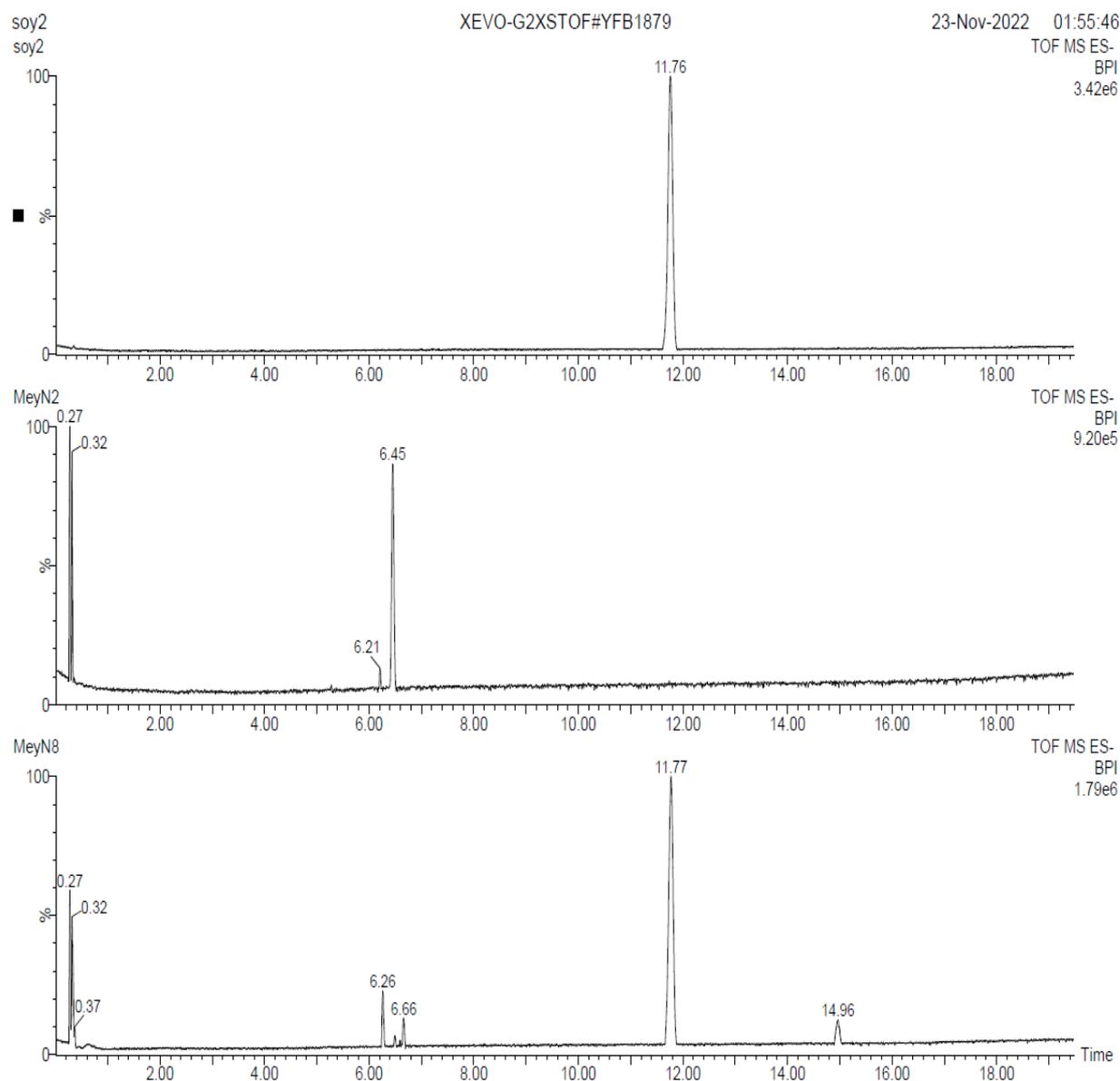
Действие лигандов на поглощение  $\text{Cu}^{2+}$  растениями *V. sativa* также проявляются и при анализе данных, полученных по убыли  $\text{Cu}^{2+}$  из среды инкубации. Однако в этом случае эффекты гистидина и глутамина проявляются в меньшей степени (рисунок 3.12. В), по сравнению с данными, полученными методом озоления растительных тканей.

### **3.6. Масс-спектрометрический анализ экссудатов корней растений вики посевной**

Масс-спектрометрический анализ экссудатов корней показал, что в присутствии ионов меди в среде корни растений *V. sativa* выделяют тритерпеновые гликозиды.

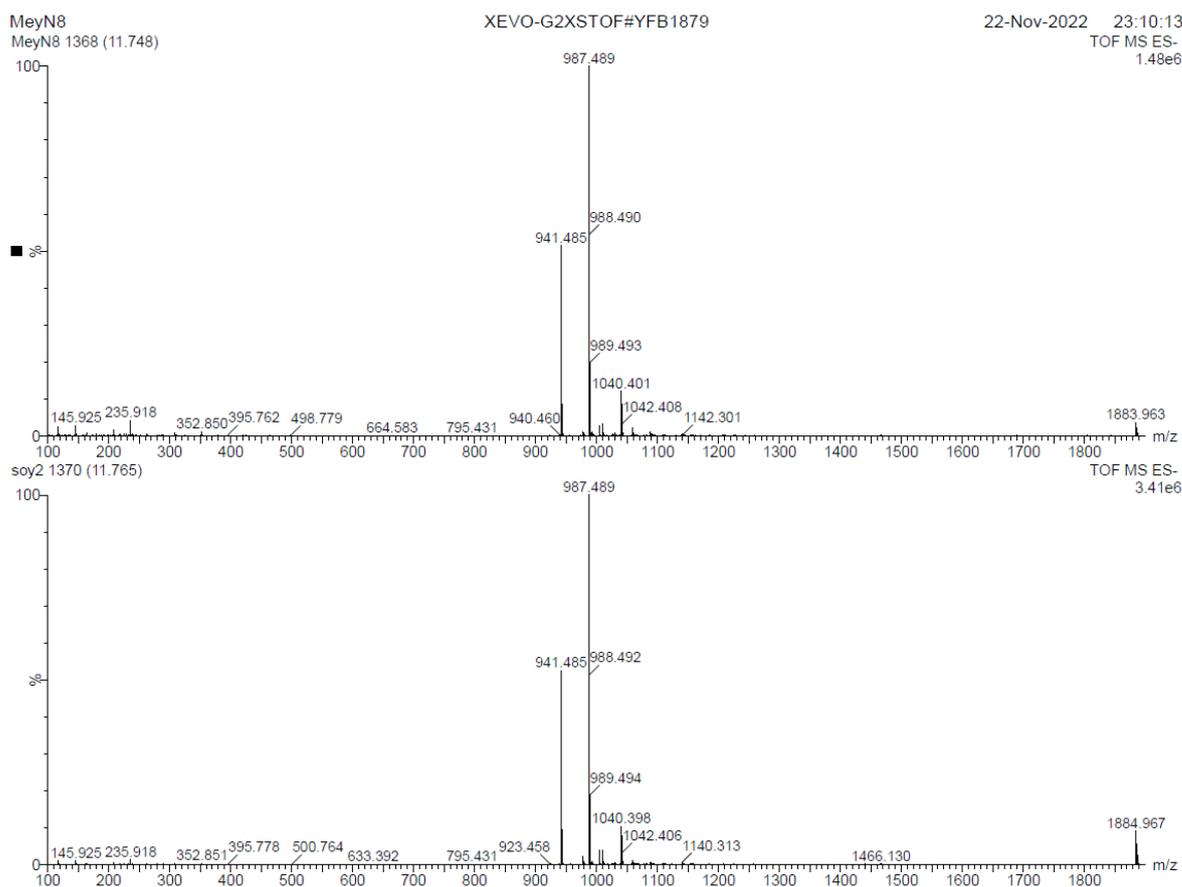
На рисунке 3.13. представлен первый этап определения, на котором была проведена структурная идентификация основных (в количественном отношении) метаболитов, присутствующих в препаратах экссудатов корней вики. Идентификацию соединений проводили на основании интерпретации результатов хромато-масс-спектрометрии и их сравнения со стандартным образцом тритерпенового гликозида Soyasaponin I и данными литературы.

После 24 ч инкубации растений на растворе с концентрацией меди 100 мкМ в нем было обнаружено четыре тритерпеновых гликозида (элюируются с хроматографической колонки в пределах 6-16 минут анализа) (Laurent-Martínez, 2015; Zhao 2018; Nascimento, 2019; Rostagno, 2010) (рисунок 3.13.). При этом обнаружено, что в количественном отношении преобладает Soyasaponin I, который однозначно идентифицирован сравнением с аутентичным образцом этого гликозида (рисунок 3.13. и 3.14.). В контрольном образце экссудата корней вики в количественном отношении доминирует компонент со временем удерживания 6,45 минут, предварительно идентифицированный как лигнан *medioresinol*, который ранее был обнаружен в растении *Bituminaria bituminosa* из семейства бобовых (Laurent-Martínez, 2015).



**Рисунок 3.13.** UPLC-ESI-MS хроматограммы (полный ионный ток, режим BPI (base peak ion), отрицательные ионы) раствора стандартного образца Soyasaponin I (верхняя панель), контрольного раствора после инкубации растений вики (средняя панель) и опытного раствора (100 мкМ меди) после инкубации растений (нижняя панель). Пик со временем 6,45 мин – вероятно соответствует лигнану medioresinol ( $m/z$  [M-H] 387,  $m/z$  [M-H+HCOOH] 433,  $m/z$  осколочного иона 242. Ось абсцисс – время, минуты; ось ординат – сигнал детектора, относительная интенсивность, %.

*Примечание.* Анализ состава корневых экссудатов проводили после экспериментов по поглощению меди растениями из растворов  $\text{CuCl}_2$  с концентрацией 10, 50 и 100 мкМ, без добавления лигандов. Контролем служили растения, выдержанные с 9 на 10 сутки в 150 мл дистиллированной воды.



**Рисунок 3.14. Результаты масс-спектрометрии (отрицательные ионы) хроматографического пика со временем удерживания 11,7 мин. на хроматограмме стандартного образца Soyasaponin I (нижняя панель) и опытного раствора (100 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$ ) после инкубации растений (верхняя панель). Ось абсцисс – значения  $m/z$ ; ось ординат – сигнал детектора, относительная интенсивность, %.**

В таблице 3.11. приведены средние значения концентрации тритерпеновых гликозидов в растворе обработки растений в пересчете на 1 г сухой массы корня. Как видно, суммарная концентрация идентифицированных тритерпеновых гликозидов увеличивается по мере увеличения содержания металла в среде инкубации, коэффициент корреляции составил  $\sim 0,95$  ( $R^2 = 0,95$ ). Из всех обнаруженных соединений самое высокое содержание установлено для Soyasaponin I (Soyasaponin Bb), доля этого соединения в общем составе тритерпеновых гликозидов при 100 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$  достигала 87%. Soyasaponin I присутствует во всех вариантах обработки и, кроме того, при максимальной обработке (100 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$ ) в среде инкубации, концентрация этого тритерпенового

гликозида увеличилась в 3 раза по сравнению с контролем. Суммарное содержание тритерпеновых гликозидов также увеличивается.

Таблица 3.11. Содержание тритерпеновых гликозидов в экссудатах корней *V. sativa* в зависимости от концентрации ионов меди ( $C_{Cu}$ , мкМ) в среде инкубации

	Время удерживания, tR, минуты				
	14,96	11,77	6,65	6,26	
Содержание разных форм сапонинов, мкмоль/г сухой массы корня					
$C_{Cu}$ , Be,	Soyasaponin	Soyasaponin I,	Soyasaponi n Bd,	Azukisaponin IV,	Общее содержание
Конт роль	следы	0,075±0,03 <sup>a</sup>	следы	следы	0,075±0,03 <sup>a</sup>
10	следы	0,182±0,07 <sup>a</sup>	следы	0,026±0,01 <sup>a</sup>	0,208±0,08 <sup>a</sup>
50	следы	0,724±0,005 <sup>b</sup>	следы	0,021±0,004 <sup>a</sup>	0,745±0,01 <sup>b</sup>
100	0,116±0,03	2,147±0,18 <sup>c</sup>	0,071±0,03	0,105±0,004 <sup>b</sup>	2,439±0,24 <sup>c</sup>

В таблице: " следы " - содержание менее 0,0056 мкмоль.

## 4. ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1. Токсическое действие ионов меди на сухую массу и оводненность корней и побегов растений вики посевной

Токсическое действие тяжелых металлов на растительный организм проявляется, прежде всего, в ограничении роста растений (Marschner, 1995; Иванов и др., 2003). Негативное влияние  $\text{Cu}^{2+}$  на накопление сухой массы корней и побегов вызвано влиянием металла на процесс деления клеток и на их рост растяжением (Zhang, Yang, 1994; Кожевникова и др., 2009), при этом наблюдается более высокая чувствительность корня, по сравнению с побегом (Иванов и др., 2003). Токсическое действие  $\text{Cu}^{2+}$  на надземные органы связано со снижением длины корней, меньшим поступлением элементов минерального питания и нарушением водного транспорта в растении. Кроме того, транспортируясь в побеги ионы меди способны оказывать прямое воздействие на метаболизм клеток, тем самым снижая сухую массу надземных органов (Shanker et al., 2005).

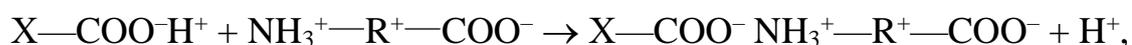
Полученные нами результаты о снижении сухой массы корней и побегов растений *Vicia sativa* в условиях избытка ионов меди в среде хорошо согласуются с известными данными литературы. Важно отметить, что во всех вариантах обработки растений отсутствовали внешние симптомы токсичности  $\text{Cu}^{2+}$ , такие как некроз корней или хлороз листьев.

В настоящее время информация о влиянии глутамина и гистидина, добавленных в среду выращивания, на ростовые параметры растений ограничена. Большинство исследований сконцентрировано на выявлении влияния эндогенного гистидина на рост и развитие растений при усилении экспрессии генов биосинтеза этого соединения. Так, показано наличие отрицательной корреляции между эндогенной концентрацией гистидина и ростом корневой системы у *Arabidopsis thaliana*, при этом повышенная концентрация гистидина в тканях достигалась путем сверхэкспрессии генов его биосинтеза (Rees, 2009). Наличие отрицательной корреляции авторы связывают с высокими энергозатратами на синтез гистидина,

так как было установлено, что на синтез одной молекулы гистидина требуется 31–41 молекула АТФ (Swire, 2007).

Известно, что растения способны поглощать как неорганический азот в форме  $\text{NO}_3^-$  и  $\text{NH}_4^+$ , так и органический в составе аминокислот (Seregin, Kozhevnikova, 2021). Первым продуктом фиксации неорганического азота является глутамин, который в последствии принимает участие в синтезе других аминокислот (Dinkeloo et al., 2018). Таким образом, экзогенные гистидин и глутамин, добавленные в среду инкубации, могут служить дополнительными источниками азотсодержащих соединений для растений, при этом снижаются затраты энергии на восстановление  $\text{NO}_3^-$  до  $\text{NH}_4^+$  и на синтез аминокислот, что может приводить к увеличению сухой массы корней. В соответствии с результатами настоящего исследования внесение 5 мМ глутамина в среду инкубации растений *V. sativa* в отсутствие  $\text{Cu}^{2+}$  приводит к увеличению сухой массы корней на 13% (таблица 3.2) по сравнению с контролем. Однако, добавление гистидина в концентрации 1 мМ в этих условиях приводит к противоположному эффекту, так как сухая масса корней снижается на 9,5% (таблица 3.2.).

Результаты нашего исследования показывают, что после 24 часов экспозиции растений *V. sativa* на растворах 0,5 мМ и 1 мМ гистидина без  $\text{Cu}^{2+}$  рН среды инкубации значительно снижается (таблица 4.1.). Следует отметить, что вне зависимости от состава среды, значение рН исходного раствора составляло  $5 \pm 0,05$ . Константа диссоциации гистидина находится в диапазоне от 6 до 7, и при  $\text{pH} < 6$  имидазольное кольцо гистидина находится в протонированной форме, придавая всей молекуле положительный заряд, который равномерно распределяется между двумя атомами азота (Rees, 2009). Возникновение положительного заряда на гистидине ( $\text{NH}_3^+ - \text{R}^+ - \text{COO}^-$ ) приводит к его связыванию с отрицательно заряженными карбоксильными группами КС ( $\text{X} - \text{COO}^-$ ) по реакции:



в результате которой уменьшается рН среды. Следовательно, связывание гистидина с катионообменными группами КС может ограничивать его поступление в протопласт клеток корня, и поэтому вероятно гистидин не может выступать в этих условиях дополнительным источником азота для растений. Кроме того, закисление среды может оказывать негативное влияние на ростовые процессы корней растений (Marschner, 1989).

Глутамин при характерных для апопласта значениях рН является нейтральным соединением, и поэтому можно предположить, что добавленный в среду инкубации глутамин поглощается протопластами клеток корней растений *V. sativa* и может служить дополнительным источником азота, увеличивая сухую массу корневой системы. Защелачивание среды с глутамином, наблюдаемое после инкубации растений, облегчает адсорбцию катионов на КС и их диффузию в апопласте, улучшая, тем самым, снабжение растения элементами минерального питания.

Таблица 4.1. Значения рН среды после 24 ч инкубации в ней растений при различных концентрациях ( $C_{\text{лиганд}}$ , мМ) гистидина и глутамина.

$C_{\text{лиганд}}$	рН
До обработки	$5 \pm 0,01^a$
His 0,5 мМ	$4,35 \pm 0,012^b$
His 1 мМ	$4,40 \pm 0,003^b$
Gln 1 мМ	$6,93 \pm 0,09^d$
Gln 5 мМ	$7,14 \pm 0,08^d$

При одновременном внесении в растворы обработки растений ионов меди и лгандов негативное действие металла на накопление сухой массы корней и побегов не наблюдалось. Во всех вариантах добавления гистидина и глутамина к растворам

$\text{CuCl}_2$  сухая масса корней и побегов не отличается от контроля (таблица 3.3.). Положительное действие лигандов на сухую массу связано с ограничением поглощения  $\text{Cu}^{2+}$  корнями растений *V. sativa* в их присутствии (рисунок 3.1.).

Водный дефицит – одно из типичных проявлений, вызываемых практически любым абиотическим стрессом. Полученные нами результаты о снижении содержания воды в тканях корней и побегов *V. sativa* при инкубации растений в средах с повышенной концентрацией  $\text{Cu}^{2+}$  (таблица 3.4.) согласуются с известными данными литературы о влиянии ионов тяжелых металлов на оводненность тканей других видов растений (Gajewska et al., 2006; Rucińska-Sobkowiak, 2016). Повышенное содержание  $\text{Cu}^{2+}$  в клетках корня вероятно нарушает транспорт калия, что приводит к снижению тургорного давления (Gabbrielli et al., 1999). Кроме того, адсорбция  $\text{Cu}^{2+}$  КС корней значительно снижает эластичность последней, тем самым оказывая влияние на водный потенциал клетки, что также ограничивает поступление воды в корни (Krzesłowska, 2011; Rucińska-Sobkowiak, 2016). Избыток ионов меди в среде негативно влияет на рост корня, что приводит к снижению площади всасывающей поверхности и, как следствие, меньшей оводненности тканей корней и побегов.

В отсутствие ионов меди оба лиганда не оказывают влияния на транспорт воды в надземные органы *V. sativa*, но незначительно изменяют оводненность тканей корня (таблица 3.4). При внесении в среду с концентрацией  $\text{Cu}^{2+}$  10 мкМ исследуемые лиганды не оказывали влияния на содержание воды в корнях. В этих условиях обе концентрации гистидина ограничивают транспорт воды в надземные органы в среднем на 7% по сравнению с вариантом без лиганда (таблица 3.5). При увеличении концентрации металла до 100 мкМ, гистидин также не влияет на оводненность корней, но внесение 5 мМ глутамин в среду инкубации ограничивает поглощение воды корнями на 1% по сравнению с контролем (таблица 3.5), не влияя на транспорт воды в побеги (таблица 3.5). Действие лигандов на оводненность корней и побегов, вероятно, опосредованно изменением градиента водного потенциала между средой инкубации и протопластами клеток корней.

Также можно предположить, что в ответ на присутствие в среде инкубации ионов меди, лигандов или комплексов медь-лиганд в клетках корня вики могут синтезироваться различные соединения, которые могут обладать осмотической активностью и влиять на градиент водного потенциала.

Таким образом, избыток  $\text{Cu}^{2+}$  в среде снижает сухую массу корней и побегов растений *V. sativa*, а также затрудняет поглощение воды корнем и ее дальнейший транспорт. Гистидин и глутамин в отсутствие ионов меди проявляют собственную биологическую активность, оказывая влияние на накопление сухой массы корней и на поглощение воды корнями. Действие гистидина и глутамина в составе комплексов медь-лиганд направлено на снижение токсического влияния  $\text{Cu}^{2+}$  на растения *V. sativa*.

#### **4.2. Анализ состава ионообменных групп в матриксе КС корней и побегов растений вики посевной**

Полученные результаты дают основание полагать, что именно клеточные стенки ответственны за высокое накопление ионов меди в корнях растений *V. sativa* (Meuchik et al., 2021). Обработка растений вики медьсодержащими растворами приводит к изменению количества ионообменных групп в полимерном матриксе клеточных стенок как корней, так и побегов, и, соответственно, изменяется и их медь-связывающая способность. Результаты потенциометрического исследования о содержании ионообменных групп в клеточных стенах корней полностью согласуются с данными по адсорбционной способности КС. Так, обработка растений комплексами медь-лиганд в средах, содержащих  $10 \text{ мкМ Cu}^{2+}$ , приводит как к снижению количества карбоксильных групп ПГК в КС корней (таблица. 3.7), так и снижению медь-связывающей способности клеточных стенок корней (рисунок 3.7). Показано, что КС корней и побегов растений *V. sativa* обладают высокой медь-связывающей способностью ( $300 \text{ мкмоль Cu}^{2+}/\text{г}$  сухой массы КС), обусловленной высоким содержанием карбоксильных групп ПГК, которое

составляет 500 и 625 мкмоль/ г сухой массы КС корней и побегов, соответственно. Таким образом, можно заключить, что именно клеточные стенки ответственны за высокое накопление ионов меди в корнях растений *V. sativa*.

Следует отметить, что анионообменные группы, которые, как правило, обнаруживаются на потенциометрических кривых КС корней растений других видов (Meuchik, 2001), не выявлены у растений вики, что может быть обусловлено большим содержанием карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты в стенках, которые экранируют диссоциацию аминогрупп.

### **4.3. Накопление ионов меди в тканях растений вики посевной**

Наше исследование показало, что независимо от варианта обработки растений вики увеличение содержания  $\text{Cu}^{2+}$  в корнях было намного больше, чем в побегах (рисунок 3.1. и 3.2.). Эти результаты согласуются с известными данными о том, что большинство видов растений накапливают ТМ в тканях корня с незначительной транслокацией в надземную часть растений (Kopittke, Menzies, 2006; Lequeux et al., 2010). Таким образом, *V. sativa* по накоплению ионов меди относится к типичным представителям группы растений-исключателей, накапливающих ТМ преимущественно в корнях (рисунок 3.1. и 3.2.), так как во всех вариантах обработки растений ионы меди локализуются преимущественно в корневой системе с незначительной транслокацией металла в побег.

Известно, что растения могут выделять в составе корневых экссудатов лиганды, связывающие ТМ в почвенном растворе. Образующийся комплекс металл-лиганд менее эффективно поглощается корнем, тем самым ограничивается поступление токсичного элемента в растительный организм. Подобная стратегия защиты растений от действия ионов металлов встречается у многих видов растений. Например, добавление малата снижает накопление Cd в корнях мискантуса (*Miscanthus sacchariflorus*, Guo et al., 2017), цитрата – никеля у

*Halimione portulacoides* и *Thlaspi arvense* (Duarte et al., 2007; Salt et al., 2000), фитосидерофора дезоксимугеновой кислоты – кадмия у кукурузы (Hill et al., 2002).

Результаты нашего исследования показывают, что внесение гистидина или глутамина в среду инкубации растений ограничивает поглощение (рисунок 3.1. В и С) и дальний транспорт (рисунок 3.2. В и С) ионов меди в растения *V. sativa*. Ограничение гистидином и глутамином поглощения  $\text{Cu}^{2+}$  корнями сглаживает токсическое действие металла, что проявляется в увеличении сухой массы корней и побегов по сравнению с вариантами обработки без лигандов (таблица 3.3.). Подобный эффект аминокислот на поглощение меди корнями растений обнаружен нами впервые. Снижение накопления никеля в присутствии гистидина в среде ранее было обнаружено у *Thlaspi arvense* (Salt et al., 2000). Самым же хорошо изученным примером ограничивающего накопление ТМ действия низкомолекулярных хелаторов является выделение корнями устойчивых к алюминию и кадмию видов и сортов растений малата, оксалата и цитрата (Delhaize, Ryan, 1995; Kopittke et al. 2017). Так, например, корни устойчивого к Cd сорта томата выделяли в среду втрое больше оксалата по сравнению с неустойчивым в ответ на повышенные (10-50 мкМ) концентрации Cd. Вследствие этого устойчивый сорт характеризовался более низким накоплением металла в корне и большей относительной скоростью роста корня (Zhu et al., 2011). Следует отметить, что влияние лигандов на поглощение ТМ корнями может варьировать в зависимости от вида растения. Так, например, гистидин ограничивает поглощения никеля корнями у *Thlaspi arvense* (Salt et al., 2000), в тоже время, у пшеницы внесение His в среду выращивания приводит к возрастанию содержания Ni в корнях и надземных частях растений (Dalir, Khoshgoftarmanesh, 2015). Ограничение поглощения ионов меди корнями растений *V. sativa* в присутствии гистидина и глутамина может быть связано, с одной стороны, со снижением активности ионов меди в комплексе с лигандом. С другой стороны, связывание ионов меди с гистидином или глутамином, вероятно, снижает адсорбцию металла КС корня, т.к. константа устойчивости комплекса меди с лигандами выше, чем с карбоксильными группами ПГК (Davarski et al., 1994; Field et al., 1974, Callahan et al., 2006).

Таким образом, *V. sativa* является типичным представителем растений-исключателей, накапливающих ионы тяжелых металлов в корнях. Действие лигандов направлено на ограничение поглощения  $\text{Cu}^{2+}$  корнем растения, что связано, с одной стороны, со снижением активности  $\text{Cu}^{2+}$  в комплексе с лигандом. С другой стороны, связывание  $\text{Cu}^{2+}$  с гистидином или глутамином, вероятно, снижает адсорбцию металла КС корня. Снижение гистидином и глутамином поглощения  $\text{Cu}^{2+}$  корнями растений вики сглаживает токсические эффекты металла, что проявляется в увеличении сухой массы корней и побегов по сравнению с вариантами обработки без лигандов (таблица 3.3.).

#### **4.4. Медь-связывающая способность клеточных стенок, изолированных из корней и побегов растений вики посевной.**

На основании наших предыдущих исследований, показавших высокую медь-связывающую способность КС бобовых (Meuchik et al., 2014, 2016), и сравнительного анализа содержания  $\text{Cu}^{2+}$  в интактных корнях и изолированных из них КС у *V. sativa* мы полагаем, что КС ответственны за высокое накопление меди в корнях вики. Как уже было сказано выше, КС растений *V. sativa* характеризуются высоким содержанием карбоксильных групп ПГК, которое оставляет 500 мкмоль  $\text{Cu}^{2+}$ /г сухой массы КС. Кроме того, наше исследование показало, что КС растений вики демонстрируют высокую  $\text{Cu}$ -связывающую способность, достигающую 300 мкмоль  $\text{Cu}^{2+}$ /г сухой массы КС. Таким образом, как и у остальных изученных видов сосудистых растений (Sattelmacher, 2001; Krzesłowska, 2011; Meuchik et al., 2014), у *V. sativa* в физиологических условиях связывание тяжелых металлов в КС осуществляется в основном карбоксильными группами ПГК в составе пектинов.

В связи с конкуренцией за связывание  $\text{Cu}^{2+}$  между ионообменными группами полимеров клеточной стенки и лигандами, а также снижением активности ионов меди в составе комплекса металл-лиганд,  $\text{Cu}$ -связывающая способность КС корней и побегов при добавлении гистидина или глутаминина должна снижаться. Что и

наблюдается в КС побегов в вариантах с добавлением гистидина (рисунок 3.4. В и С), а также в КС корней при максимальной обработке (100 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$ ) с добавлением гистидина и глутамин (рисунок 3.3. С). Аналогичное влияние лигандов на медь-связывающую способность КС было обнаружено у дуба *Quercus ilex*: в присутствии His, Asp или лимонной кислоты адсорбция ионов Ni клеточными стенками ксилемы этого растения уменьшалась в 10 раз (Araújo et al., 2009).

В отличие от гистидина, при низкой концентрации  $\text{CuCl}_2$  (10 мкМ) глутамин незначительно (4%) усиливает адсорбцию ионов меди КС корней контрольных растений (рисунок 3.3. В). Увеличение апопластного содержания ТМ в присутствии глутамин было показано в работах и других авторов (Dalir, Khoshgoftarmanesh, 2014).

Таким образом внесение лигандов в раствор обработки КС приводит к изменению Cu-связывающей способности КС как корней, так и побегов, а величина изменений зависит от концентрации Cu, лиганда и его типа.

Полученные результаты показывают, что предобработка растений *V. sativa* гистидином или глутамином в отсутствие ионов меди приводит к изменению адсорбционной способности КС корней в отношении  $\text{Cu}^{2+}$  (рисунок 3.5.В). В среде инкубации КС с концентрацией  $\text{Cu}^{2+}$  10 мкМ (рисунок 3.5.А) этот показатель возрастает, а с увеличением концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  до 100 мкМ, наоборот, снижается (рисунок 3.5 В) без изменения массовой доли КС (таблица 3.9). Отсутствие изменений в массовой доле КС указывает на то, что лиганды не изменяют биосинтеза компонентов КС, а приводят к модификации уже существующих ионообменных групп. Снижение адсорбционной способности КС корней в ответ на обработку растений растворами лигандов в отсутствие ионов меди, вероятно, обусловлено метилированием карбоксильных групп ПГК и, как следствие, изменением доли свободных карбоксильных групп, являющихся основными сайтами связывания ионов металлов.

Известно, что избыток ионов меди в среде индуцирует в растении запуск механизмов защиты для снижения токсичного влияния  $\text{Cu}^{2+}$ . В ответ на металл-

стресс в растениях могут реализовываться разные стратегии изменения состава КС корня и ее ионообменной способности. Одна из них заключается в увеличении массовой доли деметилованных пектинов в КС корней при воздействии ТМ (Parrotta et al., 2015; Colzi et al., 2012). При такой стратегии, защита растений от избытка металлов основывается на увеличении депонирования ТМ в КС.

Другая, напротив, состоит в уменьшении массовой доли деметилованных пектинов в КС в ответ на избыток ТМ в среде (Colzi et al., 2012; Konno et al., 2010). Эта стратегия защиты может реализоваться путем метилирования карбоксильных групп ПГК, как было показано на растениях *Silene paradoxa* (Colzi et al., 2012), и/или путем увеличения степени лигнификации КС (Bouazizi et al., 2010). В данном случае формирование “металл-исключающих” КС препятствует накоплению ТМ в апопласте и, вероятно, ограничивает симпластное поглощение металла клетками корня (Colzi et al., 2012). Такая стратегия модификации КС в ответ на избыток  $\text{Cu}^{2+}$  выявлена нами в варианте обработки растений *V. sativa* с максимальной концентрацией  $\text{Cu}^{2+}$  (100 мкМ) (таблица 3.9). В этом случае в КС корней не изменяется доля свободных карбоксильных групп ПГК, но резко увеличивается доля фенольных ОН-групп (таблица 3.7) и массовая доля КС в общей массе корня (таблицы 3.6). Приведенные результаты позволяют предположить, что увеличение в массовой доле КС корней в этом варианте обработки обеспечивается интенсификацией биосинтеза компонента КС, не участвующего в адсорбции катионов, и этот компонент, вероятно, является лигнином, усиление отложения которого в КС происходит в ответ на избыток ионов меди.

Известно, что  $\text{Cu}^{2+}$  участвуют в окислительно-восстановительных процессах в клетке, вступая в реакции Габера-Вейса и Фентона, с образованием активных форм кислорода (АФК) и, тем самым, вызывают окислительный стресс (Gaetke et al., 2014). Наиболее устойчивой формой АФК является перекись водорода, накопление которой в апопласте в ответ на металл-стресс показано во многих исследованиях (например, Bouazizi et al., 2010). Накопление АФК стимулирует активность апопластных пероксидаз, которые вовлечены в процесс полимеризации монолигнолов в лигнин. Предполагают, что этот процесс обеспечивается

взаимодействием двух типов пероксидаз: NADH-оксидазой и кониферол пероксидазой. NADH-оксидаза катализирует генерацию перекиси водорода в ходе окисления монолигнолов, а кониферол пероксидаза участвует в превращении монолигнолов в лигнин. Показано, что в ответ на Cu-стресс в корнях растений происходит накопление фенольных соединений, утолщение КС эндодермы и элементов ксилемы и флоэмы, что обусловлено усиленным отложением лигнина и/или суберина в поясках Каспари (Bouazizi et al., 2010). Известно также, что в ответ на избыток  $\text{Cu}^{2+}$  в растениях *V. sativa* усиливается активность ферментов антиоксидантной защиты, таких как супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT) и гваяколпероксидаза (GPOX) (Jalali et al, 2018). Увеличение активности ферментов антиоксидантной системы растений приводит к усиленной лигнификации клеточных стенок (Bouazizi et al., 2010), что, в соответствии с полученными результатами, выражается в снижении медь-связывающей способности КС и росте содержания фенольных ОН-групп (таблица 3.9 и 3.12).

Еще одна стратегия изменения состава КС в ответ на токсическое действие металлов обусловлена усилением в равной мере биосинтеза всех компонентов КС, в том числе и пектинов без изменения степени метилирования. Такой ответ на воздействие повышенных концентраций ионов меди был выявлен в корнях маша (Meuschik et al., 2016) и обнаружен нами в корнях вики в вариантах обработки растений в средах с концентрацией  $\text{CuCl}_2$  10 и 50 мкМ. Полученные в настоящей работе данные об увеличении массовой доли КС корней (таблица 3.6), об увеличении Cu-связывающей способности КС в расчете на 1 г сухой массы корня и о неизменности этого показателя в расчете на 1 г сухой массы КС корня (таблица 3.9) дают основания полагать, что избыток ионов меди в этих условиях приводит к усилению биосинтеза КС корня у *V. sativa* без изменения доли свободных карбоксильных групп ПКГ, что, с одной стороны, приводит к увеличению содержания  $\text{Cu}^{2+}$  в этом органе, а с другой, позволяет вике депонировать больше металла в апопласте.

Обработка растений в среде инкубации, содержащей  $\text{CuCl}_2$  без лигандов, приводила и к изменению Cu-связывающей способности побегов. Так, в вариантах

обработки растений с 10 и 100 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$  происходило формирование КС со уменьшенной  $\text{Cu}$ -связывающей способностью в расчете на 1 г сухой массы побега (таблица 3.10). Однако при расчете этих данных на 1 г сухой массы КС, различие нивелируется и становится статистически незначимым (таблица 3.10), при этом в этих вариантах массовая доля КС побегов увеличивается (таблица 3.6). В КС опытных побегов не изменяется количество карбоксильных групп ПГК по сравнению с контрольными, однако снижается общее количество ионообменных групп, обусловленное в большей степени уменьшением количества ГКК (таблица 3.8). Вклад ГКК в адсорбцию катионов в физиологических условиях, как правило, не значителен, рК этих групп  $\sim 7$  (таблица 3.8). Тем не менее, снижение количества ГКК в составе КС побегов растений, обработанных раствором 10 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$ , составляет  $\sim 16\%$  (таблица 3.8.), а снижение адсорбционной способности в этих условиях – примерно 18% в расчете на г сухой массы побега (таблица 3.10.). Таким образом, снижение адсорбционной способности КС опытных побегов в расчете на грамм сухой массы органа, вероятно, вызвано снижением количества свободных карбоксильных групп гидроксикоричных кислот.

Действие лигандов на связывание ионов меди клеточными стенками, изолированными из корней опытных растений (варианты 10 и 100 мкМ  $\text{Cu}$  без лигандов), аналогично их влиянию на контрольные варианты, и оно зависит от концентрации  $\text{CuCl}_2$  в среде (рисунок 3.6). Поскольку обработку растений проводили растворами  $\text{CuCl}_2$  в отсутствие лигандов, внесение в среду инкубации изолированных клеточных стенок корней гистидина и глутамина не может приводить к изменению содержания карбоксильных групп ПГК в полимерном матриксе КС. Отсюда следует, что отличия в действии гистидина и глутамина на медь-связывающую способность КС корней, обработанных растворами с концентрацией  $\text{Cu}^{2+}$  10 и 100 мкМ, от контрольного варианта заключаются в изменении активности самих  $\text{Cu}^{2+}$  (Davarski et al., 1994; Field et al., 1974, Callahan et al., 2006). На основании этих рассуждений можно заключить, что в контрольном варианте при 100 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$  добавление гистидина и глутамина в среду инкубации

приводит к ограничению адсорбции  $\text{Cu}^{2+}$ , вследствие образования прочных комплексов этих лигандов с ионами меди, а в варианте с опытной КС происходит снижение Си-связывающей способности, вследствие усиленной лигнификации КС, при этом ограничение адсорбции металла лигандами не проявляется.

В случае опытных растений, инкубированных на средах, содержащих как медь, так и лиганды, происходит снижение медь-связывающей способности КС корней, как в расчете на единицу сухой массы органа, так и КС (рисунок 3.7, 3.8). Результаты потенциометрического исследования показывают, что в клеточных стенках корней в ответ на обработку растений комплексами медь-лиганд при начальной концентрации металла 10 мкМ значительно снижается содержание свободных карбоксильных групп ПГК (таблица 3.7). В случае побегов опытных растений, снижение медь-связывающей способности КС наблюдается только на средах с лигандами и 10 мкМ меди (рисунок 3.9 и 3.10). Массовая доля КС снижается по сравнению опытными растениями на среде без лигандов и в корнях, и в побегах.

Полученные нами результаты свидетельствуют, что по мере увеличения концентрации гистидина или глутамина в медьсодержащей среде инкубации целых растений, с одной стороны снижается поступление  $\text{Cu}^{2+}$  в растения *V. sativa*, а с другой – уменьшается медь-связывающая способность КС. Приведенные результаты позволяют утверждать, что ограничение поступления ионов меди в корни обусловлено снижением адсорбционной способности КС корней вики. Одновременно этот результат указывает на то, что основной стратегией защиты растений вики от избытка  $\text{Cu}^{2+}$  в среде является депонирование металла в клеточных стенках корней.

Таким образом, обработка растений растворами  $\text{CuCl}_2$  в исследуемом диапазоне концентраций без добавления лигандов приводит к: 1) снижению сухой массы и оводненности корней и побегов; 2) усилению биосинтеза клеточных стенок без изменения соотношения её компонентов при 10 и 50 мкМ, 3) при 100 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$  к дополнительной лигнификации КС (Bouazizi et al., 2010). Увеличение

массовой доли клеточных стенок позволяет клетке депонировать в апопласте большее ионов меди, снижая тем самым её токсичность для всего растения. Лигнификация КС, вероятно, является следствием генерации избыточного количества АФК в апопласте корней в ходе реакции Габера-Вейса и Фентона (Gaetke et al., 2014; Bouazizi et al., 2010).

В соответствии с данными по адсорбции  $\text{Cu}^{2+}$  изолированными клеточными стенками и результатами потенциометрического исследования КС (таблица 3.7) внесение лигандов в среду инкубации приводит к снижению  $\text{Cu}$ -связывающей способности КС корней (рисунок 3.7). Таким образом, при обработке растений комплексами медь-лиганд происходит смена стратегии защиты растений *V. sativa* с депонирования ионов меди в КС, наблюдаемой в отсутствие лигандов, на ограничение адсорбции  $\text{Cu}^{2+}$  в присутствии этих соединений. Подобная защита растений от избытка ТМ, т.е. ограничение адсорбции ионов металлов клеточными стенками, обнаружена в исследованиях и других авторов, которые использовали иные виды растений (Colzi et al., 2012).

#### **4.5. Сравнительный анализ потенциальной адсорбционной способности КС корней и эндогенного содержания ионов меди в корнях растений вики посевной**

Полученные результаты свидетельствуют, что медь-связывающая способность КС корней намного превышает содержание  $\text{Cu}^{2+}$  в корнях растений вики, обработанных таким же по составу раствором (рисунок 3.11). Так, при максимальном уровне обработки (100 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$ ) в отсутствие лигандов содержание  $\text{Cu}^{2+}$  в изолированных КС в 2,25 раз больше, чем в корнях (рисунок 3.11. А). Действие лигандов направлено на снижение содержания  $\text{Cu}^{2+}$  как в клеточных стенках, так и в корнях растений *V. sativa*. Приведенные результаты позволяют утверждать, что в присутствии лигандов ограничение поступления  $\text{Cu}^{2+}$  в растения вики обусловлено снижением адсорбционной способности КС корней.

Сравнение данных по убыли ионов меди из среды инкубации целых растений с содержанием металла в корнях свидетельствует, что в тканях растений *V. sativa* накапливается значительно меньше  $\text{Cu}^{2+}$ , чем «убывает» из среды инкубации. Таким образом, с одной стороны медь-связывающая способность КС в интактном корне не реализуется в полной мере, и, с другой стороны, в корни поступает значительно меньше ионов меди, чем убывает из среды инкубации после 24-часовой экспозиции растений. Следует отметить, что данные по медь-связывающей способности изолированной клеточной стенки корней примерно совпадают с данными по убыли  $\text{Cu}^{2+}$  из среды инкубации целых растений.

Причин обнаруженных значительных различий между убылью  $\text{Cu}^{2+}$  из среды инкубации и поступлением иона в корни может быть несколько:

(1) Часть  $\text{Cu}^{2+}$  проходит в побеги растений.

Действительно, наше исследование показало, что в отсутствии лигандов наблюдается незначительное увеличение в содержании  $\text{Cu}^{2+}$  в надземной части опытных растений по сравнению с контрольными. Поэтому возникает вопрос: может ли  $\text{Cu}^{2+}$  поступать по апопласту к ксилеме корня? В ряде исследований было показано, что некоторые ионы металлов ( $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ ) способны достигать ксилемы по апопласту корня (White, 2001; White et al., 1981). Известно, что эндодерма не является «абсолютным» барьером для переноса ионов из коры в стель корня по апопласту, так как есть три сайта, через которые возможен такой перенос (Marschner, 1995): в зонах отхождения боковых корней, где эндодерма разрывается; в апексе корня, где пояски Каспари не полностью развиты; через «пропускные» клетки в эндодерме.

(2) Используемый в настоящей работе метод выделения КС приводит к получению препарата, в котором не нарушена архитектура корня (Meuchik, Yermakov, 2001), 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, Mg, Fe и т.д. (Marschner, 1995), которые присутствуют в среде, но отсутствуют в препаратах изолированной стенки.
- (4) При повышенных концентраций тяжелых металлов корни растений выделяют в среду органические хелаторы, образующие прочные комплексы с ионами меди (Qin et al., 2007), что может препятствовать связыванию металла с КС в интактном корне, а также проникновению ионов металла в цитоплазму клеток корня.

Роль корневых экссудатов в защите растений от избытка ТМ обсуждается во многих исследованиях (Malachowska-Jutz, Gnida, 2015; Huang et al., 2015). Известно, что никотианамин (NA) обладает наибольшей специфичностью из известных лигандов по отношению к  $\text{Cu}^{2+}$  (Seregin, Kozhevnikova, 2020). Однако, в соответствии с данными литературы, комплекс NA с  $\text{Cu}^{2+}$  рассматривается только как транспортная форма этого иона при транслокации металла из корней в побеги бобовых растений (Flis et al., 2016). Кроме того, выделение NA в составе экссудатов корней встречается у ограниченного количества видов растений (Tsednee et al., 2014; Flis et al., 2016; Seregin, Kozhevnikova, 2021). Вторым по специфичности к ионам меди хелатором является гистидин, который в наших условиях ограничивает поступление металла в корень. Однако, His не мешает определению  $\text{Cu}^{2+}$  в растворе купризонным методом. Следовательно, выделение гистидина корнями вики не может объяснить разницу в данных между «убылью» ионов меди из среды инкубации и содержанием металла в корнях целых растений.

Таким образом, полученные в настоящей работе результаты позволяют предположить, что корни *V. sativa* выделяют в среду инкубации лиганды, которые ранее не были выявлены в экссудатах корней этого растения.

#### 4.6. Масс-спектрометрический анализ экссудатов корней растений вики посевной

Масс-спектрометрический анализ растворов с разной концентрацией ионов меди после инкубации растений *V. sativa* в них выявил выделение корнями растений четырех типов тритерпеновых гликозидов. Преобладающим во всех вариантах обработки являлся Soyasaponin I (Soyasaponin Bb).

Несмотря на то, что при 100 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$  в среде корнями вики выделяется наибольшее количество сапонинов, оно, тем не менее, более чем на порядок меньше количества ионов меди, остающихся в растворе после поглощения  $\text{Cu}^{2+}$  растениями. Однако, тот факт, что концентрация выделяемых сапонинов прямо пропорциональна концентрации ионов меди в среде (коэффициент корреляции 0,97) может свидетельствовать о том, что процесс выделения этих соединений, вероятно, направлен на снижение токсического действия  $\text{Cu}^{2+}$  на растения вики. Кроме того, показано, что сапонины, выделенные из других видов растений (*Camellia sinensis*, *Sapindus saponaria*), способны хелатировать ионы  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$  (Hong et al., 2002; Chen et al., 2008). Следует отметить, что секреция сапонинов корнями *V. sativa* в ответ на избыток  $\text{Cu}^{2+}$  в среде обнаружена нами впервые. Однако для бобовых ранее было показано выделение фенольных вторичных метаболитов в ответ на воздействие токсичных концентраций меди (Gagnon, Ibrahim, 1997; Jung et al., 2003). В составе корневых экссудатов растений вики ранее были обнаружены тритерпеноиды (в виде агликонов) (Evidente et al., 2011), а также агликоны флавоноидов (Recourt et al, 1991, Recourt et al, 1992). Показано, что у других представителей рода *Vicia* в корневых экссудатах доминируют флавоноиды (Nazrati et al., 2021). У *V. sativa* выделение сапонинов корнями, вероятно, является одним из факторов, приводящих к тому, что Cu-связывающая способность КС не реализуется в корнях, вследствие более высокой специфичности сапонинов к  $\text{Cu}^{2+}$  по сравнению с карбоксильными группами ПГК. Следует также отметить, что в составе экссудатов могут присутствовать и другие

органические соединения, которые мы не включили в анализ (например, низкомолекулярные органические кислоты, олиго- и полисахариды), и которые могут также снижать поглощение ионов меди корнями растений вики.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное нами исследование показало, что основным органом накопления ионов меди у растений вики являются корни. Действие исследуемых лигандов направлено на ограничение поступления ионов металла в корень. С другой стороны, в этих условиях (присутствие лигандов в среде обработки) снижается и Cu-связывающая способность КС корней. Данный факт позволяет предположить, что ограничение поступления ионов меди в корни обусловлено снижением адсорбционной способности КС корней в отношении  $\text{Cu}^{2+}$ .

Наши результаты дают основание заключить, что основной стратегией защиты *V. sativa* от избытка ионов меди в среде является депонирование металла в клеточных стенках корней. Известно, что в ответ на металл-стресс растения могут реализовывать различные стратегии изменения состава КС корня и ее ионообменной способности. В вариантах обработки растений 10 и 50 мкМ Cu нами обнаружено увеличение массовой доли КС в корнях по сравнению с контролем, при этом содержание ионообменных групп в КС не изменялось, но увеличивалось содержание  $\text{Cu}^{2+}$  в корне. Полученные экспериментальные данные позволяют заключить, что в этих условиях происходит усиление биосинтеза компонентов КС, в том числе и пектинов с такой же степенью метилирования карбоксильных групп, как у контрольных растений. Ранее такой ответ на увеличение концентрации ионов меди был обнаружен в корнях маша (Meuchik et al., 2016).

Стратегия, заключающаяся в снижении катионообменной способности КС, выявлена нами в вариантах обработки *V. sativa* комплексами медь-лиганд, а также при обработке растворами с максимальной концентрацией  $\text{Cu}^{2+}$  (100 мкМ) в отсутствии лигандов. Ранее было показано, что формирование подобных «металл-исключающих» КС препятствует накоплению ТМ в апопласте и также, вероятно, ограничивает симпластное поглощение металла клетками корня (Colzi et al., 2012).

В работах, посвященных исследованию влияния лигандов на передвижение металлов в растениях, большое внимание отводится вопросу содержания этих соединений в ксилемной пасоке и их роли в транслокации ионов ТМ в побеги.

Некоторые исследователи полагают, что комплексы Cu(II), в частности, с гистидином и глутамином, являются одними из основных транспортных форм у растений при перемещении по ксилеме из корня в надземную часть (Ryan et al., 2013). Результаты нашего исследования о влиянии этих лигандов на Cu-связывающую способность КС корней и побегов позволяют утверждать, что перемещение комплексов Cu(II) с глутамином и гистидином по ксилеме из корня в надземную часть будет сопровождаться взаимодействием этих комплексов с ионообменными группами КС ксилемы.

Нами впервые обнаружено, что в составе корневых экссудатов растений вики в ответ на избыток ионов меди в среде выделяются тритерпеновые гликозиды. Согласно данным литературы роль этих соединений заключается в связывании ионов меди в растворе для ограничения поступления металла в корень. В связи с этим, выделение тритерпеновых гликозидов в составе экссудатов корней вики в ответ на увеличение концентрации  $\text{Cu}^{2+}$ , вероятно, можно рассматривать как механизм защиты растений вики от действия  $\text{Cu}^{2+}$ .

## ВЫВОДЫ

1. У растений вики посевной основным местом накопления ионов меди является корневая система. При этом действие гистидина и глутамина направлено на ограничение поступления металла в корень;
2. Клеточные стенки корней и побегов растений *V. sativa* характеризуются высокой связывающей способностью в отношении ионов меди;
3. Избыток  $\text{Cu}^{2+}$  в среде приводит к модификации структуры клеточной стенки: при 10 и 50 мкМ Cu усиливается биосинтез клеточной стенки корней без изменения соотношения её компонентов, а при 100 мкМ увеличивается степень лигнификации КС корня.
4. Присутствие гистидина и глутамин в среде выращивания приводит к снижению медь-связывающей способности КС корней и побегов, тем самым дополнительно ограничивая поступление  $\text{Cu}^{2+}$  в растение;
5. В ответ на присутствие в среде ионов меди корнями растений вики посевной выделяются тритерпеновые гликозиды, главным образом Soyasaponin I.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Водяницкий Ю. Н., Ладонин Д. В., Савичев А. Т. Загрязнение почв тяжелыми металлами [Текст]/ Москва: Типография Россельхозакадемии. – 2012. – С. 304: ил., табл.; 20 см
2. Иванов В.Б., Быстрова Е.И., Серегин И.В. Сравнение влияния тяжелых металлов на рост корня в связи с проблемой специфичности и избирательности их действия// Физиология растений. – 2003. – Т. 50. – С. 445 – 454.
3. Клаус А.А., Лысенко Е.А., Холодова В.П. Рост растений кукурузы и накопление фотосинтетических пигментов при кратко- и долгосрочном воздействии кадмия // Физиология растений. – 2013. – Т 60. № 2. – С. 246 – 256.
4. Кожевникова А.Д., Серегин И.В., Быстрова Е.И., Беляева А.И., Катаева М.Н., Иванов В.Б. Влияние нитратов свинца, никеля и стронция на деление и растяжение клеток корня кукурузы // Физиология растений. – 2009. – Т. 56, № 2. – С. 267 – 277.
5. Марченко З. Фотометрическое определение элементов [Текст] / Пер. с польск. И. В. Матвеевой и д-ра хим. наук А. А. Немодрука; под ред. чл.-кор. АН СССР Ю. А. Золотова. – Москва: Мир., –1971. –С. 502.
6. Мейчик Н.Р., Ермаков И.П., Прокопцева О.С. Диффузия органического катиона в клеточных стенках корня // Биохимия. – 2003. – Т. 68, № 7. – С. 926–940.
7. Мейчик Н.Р., Николаева Ю.И., Ермаков И.П. Ионообменные свойства клеточных стенок корней *Spinacia oleracea* L. при разных условиях засоления внешней среды // Биохимия. – 2006а. – Т. 71, № 7. – С. 961–971.
8. Мейчик Н.Р., Матвеева Н.П., Николаева Ю.И., Чайкова А.В., Ермаков И.П. Особенности состава ионогенных групп полимерного матрикса оболочки пыльцевого зерна лилии // Биохимия. – 2006б. – Т. 71, № 8. – С. 1103–1111.

9. Мейчик Н.Р., Попова Н.И., Николаева Ю.И., Ермаков И.П., Камнев А.Н. Ионнообменные свойства клеточных стенок красной водоросли *Phyllophora crispa* // Прикладная биохимия и микробиология. –2011. –Т. 47, № 2. –С. 194–201.
10. Румянцева Н.И. Арабиногалактановые белки: участие в росте и морфогенезе растений // Биохимия. –2005. –Т. 70, № 10. – С. 1301 – 1317.
11. Серегин И. В., Кожевникова А. Д., Схат Х. Сравнительный анализ влияния L-гистидина на поступление никеля в побеги различных видов рода *Alyssum*// Физиология растений. –2019. –Т. 66, № 2. – С.151–155.
12. Шатаева Л. А., Кузнецова Н. Н., Елькин Г. Е., Карбоксильные катиониты в биологии [Текст]// Под ред. Самсонова Г.В. – Ленинград: Наука., – 1979, – С. 28; ил.;22 см.
13. Adriano D.C. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risk of metals. Second edition / Adriano D.C. – New York: Springer. – 2001. – Vol. 1. – P. 1 – 29.
14. Angelov M., Tsonev T., Dobrinova K., Velikova V., Stoyanova T. Changes in some photosynthetic parameters in pea plants after treatment with cobalt. // Photosynthetica. – 1993. – Vol. 28. – P. 289 – 295.
15. Araújo G.C.L., Lemos S.G., Nabais C. Nickel sorption capacity of ground xylem of *Quercus ilex* trees and effects of selected ligands present in the xylem sap // Journal of Plant Physiology. – 2009. – Vol 166. – P. 270—277.
16. Barcelo J., Poschenrieder C.H. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review // J Plant Nutr. – 1990. – Vol. 13. – P. 1 – 37
17. Bertrand M., Poirier I. Photosynthetic organisms and excess of metals // Photosynthetica. – 2005. – Vol. 43. № 3. – P. 345 – 353.
18. Bouazizi H., Jouili H., Geitmann A., Ferjani E. Cupric Stress Induces Oxidative Damage Marked by Accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Changes to Chloroplast Ultrastructure in Primary Leaves of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) // Acta biologica Hungarica. – 2010. – Vol. 61 №2. – P. 191 – 203.

19. Burton R., Gidley M., Fincher G. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. // *Nat Chem Biol.* – 2010. – Vol. 6. – P. 724–732.
20. Callahan D.L., Baker A.J.M., Kolev S.D., Wedd A.G. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants // *Journal of Biological Inorganic Chemistry.* – 2006. – Vol. 11. – P. 2 – 12.
21. Carpita N. C, Gibeaut D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. // *Plant J.* – 1993. – Vol. 3, № (1). – P.1-30.
22. Cataldo D.A., Fadden T.R. Mc, Garland T.R., Wildung R.E. Organic constituents and complexation of Ni (II), cadmium (II) and plutonium (IV) in soybean xylem exudates // *Plant Physiol.* – 1988. – Vol. 56. – P. 734 – 739.
23. Caffall K.H., Mohnen D. The Structure, Function, and Biosynthesis of Plant Cell Wall Pectic Polysaccharides. // *Carbohydrate Research.* – 2009. – Vol. 344. – P. 1879 – 1900.
24. Centofanti T., Sayers Z., Cabello-Conejo M.I., Kidd P., Nishizawa N.K., Kakei Y., Davis A.P., Sicher R.C., Chaney R.L. 2013. Xylem exudate composition and root-to-shoot nickel translocation in *Alyssum* species // *Plant and Soil.* – 2013. – Vol. 373. – P. 59 – 75.
25. Chen W.-J., Hsiao L.-C., Chen K. K. Y. Metal desorption from copper (II)/nickel(II)-spiked kaolin as a soil component using plant-derived saponic biosurfactant. // *Proc. Biochem.* – 2008. – Vol. 43. – P. 488–498.
26. Clemens S., Palmgren M.G., Krämer U. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation // *Trends in Plant Science.* – 2002. – Vol. 7, №7. – P. 309–315.
27. Clemens S. Evolution and function of phytochelatin synthases. // *J. Plant Physiol.* – 2006. – Vol. 163. – P. 319–332.
28. Colzi I., Arnetoli M., Gallo A., Doumet S., Del Bubba M., Pignattelli S., Gabbrielli R., Gonnelli C. Copper tolerance strategies involving the root cell wall pectins in *Silene paradoxa* L. // *Environmental and Experimental Botany.* – 2012. – Vol. 78. – P. 91 – 98.

29. Cosgrove D.J., Jarvis M.C. Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls // *Frontiers in Plant Science*. – 2012. – Vol. 22, № 3. – P. 204.
30. Correia dos Santos M.M., Alves S., Simões Gonçalves M. L., Nabais C. Dynamic Modelling of Nickel Complexation in Xylem sap of *Quercus ilex*: A Voltammetric Study // *Electroanalysis*. – 2006. – Vol. 18, № 8. – P. 814 – 822.
31. Dakora F.D., Phillips D.A. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments // *Plant and Soil*. – 2002. – Vol. 245. – P. 35 – 47.
32. Dalir N., Khoshgoftarmanesh A.H. Root uptake and translocation of nickel in wheat as affected by histidine // *Journal of Plant Physiology*. – 2015. – Vol. 184. – P. 8 – 14.
33. Davarski K.A., Manolov S.N., Petrova I.N., Mavrov V.D. Complex equilibria in the system  $M^{2+}$ -polygalacturonic acid (pectin) - H<sub>2</sub>O (M = Co, Ni, Cu, Zn, Cd and Pb) // *J. Coord Chem*. – 1994. – Vol. 33. – P. 75 – 81.
34. De Silva N. D. G., Cholewa E., Ryser P. Effects of combined drought and heavy metal stresses on xylem structure and hydraulic conductivity in red maple (*Acer rubrum* L.) // *J Exp Bot*. – 2012. – Vol. 63. – P. 5957 – 5966.
35. Degryse F., Smolders E., Parker D. R. Metal complexes increase uptake of Zn and Cu by plants: implications for uptake and deficiency studies in chelator-buffered solutions// *Plant Soil*. – 2006. – Vol. 289. – P.171 – 185.
36. Delhaize E., Ryan P. R. Aluminum toxicity and tolerance in plants // *Plant Physiology*. – 1995. – Vol. 107. – P. 315 – 321.
37. DiDonato R. J., Roberts L. A., Sanderson T., Easley R. B., Walker E.L. Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine–metal complexes // *Plant Journal*. – 2004. – Vol. 39. – P. 403 – 414.
38. Dinkeloo K., Boyd S., Pilot G. Update on amino acid transporter functions and on possible amino acid sensing mechanisms in plants. // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2018. – Vol. 74. – P. 105–113

39. Duarte B., Delgado M., Caçador I. The role of citric acid in cadmium and nickel uptake and translocation, in *Halimione portulacoides* // *Chemosphere*. –2007. – Vol. 69, № 5, – P. 836 – 840.
40. Eticha D., Stass A., Horst W.J. Cell-wall pectin and its degree of methylation in the maize root-apex: significance for genotypic differences in aluminium resistance // *Plant, Cell and Environment*. – 2005. – Vol. 28. – P. 1410 – 1420.
41. Evidente A., Cimmino A., Fernández-Aparicio M., Rubiales D., Andolfi A., Melck D. Soyasapogenol B and trans-22-dehydrocam- pesterol from common vetch (*Vicia sativa* L.) root exudates stimulate broomrape seed germination // *Pest Manag Sci*. – 2011. – Vol. 67, № 8. – P. 1015 – 22.;
42. Field T.B., McCourt J.L., McBryde W.A.E. Composition and stability of iron and copper citrate complexes in aqueous solution // *Canadian Journal of Chemistry*. – 1974. – Vol. 52. № 17. – P. 3119 – 3124.
43. Flis P., Ouerdane L., Grillet L., Curie C., Mari S., Lobinski R. Inventory of metal complexes circulating in plant fluids: a reliable method based on HPLC coupled with dual elemental and high-resolution molecular mass spectrometric detection // *New Phytol*. – 2016. – Vol. 211. № 3. – P. 41 – 54.
44. Fu H., Yu H., Li H., Zhang X. Influence of cadmium stress on root exudates of high cadmium accumulating rice line (*Oryza sativa* L.) // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2018. – Vol. 150, – P. 168-175.
45. Fujimatsu T., Endo K., Yazaki K., Sugiyama A. Secretion dynamics of soyasaponins in soybean roots and effects to modify the bacterial composition // *Plant Direct*. – 2020. – V. 4, № 9. – P. 1 – 12.
46. Gabbrielli R., Pandolfini T., Espen L., Palandri M.R. Growth, peroxidase activity and cytological modifications in *Pisum sativum* seedlings exposed to Ni<sup>2+</sup> toxicity // *Journal of Plant Physiology*. – 1999. – Vol. 155. – P. 639 – 645
47. Gaetke L.M., Chow-Johnson H.S., Chow C.K. Copper: toxicological relevance and mechanisms // *Archives of Toxicology*. – 2014. – Vol. 88, № 11. –P. 1929 – 1938.

48. Gajewska E., Sklodowska M., Slaba M., Mazur J. Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots // *Biologia Plantarum*. – 2006. – Vol. 50. – P. 653 – 659.
49. Gagnon H., Ibrahim R. K. Effects of various elicitors on the accumulation and secretion of isoflavonoids in white lupin. // *Phytochemistry*. – 1997. – Vol. 44. – P. 1463–1467.
50. Gong Z., Xiong L., Shi H., Yang S., Herrera-Estrella L. R., Xu G., Chao D.-Y., Li J., Wang P.-Y., Qin F., Li J., Ding Y., Shi Y., Wang Y., Yang Y. Guo Y., Zhu J.-K. Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency. // *Sci. China Life Sci.* – 2020. – Vol. 63. – P. 635 – 674.
51. Guigues S., Bravin M., Garnier C., Masion A., Doelsch E. Isolated cell walls exhibit cation binding properties distinct from those of plant roots // *Plant and Soil*. – 2014. – Vol. 381. – P. 367–379.
52. Guo H., Feng X., Hong C., Chen H., Zeng F., Zheng B., Jiang D. Malate secretion from the root system is an important reason for higher resistance of *Miscanthus sacchariflorus* to cadmium // *Physiol Plant*. – 2017. – Vol. 159, № 3. – P. 340-353.
53. Hall J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance // *Journal of Experimental Botany*. – 2002. – Vol. 53. – P. 1–11.
54. Hasan M. K., Cheng Y., Kanwar M. K., Chu X. Y., Ahammed G. J., Qi Z. Y. Responses of Plant Proteins to Heavy Metal Stress: A Review. // *Front Plant Sci.* – 2017. – Vol. 5, № 8. – P. 1492 - 1508.
55. Hazrati H., Fomsgaard I. S., Kudsk P. Targeted metabolomics unveil alteration in accumulation and root exudation of flavonoids as a response to interspecific competition // *Journal of Plant Interactions*. – 2021. – Vol. 16, № 1. – P. 53 – 63.
56. Hill K.A., Lion L.W., Ahner B.A. Reduced Cd accumulation in *Zea mays*: a protective role for phytosiderophores? // *Environ. Sci. Technol.* – 2002. – Vol. 36. – P. 5363 – 5368.
57. Hirayama T., Kieber J., Hirayama N., Kogan M., Guzman P., Nourizadeh S., Alonso J., Dailey W., Dancis A., Ecker J. RESPONSIVE-TOANTAGONIST1, a

- Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signalling in Arabidopsis. *Cell*. // – 1999. – Vol. 97. – P. 383-393.
58. Hong K. J., Tokunaga S., Kajiuchi T. Evaluation of remediation process with plant-derived biosurfactant for recovery of heavy metals from contaminated soils. // *Chemosphere*. – 2002. – Vol. 49. – P. 379–387.
59. Huang X.-Y., Deng F., Yamaji N., Pinson S., Fujii-Kashino M., Danku J., Douglas A., Guerinot M., Salt D. A heavy metal P-type ATPase OsHMA4 prevents copper accumulation in rice grain. // *Nature Communications*. – 2016. – Vol. 7. – P. 1 – 13.
60. Huang G., Guo G., Yao Sh., Zhang N., Hu H. Organic Acids, Amino Acids Compositions in the Root Exudates and Cu-accumulation in Castor (*Ricinus communis* L.) under Cu Stress // *International journal of phytoremediation*. – 2015. – Vol. 18, № 1. – P. 33 – 40.
61. Irtelli B., Peprucci W.A., Navari-Izzo F. Nicotianamine and histidine/proline are, respectively, the most important copper chelators in xylem sap of *Brassica carinata* under conditions of copper deficiency and excess // *Journal of Experimental Botany*. – 2009. – Vol. 60, No. 1. – P. 269 – 277.
62. Jämtgård S, Näsholm T, Huss-Danell K (2008) Characteristics of amino acid uptake in barley // *Plant Soil*. – 2008. – Vol. 302. – P. 221 – 231.
63. Jalali K., Nouairi I., Kallala N., M'Sehli W., Zribi K., Mhadhb H. Germination, seedling growth and antioxidant activity in four legume (Fabaceae) species under copper sulphate fungicide treatment // *Pak. J. Bot.* – 2018. – Vol. 50, № 4. – P. 1599 – 1606.
64. Jung C., Maeder V., Funk F., Frey B., Sticher H., Frossard E. Release of phenols from *Lupinus albus* L. roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification. // *Plant and Soil*. – 2003. – Vol. 252. – P. 301–312.
65. Kartel M. T., Kupchik L. A., Veisov B. K. Evaluation of pectin binding of heavy metal ions in aqueous solutions. // *Chemosphere*. – 1999. – Vol. 38. – P. 2591 – 2596

66. Kerkeb L., Krämer U. The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea* // *Plant Physiol.* – 2003. – Vol. 131. – P. 716 – 724.
67. Konno H., Nakato T., Nakashima S., Katoh K. *Lycopodium japonicum* fern accumulates copper in the cell wall pectin. // *J Exp Bot.* – 2005. – Vol. 56. – P. 1923 – 1931
68. Konno H., Nakashima S., Katoh K. Metal-tolerant *Scopelophila cataractae* moss accumulates copper in the cell wall pectin of protonemata under copper-enriched conditions. // *J Plant Physiol* – 2010. – Vol. 167. – P. 358 – 364
69. Kopittke P.M., Menzies N.W. Effect of Cu toxicity on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*) // *Plant and Soil.* – 2006. – Vol. 279. – P. 287 – 296.
70. Kopittke P. M., McKenna B. A., Karunakaran C., Dynes J. J., Arthur Z., Gianoncelli A., Kourousias G., Menzies N. W., Ryan P. R., Wang P., Green K., Blamey F. P. C. (2017) Aluminum Complexation with Malate within the Root Apoplast Differs between Aluminum Resistant and Sensitive Wheat Lines // *Front. Plant Sci.* – 2017. – Vol. 8. – P. 1 – 11.
71. Krämer U., Cotter-Howells J. D., Charnock J. M., Baker A. J. M., Smith J.A.C. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel // *Nature.* – 1996. – Vol. 379. – P.635 – 638
72. Krämer U., Pickering I.J., Prince R.C., Raskin I., Salt D.E. Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species // *Plant Physiology.* – 2000. – Vol. 122. – P. 1343 – 1353.
73. Krzesłowska M., Lenartowska M., Samardakiewicz S., Bilski H., Woźny A. Lead deposited in the cell wall of *Funaria hygrometrica* protonemata is not stable-A remobilization can occur // *Environmental pollution.* – 2009. – Vol. 158. – P. 325 – 338.
74. Krzesłowska M. The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy // *Acta Physiologiae Plantarum.* – 2011. – Vol. 33. – P. 35 – 51.

75. Kure J., Gana M., Isah M. R., Ukubuiwe C. C. (2018). Bacteria associated with heavy metal remediation: a review. // *International Journal of Applied Biological Research*. – 2018. – Vol. 9. – P. 134 – 148.
76. Lamport D., Kieliszewski M., Chen Y., Cannon M. Role of the extensin superfamily in primary cell wall architecture // *Plant Physiology*. – 2011. – Vol. 156. – P. 11–19.
77. Laurent-Martínez E. J., Spínola V., Gouveia S., Castilho P. C. HPLC-ESI-MSn characterization of phenolic compounds, terpenoid saponins, and other minor compounds in *Bituminaria bituminosa* // *Industrial Crops and Products*. – 2015. – V. 69. – P. 80-90
78. Lequeux H., Hermans C., Lutts S., Verbruggen N. Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2010. – Vol. 48. – P. 673 – 682.
79. Li Z., Wu L., Hu P., Luo Y., Christie P. Copper changes the yield and cadmium/zinc accumulation and cellular distribution in the cadmium/zinc hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola* // *Journal of Hazardous Materials*. – 2013. – Vol. 261. – P. 332 – 341.
80. Liao M. T., Hedley M. J., Woolley D. J., Brooks R. R., Nichols M. A. Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Grasslands Puna) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Rony) plants grown in NFT system. I. Copper uptake and distribution in plants // *Plant and Soil*. – 2000. – Vol. 221 №2. – P. 135 – 142.
81. Linger P., Ostwald A., Haensler J. *Cannabis sativa* L. growing on heavy metal contaminated soil: growth, cadmium uptake and photosynthesis // *Biol Plant*. – 2005. – Vol. 49, № 4. – P. 567 – 576.
82. Liu L. F., Li W. H., Li M. Y., Wu X. Z., Yang F., Xu J. N., Yuan C. S. Chemical constituents from common vetch (*Vicia sativa* L.) and their antioxidant and cytotoxic activities // *Nat Prod Res*. – 2020. – Vol. 34, № 22. – P. 3205-3211.

83. Luo J. S., Huang J., Zeng D. L., Peng J. S., Zhang G. B., Ma H. L., Guan Y., Yi H. Y., Fu Y. L., Han B., Lin H. X., Qian Q., Gong J. M. A defensin-like protein drives cadmium efflux and allocation in rice. // Nat Commun. – 2018. – Vol. 9, № 1. – P. 645 – 654
84. Luo Q., Wang S., Sun L., Wang H., Bao T., Adeel M. Identification of root exudates from the Pb-accumulator *Sedum alfredii* under Pb stresses and assessment of their roles. // Journal of Plant Interactions. – 2017. – Vol. 12, № 1. – P. 272 – 278.
85. Malachowska-Jutz A., Gnida A. Mechanisms of stress avoidance and tolerance by plants used in phytoremediation of heavy metals // Archives of Environmental Protection. – 2015. – Vol. 41, № 4. – P. 104 – 114.
86. Manceau A.1., Simionovici A., Lanson M., Perrin J., Tucoulou R., Bohic S., Fakra S.C., Marcus M.A., Bedell J.P., Nagy K.L. 2013 Thlaspi arvense binds Cu(II) as a bis-(L-histidinato) complex on root cell walls in an urban ecosystem // Metallomics. – 2013. – Vol. 5, № 12. – P. 1674 – 1684.
87. Mangeon A., Junqueira R. M., Sachetto-Martins G. Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. // Plant Signal Behav. – 2010. – Vol. 5. – P. 99–104
88. Marschner H. Effect of soil acidification on root growth, nutrient and water uptake. // International congress on forest decline research: State of knowledge and perspectives. – 1989. – Vol 1. – P. p. 575
89. Marschner H. Mineral nutrition of higher plants, 2nd ed. // London: Academic Press. – 1995. – P. 674: 24 cm.
90. Mahmood T., Islam K.R. and Muhammad S. Toxic Effects of Heavy Metals on Early Growth and Tolerance of Cereal Crops. // Pakistan Journal of Botany. – 2007. – Vol. 39. – P. 451 – 462.
91. McNeil M., Darvill A.G., Fry S.C., Albersheim P. Structure and function of the primary cell walls of plants // Annual Review of Biochemistry. – 1984. – Vol. 53. – P. 625 – 663.
92. Mellerowicz E. J., Gorshkova T. A., Tensional stress generation in gelatinous fibres: a review and possible mechanism based on cell-wall structure and

- composition. // *Journal of Experimental Botany*. – 2012. – Vol. 63, № 2. – P. 551 – 565
93. Meier S., Alvear M., Borie F., Aguilera P., Ginocchio R., Cornejo P. Influence of copper on root exudate patterns in some metallophytes and agricultural plants // *Ecotoxicol Environ Saf*. – 2012. – Vol. 75, № 1. – P. 8 – 15.
  94. Meychik N. R., Yermakov I. P. A new approach to the investigation on the ionogenic groups of root cell walls // *Plant and Soil*. – 1999. – Vol. 217. – P. 257–264.
  95. Meychik N. R., Yermakov I. P. Ion exchange properties of plant root cell walls // *Plant Soil*. – 2001. – Vol. 234, №2. – P. 181 – 193.
  96. Meychik N. R., Nikolaeva Yu. I., Kushunina M. A., Yermakov I. Are the carboxyl groups of pectin polymers the only metal-binding sites in plant cell walls? // *Plant and Soil*. – 2014. – Vol. 381. – P. 25 – 34.
  97. Meychik N., Nikolaeva Y., Kushunina M., Yermakov I. P. Contribution of apoplast to short-term copper uptake by wheat and mung bean roots. // *Funct Plant Biol*. – 2016. – Vol. 43, № 5. – P. 403 – 412.
  98. Meychik N. R., Nikolaeva Yu. I., Kushunina M. A. The role of the cell walls in Ni binding by plant roots. *J Plant Physiol*. – 2019. – Vol. 234. – P. 28 – 35.
  99. Meychik N. R., Nikolaeva Yu. I., Kushunina M. A. The significance of ion-exchange properties of plant root cell walls for nutrient and water uptake by plants // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2021. – Vol. 166. – P. 140-147.
  100. Migocka M., Malas K. Plant Responses to Copper: Molecular and Regulatory Mechanisms of Copper Uptake, Distribution and Accumulation in Plants // *Plant Micronutrient Use Efficiency*. Academic Press. – 2018, – P. 71 – 86,
  101. Milner M. J., Seamon J., Craft E., and Kochian L. V. Transport properties of members of the ZIP family in plants and their role in Zn and Mn homeostasis // *J. Exp. Bot*. – 2013. – Vol. 64. – P. 369 – 381.
  102. Muñoz, A. J., Ruiz, E., Abriouel, H., Gálvez, A., Ezzouhri, L., Lairini, K., et al. Heavy metal tolerance of microorganisms isolated from wastewaters: identification

- and evaluation of its potential for biosorption // *Chem. Eng. J.* – 2012. – Vol. 210. – P. 325–332.
103. Nascimento Y. M., Abreu L. S., Lima R. L., Costa V. C. O., Melo J. I. M., Braz-Filho R., Silva M. S., Tavares J. F. Rapid Characterization of Triterpene Saponins from *Zornia brasiliensis* by HPLC-ESI-MS/MS // *Molecules.* – 2019. – Vol. 24, № 14. – P. 2519 – 2533.
  104. Oladipo O. G., Awotoye O.O., Olayinka A., Bezuidenhout C.C., Maboeta M.S. Heavy metal tolerance traits of filamentous fungi isolated from gold and gemstone mining sites // *Braz J Microbiol.* – 2018. – Vol. 49, № 1. – P. 29 – 37.
  105. Parrotta L., Guerriero G., Sergeant K., Cai G., Hausman J.F. Target or barrier? The cell wall of early- and later- diverging plants vs cadmium toxicity: differences in the response mechanisms. // *Frontiers in Plant Science.* – 2015. – Vol. 6. – P. 1 – 17
  106. Pich A., Scholz G. Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): nicotianamine–stimulated copper transport in the xylem // *Journal of Experimental Botany.* – 1996. – Vol. 47. – P. 41–47.
  107. Printz B., Lutts S., Hausman J-F., Sergeant K. 2016. Copper Trafficking in Plants and Its Implication on Cell Wall Dynamics // *Frontiers in Plant Science.* – 2016. – Vol. 7. – P. 1 – 16.
  108. Punz W.F., Sieghardt H. The response of roots of herbaceous plant species to heavy metals // *Environ Exp Bot.* – 1993. – Vol. 33. – P.85 – 86.
  109. Qin, R., Hirano, Y., Brunner, I. Exudation of organic acid anions from poplar roots after exposure to Al, Cu and Zn // *Tree Physiol.* – 2007. – Vol. 27. – P. 313 – 320.
  110. Recourt K., van Tunen A. J., Mur L. A., van Brussel A. A., Lugtenberg B. J., Kijne J. W. Activation of flavonoid biosynthesis in roots of *Vicia sativa* subsp. *nigra* plants by inoculation with *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* // *Plant Mol Biol.* – 1992. – V. 19, № 3. – P. 411 – 420.
  111. Recourt K., Schripsema J., Kijne J. W., van Brussel A. A., Lugtenberg B. J. Inoculation of *Vicia sativa* subsp. *nigra* roots with *Rhizobium leguminosarum*

- biovar *vicia* results in release of nod gene activating flavanones and chalcones // *Plant Mol Biol.* – 1991. – Vol. 16, № 5. – P. 841 – 52.
112. Redjala T., Sterckeman T., Skiker S., Echevarria G. Contribution of apoplast and symplast to short term nickel uptake by maize and *Leptoplax emarginata* roots // *Environmental and Experimental Botany.* – 2010. – Vol. 68. – P. 99 – 106.
113. Rees J. D., Ingle R. A., Smith J. A. C. Relative contributions of nine genes in the pathway of histidine biosynthesis to the control of free histidine concentrations in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Biotechnology Journal.* – 2009. – Vol. 7. – P. 499 – 511.
114. Richau K. H., Kozhevnikova A. D., Seregin I. V., Vooijs R., Koevoets P. L. M., Smith J. A. C., Ivanov V.B., Schat H. Chelation by histidine inhibits the vacuolar sequestration of nickel in roots of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* // *New Phytologist.* – 2009. – Vol. 183. – P. 106 – 116.
115. Rivetta A., Negrini N., Cocucci M. Involvement of Ca<sup>2+</sup>- calmodulin in Cd<sup>2+</sup> toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. // *Plant Cell Environ.* – 1997. – Vol. 20. – P. 600 – 608
116. Rostagno M., Manchón N., Guillamón E., García-Lafuente A., Villares A., Martínez J. A. Methods and techniques for the analysis of isoflavones in foods // *Chromatography: Types, Techniques and Methods.* – 2010. – P. 157 – 198.
117. Rout G. R., Samantaray S., Das P. Differential chromium tolerance among eight mungbean cultivars grown in nutrient culture // *J Plant Nutr.* – 1997. – Vol. 20. – P.473 – 483.
118. Rucińska-Sobkowiak R. Water relations in plants subjected to heavy metal stresses // *Acta Physiol Plant.* – 2016. – Vol 38. – P. 257 – 270.
119. Ryan B. M., Kirby J. K., Degryse F., Harris H., McLaughlin M. J., Scheiderich K. Copper speciation and isotopic fractionation in plants: uptake and translocation mechanisms // *New Phytologist.* 2013. Vol. 199. P. 367–378.
120. Salt D. E., Kato N., Kramer U., Smith R. D., Raskin I., The role of root exudates in nickel hyperaccumulation and tolerance in accumulator and non-accumulator

- species of *Thlaspi*. // *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL. – 2000. – P. 189 – 200.
121. Seregin, I.V., Kozhevnikova, A.D. & Schat, H. Histidine-Mediated Nickel and Zinc Translocation in *Arabidopsis thaliana* and *Lepidium ruderae* // *Russ J Plant Physiol.* – 2022. – Vol. 69. – P. 1 – 13.
  122. Seregin, I.V., Kozhevnikova, A.D. Low-molecular-weight ligands in plants: role in metal homeostasis and hyperaccumulation // *Photosynth Res.* – 2021. – Vol. 150. – P. 51 – 96.
  123. Seregin I. V., Ivanov V. B. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants // *Russian J Plant Physiol.* – 2001. – Vol. 4. – P. 523 – 544.
  124. Sattelmacher B. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition // *New Phytologist.* – 2009. – Vol. 149. – P. 167 – 192.
  125. Shah A., Kamei S., Kawai S. Metal micronutrients in xylem sap of iron-deficient barley as affected by plant-borne, microbial and synthetic metal chelators // *Soil Sci Plant Nutr.* – 2001. – Vol. 47. – P. 149 – 156.
  126. Shanker A. K., Cervantes C., Loza-Tavera H., Avudainayagam S. Chromium toxicity in plants // *Environ Int.* – 2005. – Vol. 31. – P. 739 – 751.
  127. Shikanai T., Müller-Moulé P., Munekage Y., Niyogi K. K., and Pilon M. PAA1, a P-type ATPase of *Arabidopsis*, functions in copper transport in chloroplasts. // *Plant Cell.* – 2003. – Vol. 15. – P. 1333–1346.
  128. Swire J. Selection on synthesis cost affects interprotein amino acid usage in all three domains of life // *J Mol Evol.* – 2007. – Vol. 64. – P. 558 – 571.
  129. Tsednee M, Yang SC, Lee DC, Yeh KC. Root-secreted nicotianamine from *Arabidopsis halleri* facilitates zinc hypertolerance by regulating zinc bioavailability // *Plant Physiol.* – 2014. – Vol. 166, №2. – P. 839 – 852.
  130. Tsuno Y., Fujimatsu T., Endo K., Sugiyama A., Yazaki K. Soyasaponins: A New Class of Root Exudates in Soybean (*Glycine max*) // *Plant and Cell Physiology.* – 2017. – Vol. 59, № 2. – P. 366 – 375.
  131. Viehweger K. How plants cope with heavy metals // *Botanical Studies.* – 2014. – Vol. 55. – P. 35 – 47.

132. White M. C., Decker A. M., Chaney R. L., Metal complexation in xylem fluid: I. Chemical composition of tomato and soybean stem exudate // *Plant Physiology*. – 1981. – Vol. 67, № 2. – P. 292 – 300.
133. White P.J. The pathways of calcium movement to the xylem // *Journal of Experimental Botany*. – 2001. – Vol. 52. – P. 891 – 899.
134. Wintz H., Fox T., Wu Y. Y., Feng V., Chen W. Q., Chang H. S., Zhu T., Vulpe C. Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis // *J Biol Chem*. – 2003. – Vol. 278. – P. 47644 – 47653.
135. Wycisk K., Kim E. J., Schroeder J. I., Krämer U. Enhancing the first enzymatic step in the histidine biosynthesis pathway increases the free histidine pool and nickel tolerance in *Arabidopsis thaliana*. // *FEBS Lett*. – 2004. – Vol. 578. – P. 128 – 134.
136. Yang Y. Y., Jung J. Y., Song W. Y., Suh H. S., Lee Y. Identification of rice varieties with high tolerance or sensitivity to lead and characterization of the mechanism of tolerance // *Plant Physiology*. – 2000. – Vol. 124. – P. 1019 – 1026.
137. Yuan, M., Li, X., Xiao, J., and Wang, S. Molecular and functional analyses of COPT/Ctr-type copper transporter-like gene family in rice. *BMC Plant Biol*. – 2011. – Vol. 11. – P. 1 – 12.
138. Zhao W., Shang Z., Li Q., Huang M., He W., Wang Z., Zhang J. Rapid Screening and Identification of Daidzein Metabolites in Rats Based on UHPLC-LTQ-Orbitrap Mass Spectrometry Coupled with Data-Mining Technologies // *Molecules*. – 2018. – Vol. 23, № 1. – P. 151 – 175.
139. Zhang Y, Yang X, The toxic effects of cadmium on cell division and chromosomal morphology of *Hordeum vulgare* // *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. – 1994. – Vol. 312, № 2. – P. 121 – 126,
140. Zhu X. F., Zheng C., Hu Y. T., Jiang T., Liu Y., Dong N. Y., Yang J. L., Zheng S. J. 2011 Cadmium-induced oxalate secretion from root apex is associated with cadmium exclusion and resistance in *Lycopersicon esulentum*. // *Plant Cell Environ*. – 2011. – Vol. 34, № 7. – P 1055 – 1064.