

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2024

Диссертация подготовлена на кафедре физиологии растений биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель

Мейчик Наталия Робертовна – д.б.н,
проф.

Официальные оппоненты:

Балнокин Юрий Владимирович
доктор биологических наук, профессор,
зав. лабораторией транспорта ионов и
солеустойчивости, ФГБУН Институт
физиологии растений им. К.А.
Тимирязева РАН

Казнина Наталья Мстиславовна
доктор биологических наук, ведущий
научный сотрудник лаборатории
экологической физиологии растений
Института биологии КарНЦ РАН

Осмоловская Наталия Глебовна
кандидат биологических наук, доцент,
старший научный сотрудник кафедры
физиологии и биохимии растений
биологического факультета Санкт-
Петербургского государственного
университета

Защита диссертации состоится «**19**» **апреля** 2024 г. в 15 ч. 35 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.015.6 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр 12, ауд М1.

email: dissovet_00155@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/2908>

Автореферат разослан «__» ____ 2024 г

Ученый секретарь диссертационного совета,

Кандидат биологических наук

Д.М. Гершкович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Во многих российских регионах, где развита промышленность и сельскохозяйственное производство, существует опасность загрязнения агроэкосистем тяжелыми металлами (ТМ). 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, биомасса, урожайность. В то же время, некоторые ТМ являются микроэлементами, необходимыми для роста и развития растений.

Внутриклеточные механизмы защиты растений от избытка ТМ в настоящее время широко изучаются и обсуждаются научным сообществом, и освещены в достаточном количестве обзоров (Migocka, Malas, 2018; Viehweger, 2014). 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, разрушая каким-либо способом клеточную стенку (КС), чтобы устранить ее влияние.

Однако именно клеточная стенка является первой клеточной структурой, взаимодействующей с окружающей средой. В связи с этим ряд авторов считает, что КС играет одну из ключевых ролей в защите растений от ТМ, обусловленную её высокой катионообменной способностью (Krzesłowska, 2011; Meychik et al., 2021). В подтверждение этого тезиса часто приводятся данные по растениям-металлофитам, 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 экссудатов, в состав которых входят различные лиганды, связывающие металлы в почвенном растворе (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 (Liao et al., 2000; Seregin, Kozhevnikova, 2021), роль клеточных стенок в этих процессах остается нераскрытой.

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 *V. sativa*. 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 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 могут быть внесены в курсы 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. Токсическое действие ионов меди на растения вики посевной проявляется в снижении сухой массы и оводненности корней и побегов. Гистидин и глутамин частично устраняют негативное действие избытка металла на растения;

2. У растений вики посевной основным местом накопления ионов меди является корневая система. При этом действие лигандов направлено на ограничение поступления металла в корень;

3. Клеточные стенки корней и побегов вики посевной характеризуются высоким содержанием карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты, что обуславливает их высокую связывающую способность в отношении ионов меди. Влияние лигандов на Cu -связывающую способность КС корней зависит от концентрации металла в растворе. Гистидин ограничивает адсорбцию металла в КС побегов, тогда как глутамин не оказывает значимого влияния на данный показатель;

4. Избыток ионов меди в среде приводит к модификации состава КС корней и побегов растений вики посевной. Ограничение поступления металла в корень гистидином и глутамином приводит к смене стратегии защиты растений вики с депонирования в КС на ограничение поглощения металла корнем;

5. В ответ на присутствие в среде ионов меди корни растений вики посевной выделяют тритерпеновые гликозиды, главным образом Soyasaponin I.

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

1. Всероссийская научная конференция с международным участием "Биология растений в эпоху глобальных изменений климата" (Уфа, 2023);

2. Международная конференция «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 опубликовано три статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК, а также 4 тезисов в сборниках материалов конференций.

Личный вклад соискателя заключается в планировании и проведении экспериментальных исследований, представленные 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 111 страницах машинописного текста и содержат 12 таблиц и 16 рисунков. Список цитируемой литературы включает 140 наименований, из которых 134 – на иностранном языке.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В разделе приведены литературные данные по токсическому действию тяжелых металлов (ТМ) на растительный организм. Проведен анализ данных по поступлению ионов металлов в клетку, осуществлен обзор работ, посвященных механизмам защиты растений от избытка металлов в среде, приведены существующие данные по участию

клеточной стенки и корневых экссудатов в устойчивости растений к токсическому действию ТМ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили девяти- или десятидневные растения вики посевной (*Vicia sativa* L.) сорта Льговская-22, выращенные на среде с низким содержанием элементов минерального питания с концентрацией ионов K^+ , NO_3^- , Cl^- , Na^+ , PO_4^{3-} ~ 0,01 г/л. Растения выращивали в климатической камере (24°C, освещенность ~ 110 мкмоль квантов/м²×с, 14-часовой день) при постоянной аэрации растворов и их замене каждые 7 дней.

Выделение полимерного матрикса клеточных стенок проводили из побегов и корней 10-дневных растений по описанному ранее методу (Meuchik, Yermakov, 2001).

Обработка растений. Растения вики девятидневного возраста переносили на растворы (150 мл, по 9 растений на сосуд) с концентрацией меди 10, 50 или 100 мкМ, или на растворы 10 или 100 мкМ $CuCl_2$ с добавлением L-гистидина или L-глутамина и выдерживали 24 часа. Концентрация гистидина составляла 0,5 мМ и 1 мМ, а глутамина – 1 мМ и 5 мМ. Контрольные растения выращивали 10 дней на среде с низким содержанием элементов минерального питания.

Определение количественного и качественного состава ионообменных групп проводили методом потенциометрического титрования (данные представлены в диссертации).

Определение концентрации ионов меди в растворе проводили с применением бис-(циклогексаноноксалил)дигидразона (купризонный метод). Определение меди в растительном материале проводили после сухого озоления (СНОЛ 3/10-В, Россия) и последующего растворения золы в соляной кислоте.

Медь-связывающую способность клеточных стенок, изолированных из корней и побегов, определяли в растворах того же состава, что и при обработке растений вики.

Анализ тритерпеновых гликозидов (сапонинов) в экссудатах корней вики проводили на хроматографе ACQUITY UPLC H-Class PLUS (Waters, США),

оснащенном гибридным времяпролетным масс-спектрометром Xevo G2-XS ToF (Waters, США). Данные получены совместно с к.б.н. Кочкиным Д.В.

Статистическая обработка результатов. Опыты проводили в 3–12 биологических повторах для каждого варианта обработки. Определение содержания ионов меди проводили в трех аналитических повторностях. Обработку данных проводили с помощью программ Microsoft Excel, MassLynx, R studio и языка программирования R. Достоверность различий между изучаемыми показателями определяли с помощью двухвыборочного t-критерия Уэлча.

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 $p \leq 0,05$. Значения с разными буквами указывают на значительные различия с $p > 0,05$. Эксперименты проводили согласно схеме, представленной на рисунке 1.



Рисунок 1. Схема экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Токсическое действие ионов меди на растения вики. Избыток меди в среде снижал сухую массу корней вики. У растений, обработанных 10 мкМ Cu^{2+} в течение 24 ч, сухая масса корней была на 11%, а в варианте обработки с самой высокой

концентрацией Cu^{2+} (100 мкМ) – на 20% меньше по сравнению с контролем соответственно (таблица 1). Однако сухая масса надземных частей растений существенно не отличалась от контроля даже в варианте обработки с максимальной концентрацией Cu^{2+} . Во всех вариантах отсутствовали видимые симптомы токсичности Cu^{2+} (некроз корней или хлороз листьев).

Таблица 1. Сухая масса корней ($m_{\text{корни}}$, г) и побегов ($m_{\text{побеги}}$, г) девяти растений вики после 24 ч обработки растворами Cu^{2+} с разной концентрации (C_{Cu} , мкМ).

C_{Cu}	$m_{\text{корни}}$	$m_{\text{побеги}}$
0 (контроль)	$0,082 \pm 0,016^a$	$0,201 \pm 0,004^{ab}$
10	$0,073 \pm 0,018^b$	$0,209 \pm 0,004^a$
50	$0,069 \pm 0,019^{bc}$	$0,190 \pm 0,005^b$
100	$0,066 \pm 0,020^c$	$0,189 \pm 0,005^b$

Содержание воды в тканях корня уменьшалось с увеличением концентрации меди в среде. При 10 мкМ Cu^{2+} оно было на 6% ниже, чем у контрольных растений, а при 100 мкМ – на 14% (таблица 2). Во всех вариантах обработки растений содержание воды в побегах не отличалось от контроля.

Таблица 2. Содержание воды в тканях корня ($K_{\text{корн}}$, г H_2O /г сух.массы корней) и побегов ($K_{\text{поб}}$, г H_2O /г сух.массы побегов) и отношение сухой массы КС к сухой массе корня ($D_{\text{корн}}$, %) и побега ($D_{\text{поб}}$, %) после 24 ч обработки растворами Cu^{2+} разной концентрации (C_{Cu} , мкМ).

C_{Cu}	$K_{\text{корн}}$	$D_{\text{корн}}$	$K_{\text{поб}}$	$D_{\text{поб}}$
0 (контроль)	$15,87 \pm 0,14^a$	$46,2 \pm 0,3^a$	$8,94 \pm 0,04^a$	$42,4 \pm 0,7^a$
10	$14,91 \pm 0,17^b$	$56,4 \pm 0,4^b$	$8,76 \pm 0,05^b$	$49,0 \pm 0,4^b$
50	$13,93 \pm 0,21^c$	$51,0 \pm 1,5^c$	$8,81 \pm 0,10^{ab}$	не опр.
100	$13,59 \pm 0,16^c$	$59,2 \pm 0,6^d$	$8,69 \pm 0,08^b$	$58,9 \pm 0,4^c$

И в побегах, и в корнях с увеличением концентрации Cu^{2+} в среде инкубации значительно возрастала доля сухой массы КС в сухой массе соответствующего органа (таблица 2). При концентрации Cu в среде 100 мкМ этот показатель достигал 59% как в корнях, так и в побегах (таблица 2).

Накопление ионов меди в тканях растений вики. Полученные результаты свидетельствуют, что содержание Cu^{2+} в корнях и побегах возрастает с увеличением концентрации CuCl_2 в инкубационной среде. При максимальной концентрации

металла (100 мкМ) эндогенное содержание в корнях достигало 52 мкмоль Cu^{2+} на 1 г сухой массы корня (рисунок 2А).

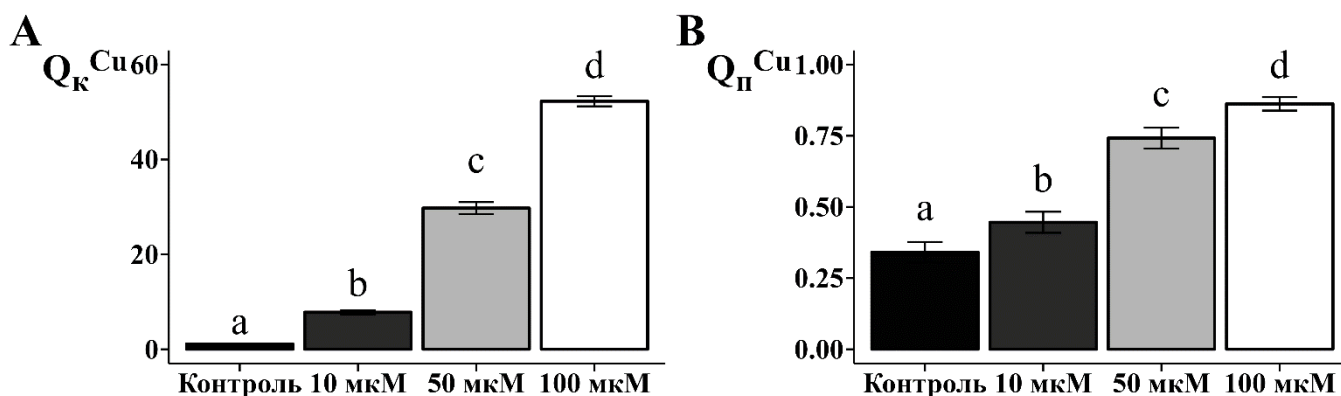


Рисунок 2. Эндогенное содержание Cu^{2+} в корнях (Q_k^{Cu} , мкмоль Cu/g сухой массы корня) (А) и побегах (Q_p^{Cu} , мкмоль Cu/g сухой массы побега) (В) растений *V. sativa* в зависимости от ее концентрации в среде инкубации.

Часть поступивших в корни ионов меди транспортировалась в надземные органы, что вызывало увеличение ее содержания в побегах (рисунок 2В). Независимо от концентрации ионов меди в среде, их содержание в корнях было намного больше, чем в побегах.

Таким образом, основным местом накопления Cu^{2+} у растений *V. sativa* является корневая система с незначительной транслокацией металла в надземные органы, что согласуется с данными литературы по другим видам растений (Kopittke, Menzies, 2006; Lequeux et al., 2010).

Действие лигандов направлено на ограничение поступления ионов меди в корни растений, так как по мере увеличения концентрации гистидина или глутамина в среде содержание Cu^{2+} в тканях снижается. Например, внесение 5 мМ глутамин в раствор, содержащий 10 мкМ CuCl_2 , приводит к снижению содержания Cu^{2+} в корнях практически до контрольных значений (рисунок 3А). Во всех вариантах с добавлением лигандов содержание меди в побегах также снижается вплоть до контрольных значений (рисунок 3В). Аналогичное действие гистидина и глутамин на поступление Cu^{2+} в корни и побеги наблюдалось и при максимальной обработке (100 мкМ CuCl_2). Приведенные результаты позволяют предположить, что в

медьсодержащих растворах и гистидин, и глутамин образуют комплексы с Cu^{2+} , что, вероятно, затрудняет поглощение металла корнями растений *V. sativa*.

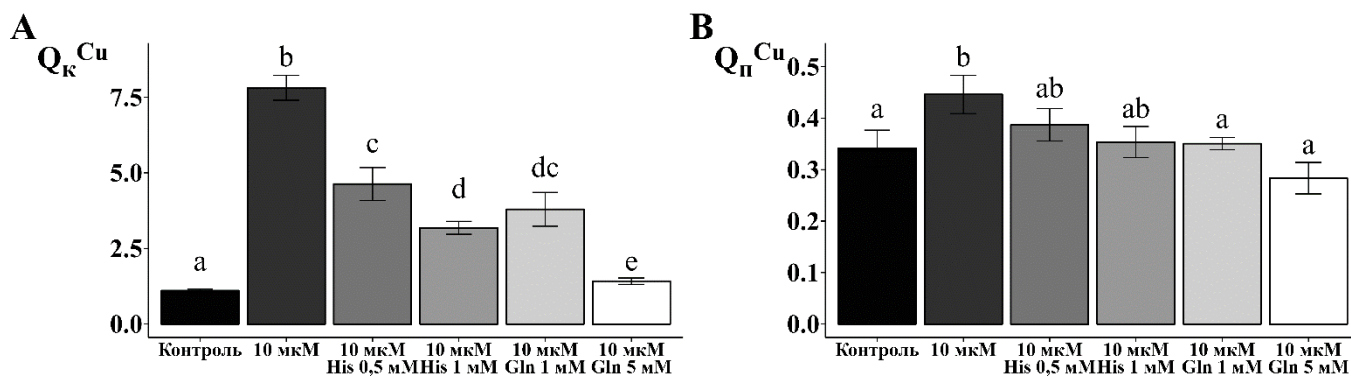


Рисунок 3. Влияние лигандов на содержание Cu^{2+} в корнях (А; Q_K^{Cu} , мкмоль $\text{Cu}/\text{г}$ сухой массы корня) и побегах (В; $Q_{\text{П}}^{\text{Cu}}$, мкмоль $\text{Cu}/\text{г}$ сухой массы побега.) растений *V. sativa* при концентрации CuCl_2 в средах инкубации 10 мкМ.

Адсорбция ионов меди КС, изолированными из корней и побегов контрольных растений – десятидневных растений вики, которые не подвергались обработке Cu -содержащим раствором перед выделением КС из корней и побегов.

Полученные результаты свидетельствуют, что с увеличением концентрации Cu^{2+} в растворе инкубации изолированных КС корней адсорбция металла увеличивается (рисунок 4А). Аналогичная зависимость наблюдается для КС побегов (рисунок 4В). Тем не менее, КС побегов адсорбируют значительно меньше ионов меди по сравнению с КС корней.

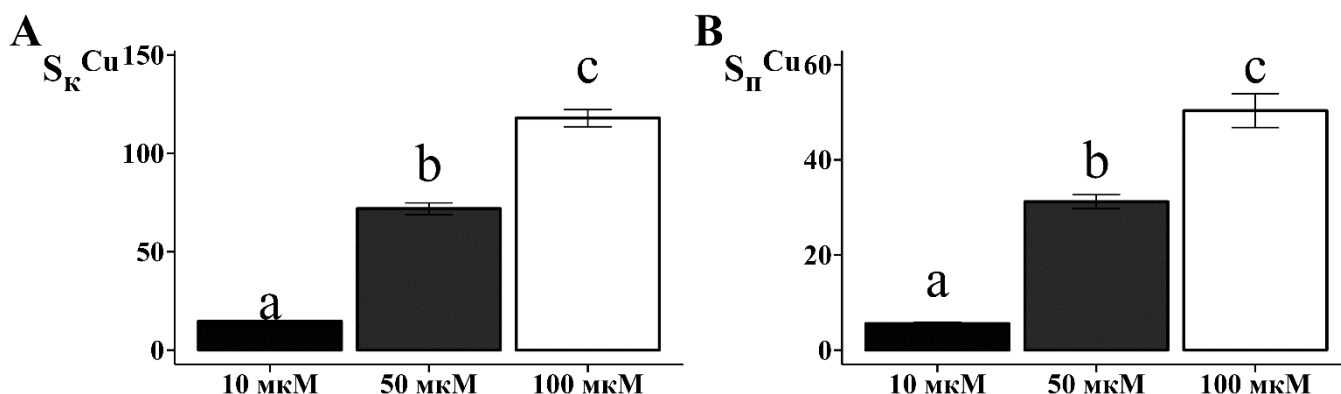


Рисунок 4. Адсорбционная способность КС, изолированных из корней (А) и побегов (В) контрольных растений ($S_{\text{к(п)}}^{\text{Cu}}$, мкмоль $\text{Cu}/\text{г}$ сухой массы органа) в отсутствие лигандов при разных концентрациях CuCl_2 в среде инкубации.

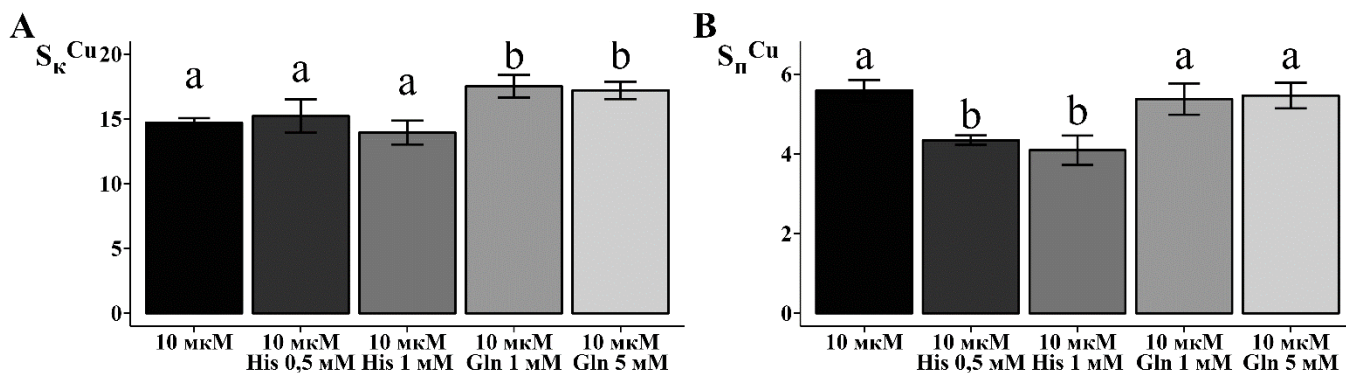


Рисунок 5. Влияние лигандов на адсорбцию ионов меди КС, изолированными из корней (А) и побегов (В) контрольных растений ($S_{k(n)}^{Cu}$, мкмоль Cu/г сухой массы органа). Начальная концентрация $CuCl_2$ в растворах обработки КС – 10 мкМ.

При начальной концентрации металла (10 мкМ) гистидин не оказывал влияния на связывание ионов меди КС, изолированными из контрольных корней (рисунок 5А), но для КС побегов этот показатель снижался на 27% по сравнению с вариантом без лиганда (рисунок 5В). Глутамин, напротив, незначительно усиливал адсорбцию ионов меди КС корней (~ 4%) по сравнению с вариантом без лиганда (рисунок 5А), но не оказывал влияния на КС побегов (рисунок 5В).

При обработке КС корней раствором 100 мкМ меди с добавлением как 1 мМ гистидина, так и глутамина в обеих концентрациях адсорбция Cu^{2+} снижается в среднем на 17,3% по сравнению с вариантом без лигандов (рисунок 6А). В случае обработки КС побегов 100 мкМ Cu добавление 1 мМ гистидина снижает Cu-связывающую способность на 23% по сравнению с вариантом без лиганда, а добавление глутамина не оказывает влияния на этот показатель (рисунок 6В).

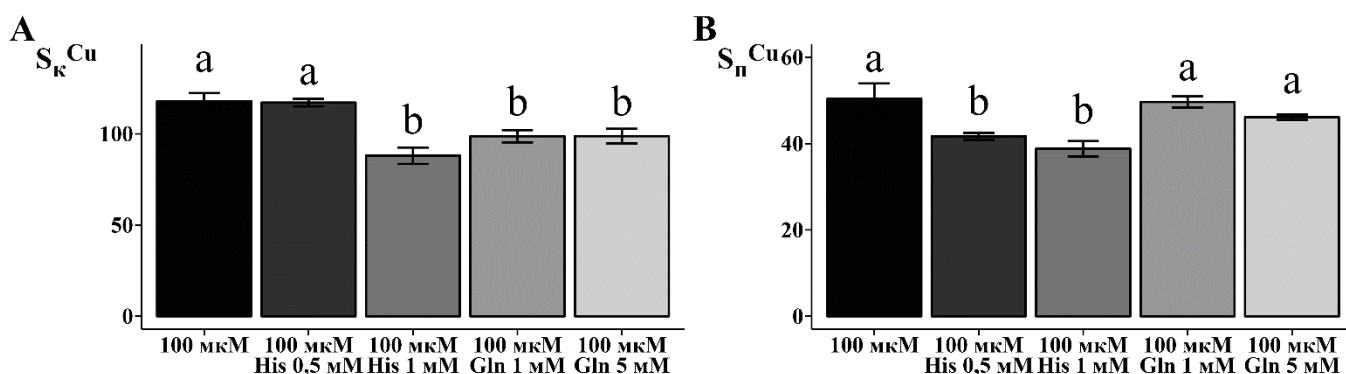


Рисунок 6. Влияние лигандов на адсорбцию ионов меди КС, изолированными из корней (А) и побегов (В) контрольных растений ($S_{k(n)}^{Cu}$, мкмоль Cu/г сухой массы органа). Начальная концентрация $CuCl_2$ в растворах обработки КС – 100 мкМ.

Известно, что при pH 5,6 гистидин связывает 98,9% Cu^{2+} в растворе (Liao et al., 2000). Константы устойчивости комплексов ТМ с органическими кислотами и аминокислотами в среднем выше, чем с карбоксильными группами полигалактуроновой кислоты (ПГК) (Field et al., 1974; Davarski et al., 1994; Callahan et al., 2006), которые являются основными сайтами связывания меди и других ТМ в КС (Krzesłowska, 2011; Meychik et al., 2021). Поэтому в связи с конкуренцией за связывание Cu^{2+} между ионообменными группами КС и лигандами, и в связи с уменьшением активности ионов меди в составе комплекса металл-лиганд, адсорбция металла должна снижаться в присутствии гистидина или глутамин. Что и наблюдается у КС побегов в вариантах с добавлением гистидина, а также у КС корней при максимальной обработке (100 мкМ Cu^{2+}) с добавлением гистидина и глутамин.

В отличие от гистидина, при низкой концентрации металла (10 мкМ CuCl_2) глутамин незначительно (4%) усиливает адсорбцию ионов меди КС контрольных корней, а при высокой (100 мкМ CuCl_2) – ограничивает этот процесс. Увеличение апопластного содержания ТМ в присутствии глутамин было показано и в работах других авторов (Dalir, Khoshgoftarmanesh, 2014). Таким образом добавление лигандов в раствор обработки КС приводят к изменению Cu -связывающей способности КС как корней, так и побегов, а величина изменений зависит от концентрации Cu , лиганда и его типа.

Сравнительный анализ медь-связывающей способности КС, изолированных из контрольных и опытных растений *V. sativa*. На основании наших предыдущих исследований, показавших высокую медь-связывающую способность КС бобовых (Мейчик и др., 2014, 2016), и сравнительного анализа содержания 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, так как они характеризуются высокой Cu -связывающей способностью, достигающей 300 мкмоль Cu^{2+} /г сухой массы КС. Такая способность обусловлена высоким содержанием карбоксильных групп ПГК в КС *V. sativa*, которое оставляет 500 мкмоль Cu^{2+} /г сухой массы КС.

Клеточные стенки корней растений, обработанных растворами Cu^{2+} с концентрацией 10 и 50 мкМ, характеризуются более высокой медь-связывающей

способностью в расчете на 1 г сухой массы корня по сравнению с КС «контрольных растений» (рисунок 7А). Однако эта разница становится статистически незначимой в

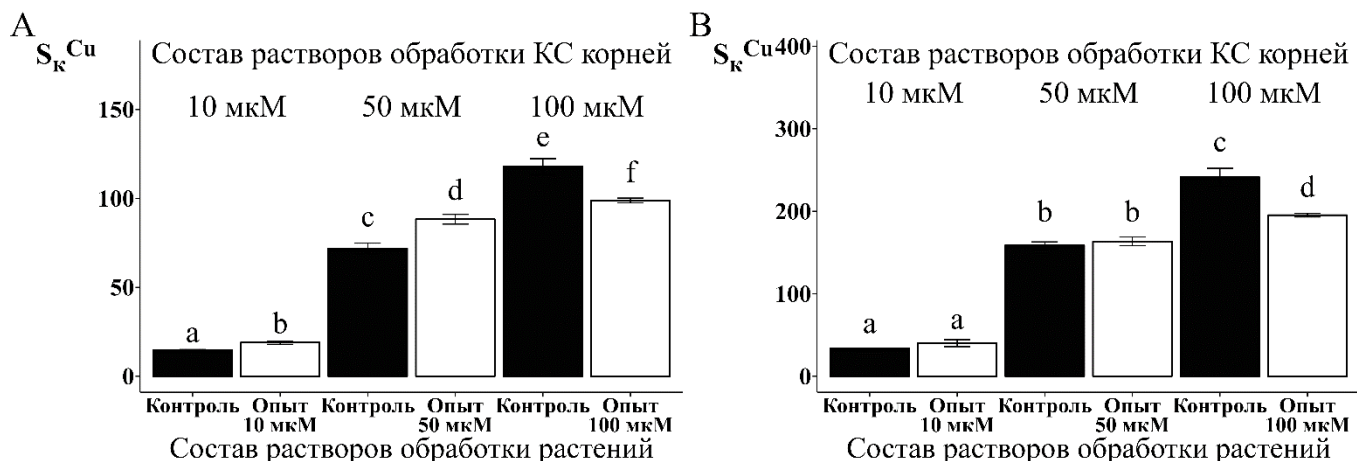


Рисунок 7. Си-связывающая способность (S_K^{Cu}) КС корней контрольных и опытных растений в расчете на 1 г сухой массы корней (А) и на 1 г сухой массы КС корней (В). «Контроль» – КС, изолированная из корней растений, выращенных на среде без $CuCl_2$. «Опыт» – КС, изолированная из корней растений, обработанных растворами 10, 50 или 100 мкМ $CuCl_2$ в отсутствие лигандов.

пересчете на 1 г сухой массы КС (рисунок 7В), при этом массовая доля КС в сухой массе корня у опытных растений выше по сравнению с контрольными (таблица 2). Обработка растений 100 мкМ меди вызывает снижение медь-связывающей способности КС корней, и этот эффект сохраняется при расчете экспериментальных данных на 1 г сухой массы КС (рисунок 7).

Полученные результаты позволяют предположить, что присутствие 10 или 50 мкМ меди в среде инкубации растений приводит к усилению биосинтеза КС корней без изменения доли свободных карбоксильных групп ПГК. Такой вывод следует из анализа экспериментальных данных об увеличении массовой доли КС в общей массе корня (таблица 2) и возрастании её Си-связывающей способности в расчете на 1 г сухой массы корня (рисунок 7А). Однако при 100 мкМ Си происходит снижение адсорбционной способности КС корней, вероятно, вследствие увеличения степени ее лигнификации и/или метилирования карбоксильных групп ПГК. Данное предположение подтверждается результатами потенциометрического титрования: при обработке растений 100 мкМ меди содержание свободных карбоксильных групп ПГК и гидроксикоричных кислот в КС корней снижается на 4%, тогда как содержание

фенольных ОН-групп (принадлежащих мономерам лигнина) возрастает на 38%. Следует отметить, что увеличение содержания лигнина в тканях корня при избытке Cu^{2+} в среде было показано и для других бобовых (Lin et al., 2005; Wang et al., 2011). Лигнификация КС повышает ее жесткость и возможно затрудняет диффузию катионов меди к карбоксильным группам ПГК. Стратегия снижения катионообменной способности КС корней в ответ на избыток меди в среде ранее была обнаружена у нескольких устойчивых к Cu видов (Konno et al., 2010; Colzi et al., 2012), а также у маша (Meuchik et al., 2016).

Обработка растений растворами с концентрацией Cu 10 мкМ и с добавлением 1 мМ гистидина или 5 мМ глутамина приводит к снижению Cu-связывающей способности КС корней (рисунок 8) и снижению содержания свободных карбоксильных групп ПГК в них, при этом массовая доля КС корней также снижается. Внесение лигандов в среду инкубации, содержащую 100 мкМ Cu^{2+} приводило к снижению Cu-связывающей способности КС корней и снижению массовой доли КС (рисунок 9).

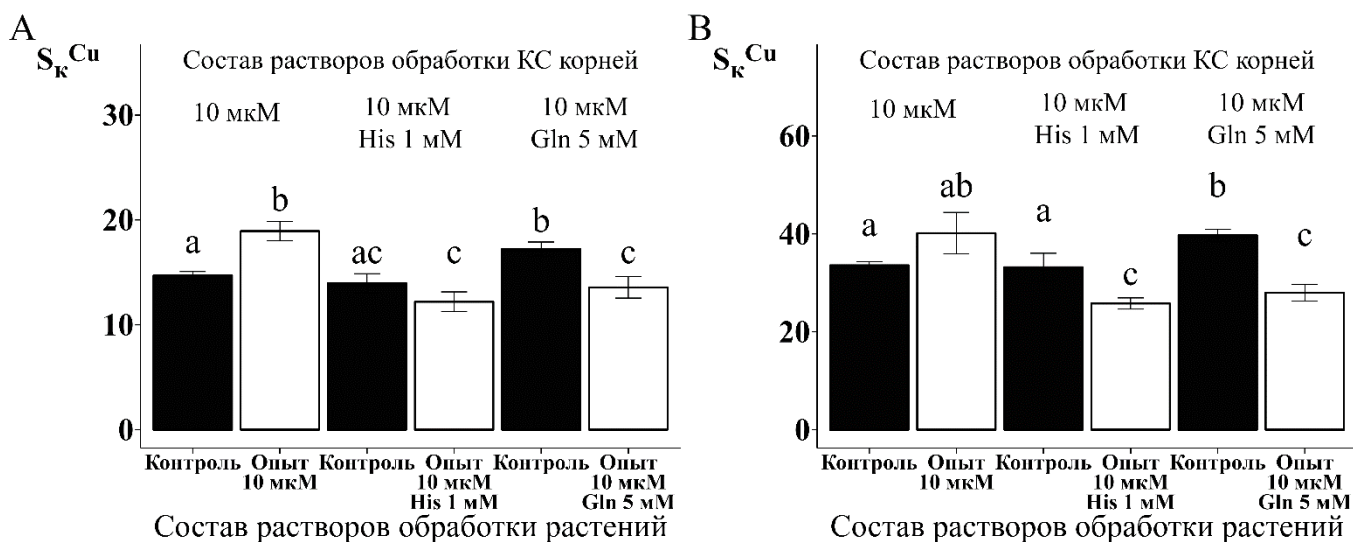


Рисунок 8. Влияние лигандов на Cu-связывающую способность (S_k^{Cu}) КС корней контрольных и опытных растений в расчете на 1 г сухой массы корней (А) и на 1 г сухой массы КС корней (В).

«Контроль» – КС, изолированная из корней растений, выращенных на среде без CuCl_2 . «Опыт» – КС, изолированная из корней растений, обработанных растворами 10 мкМ CuCl_2 , 10 мкМ CuCl_2 + 1 мМ His, или 10 мкМ CuCl_2 + 5 мМ Gln.

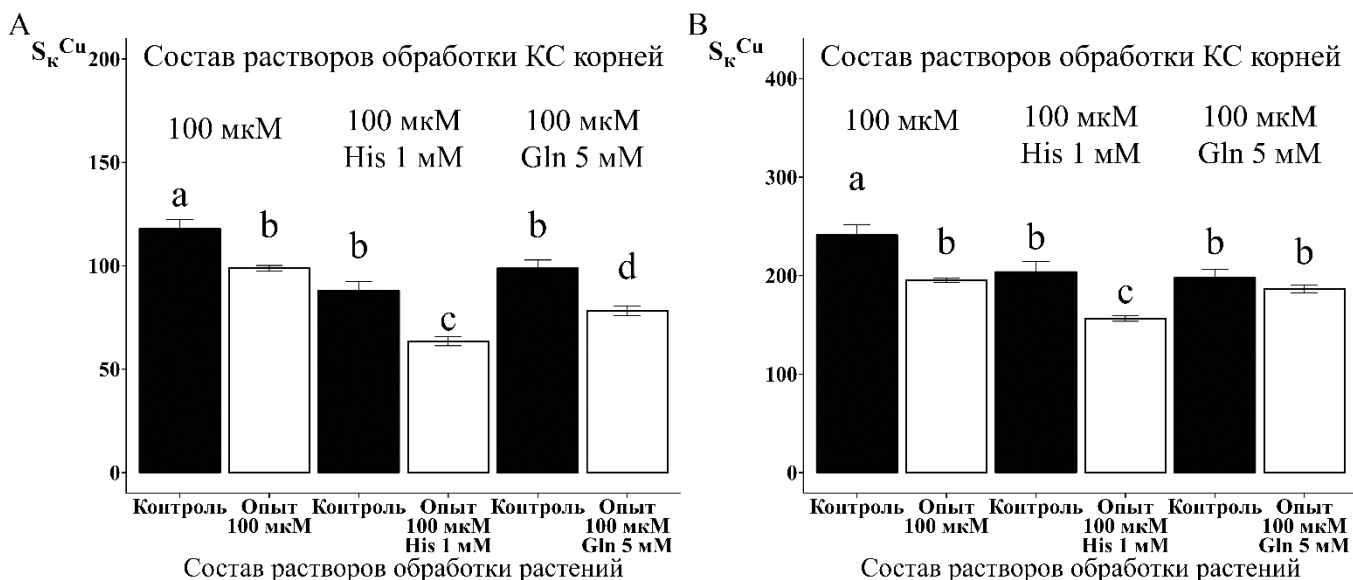


Рисунок 9. Влияние лигандов на S_k^{Cu} КС корней контрольных и опытных растений в расчете на 1 г сухой массы корней (А) и на 1 г сухой массы КС корней (В).

«Контроль» – КС, изолированная из корней растений, выращенных на среде без $CuCl_2$. «Опыт» – КС, изолированная из корней растений, обработанных растворами 100 мкМ $CuCl_2$, 100 мкМ $CuCl_2$ + 1 мМ His, или 100 мкМ $CuCl_2$ + 5 мМ Gln.

Таким образом, можно полагать, что внесение лигандов в среду снижает медь-связывающую способность КС корней, тем самым препятствуя поступлению металла в растение. Подобное явление ранее не было показано для гистидина и глутамина. В случае никеля для нескольких видов растений было обнаружено, что внесение His в среду не ингибирует, а стимулирует поглощение металла корнем и/или ускоряет его перемещение в побеги (Richau et al., 2009; Dalir, Khoshgoftarmanesh, 2015).

В отсутствии лигандов обработка растений растворами меди 10 и 100 мкМ приводит к снижению адсорбционной способности КС побегов в расчете на 1 г сухой массы надземных органов (рисунок 10А). Однако, в пересчете на 1 г сухой массы КС побегов медь-связывающая способность «опытных» КС не отличается от «контроля» (рисунок 10В). Внесение гистидина и глутамина в среду инкубации растений с начальной концентрацией ионов меди 10 мкМ приводит к снижению медь-связывающей способности КС побега на 37,6% и 35,3% по сравнению с «контролем», соответственно (рисунок 11).

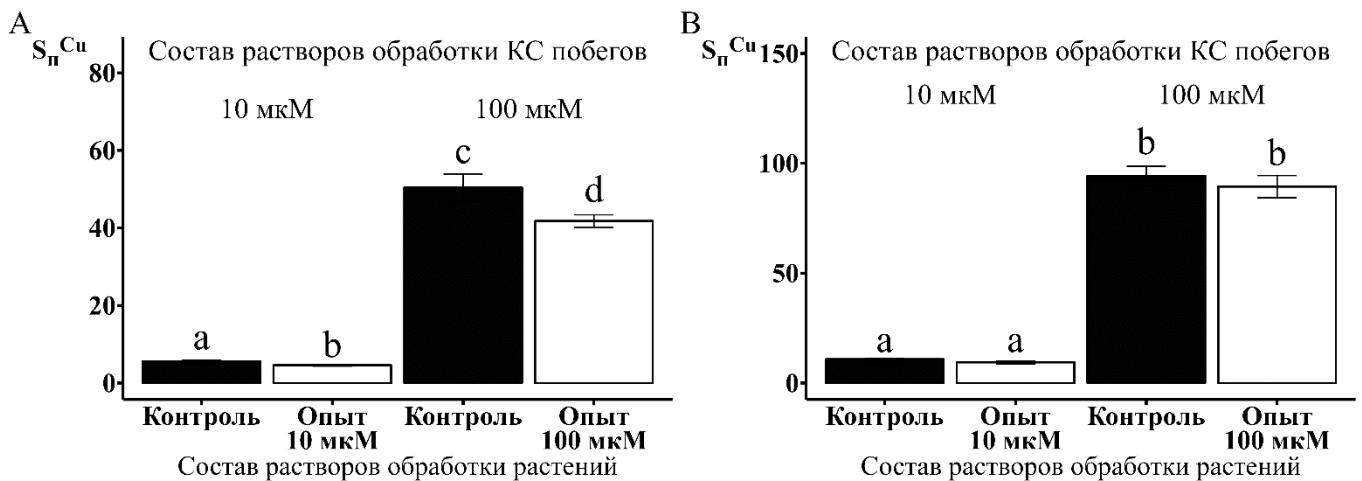


Рисунок 10. Си-связывающая способность (S_n^{Cu}) КС побегов контрольных и опытных растений в расчете на 1 г сухой массы побегов (А) и на 1 г сухой массы КС побегов (В). «Контроль» – КС, изолированная из побегов растений, выращенных на среде без $CuCl_2$. «Опыт» – КС, изолированная из побегов растений, обработанных растворами 10 или 100 мкМ $CuCl_2$ в отсутствие лигандов.

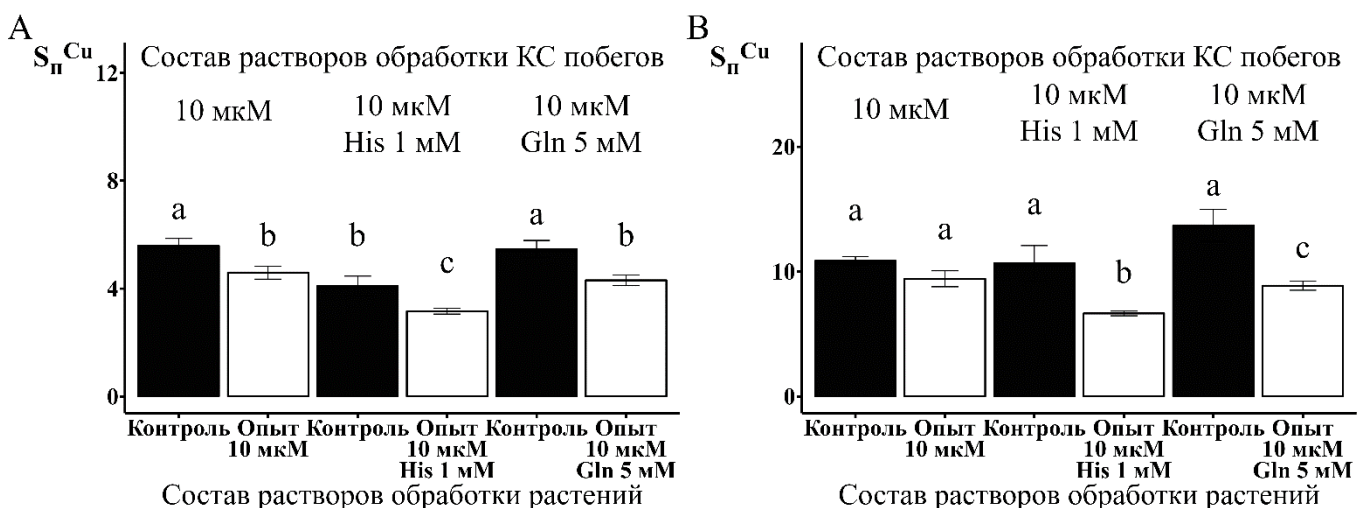


Рисунок 11. Влияние лигандов на Си-связывающую способность (S_n^{Cu}) КС побегов контрольных и опытных растений в расчете на 1 г сухой массы побегов (А) и на 1 г сухой массы КС побегов (В). «Контроль» – КС, изолированная из побегов растений, выращенных на среде без $CuCl_2$. «Опыт» – КС, изолированная из побегов растений, обработанных растворами 10 мкМ $CuCl_2$, 10 мкМ $CuCl_2$ + 1 мМ His, или 10 мкМ $CuCl_2$ + 5 мМ Gln.

Однако, в отличие от КС корней, обработка растений растворами, содержащими 100 мкМ Cu^{2+} с добавлением 1 мМ гистидина или 5 мМ глутамина не приводила к снижению медь-связывающей способности КС побегов по сравнению с «контролем» (рисунок 12). Массовая доля КС в побегах снижается при внесении лигандов в среду

инкубации, содержащую как 10, так и 100 мкМ Cu^{2+} . Таким образом, в побегах модификация состава КС происходит только в случае внесения лигандов в среду выращивания, содержащую 10 мкМ Cu^{2+} .

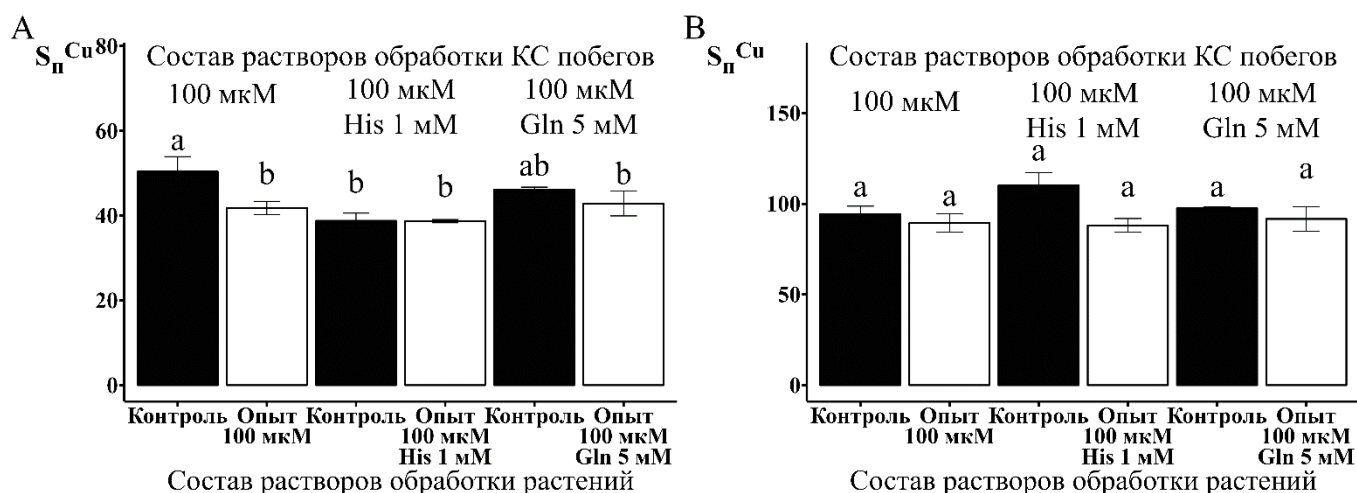


Рисунок 12. Влияние лигандов на Cu -связывающую способность (S_n^{Cu}) КС побегов контрольных и опытных растений в расчете на 1 г сухой массы побегов (А) и на 1 г сухой массы КС побегов (В).

«Контроль» – КС, изолированная из побегов растений, выращенных на среде без CuCl_2 . «Опыт» – КС, изолированная из побегов растений, обработанных растворами 100 мкМ CuCl_2 , 100 мкМ CuCl_2 + 1 мМ His, или 100 мкМ CuCl_2 + 5 мМ Gln.

Сравнительный анализ потенциальной адсорбционной способности КС корней с эндогенным содержанием ионов меди в корнях растений *V. sativa*.

Результаты показывают, что медь-связывающая способность КС корней во много раз превосходит эндогенное содержание металла в корнях растений при всех концентрациях ионов меди в среде. Например, при начальной концентрации Cu^{2+} 100 мкМ, потенциальная адсорбционная способность КС корней в 2,25 раз выше содержания металла в корнях растений, обработанных таким же по составу раствором (рисунок 13А).

Внесение лигандов в среду инкубации, содержащую CuCl_2 , снижает накопление Cu^{2+} как в корнях, так и в КС корней. В присутствии гистидина и глутамина в среде инкубации разница между способностью КС адсорбировать Cu^{2+} и содержанием Cu^{2+} в корнях увеличивается по сравнению с вариантом без них (рисунок 13А). Так, в варианте обработки раствором, содержащим 10 мкМ Cu^{2+} и 5 мМ глутамин, потенциальная способность КС корней связывать Cu^{2+} в 10 раз превосходит

содержание меди в корнях растений (рисунок 13В). При максимальной обработке (100 мкМ CuCl_2) с добавлением лигандов тенденция сохраняется.

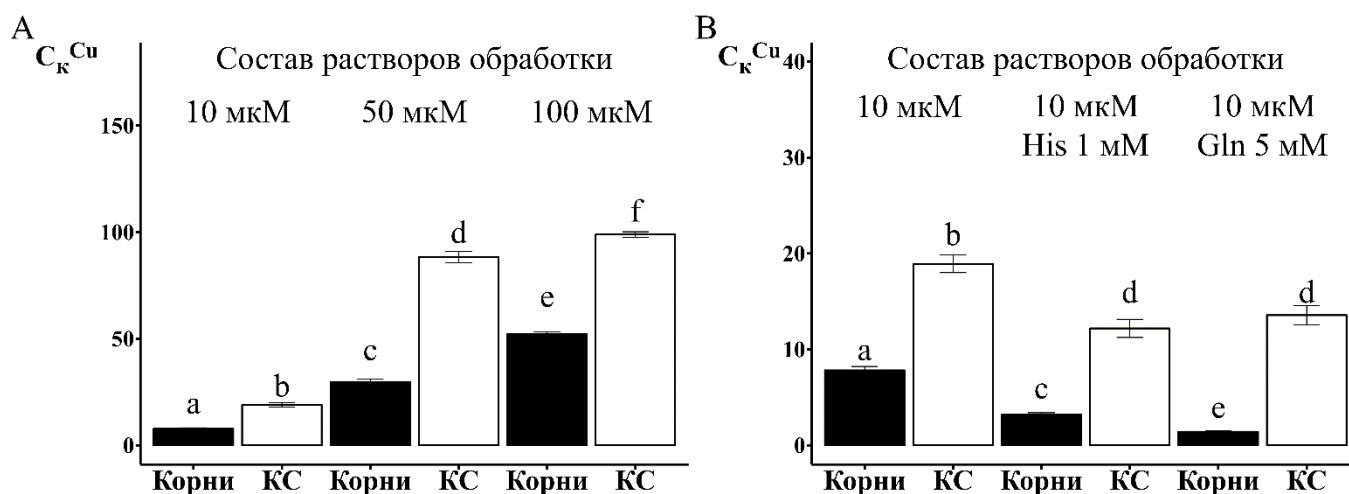


Рисунок 13. Содержание меди (C_k^{Cu} , мкмоль Cu на 1 г сухой массы корня) в корнях опытных растений и в КС корней при обработке растворами CuCl_2 без лигандов (А) и 10 мкМ CuCl_2 и с добавлением His или Gln (В).

«КС» – клеточная стенка, изолированная из корней контрольных растений, т.е. необработанных медьсодержащим раствором. «Корни» – корни опытных растений, обработанных раствором 10, 50 или 100 мкМ CuCl_2 (А), 10 мкМ CuCl_2 с добавлением His или Gln (В).

Таким образом, высокая медь-связывающая способность КС корней вики позволяет предположить, что в корнях ионы меди локализованы преимущественно в апопласте. В тоже время, 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. Причин данного явления может быть несколько: а) часть сайтов связывания металлов в клеточной стенке в интактном корне может быть занята ионами Ca, Mg, Fe и т.д. (Marschner, 1995), которые присутствуют в среде, но отсутствуют в препаратах изолированной КС; б) используемый нами метод выделения КС приводит к получению препарата, в котором не нарушена архитектура корня (Meuschik, Yermakov, 2001), но значительно облегчена диффузия к ионообменным группам полимеров по сравнению с апопластом в интактном корне; в) корни растений в присутствии повышенных концентраций металла выделяют в среду органические хелаторы (например, аминокислоты или производные мугеновой кислоты), образующие

прочные комплексы с ионами меди (Qin et al., 2007), что может препятствовать связыванию металла с КС в интактном корне. Для проверки последнего предположения нами было проведено исследование состава экссудатов корней вики.

Масс-спектрометрический анализ корневого экссудата после инкубации растений в растворах с разной концентрацией ионов меди выявил выделение корнями растений четырех типов тритерпеновых гликозидов. Преобладающим во всех вариантах обработки являлся Soyasaponin I (Soyasaponin Bb). При 100 мкМ Cu^{2+} в среде инкубации доля Soyasaponin I в общем составе тритерпеновых гликозидов в экссудатах корней вики достигала 88%. По мере повышения концентрации ионов меди в среде инкубации растений, содержание обнаруженных соединений также увеличивается (рисунок 14).

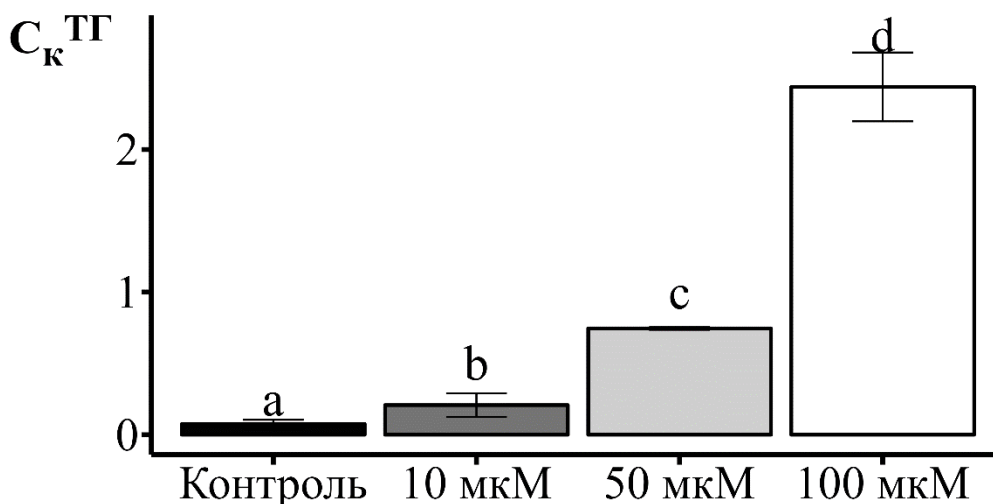


Рисунок 14. Влияние концентрации CuCl_2 в среде инкубации растений на содержание тритерпеновых гликозидов ($C_{\text{к}}^{\text{ТГ}}$ – мкмоль тритерпеновых гликозидов на 1 г сухой массы корней) в экссудатах корней.

Несмотря на то, что при 100 мкМ ионов меди в среде корнями вики выделяется наибольшее количество сапонинов, оно более чем на порядок меньше количества ионов меди, оставшихся в растворе после поглощения растениями. Тем не менее, нельзя исключать, что выделение сапонинов может являться одним из факторов, приводящих к тому, что Cu -связывающая способность КС не реализуется в корнях, вследствие более высокой Cu -связывающей способности сапонинов по сравнению с карбоксильными группами ПГК. Кроме того, тот факт, что концентрация выделяемых

сапонинов прямо пропорциональна концентрации меди в среде (коэффициент корреляции 0,97) позволяет полагать, что процесс выделения этих соединений направлен на снижение токсического действия ионов меди на растения вики. Ранее было показано, что сапонины, выделенные из других видов растений (*Camellia sinensis*, *Sapindus saponaria*), способны хелатировать ионы Cd, Zn, Cu и Ni (Hong et al., 2002; Chen et al., 2008). Секретию сапонинов корнями в ответ на избыток ТМ в среде мы обнаружили впервые. Однако для бобовых растений ранее было показано выделение фенольных вторичных метаболитов в ответ на воздействие ионов меди в токсичных концентрациях (Gagnon, Ibrahim, 1997; Jung et al., 2003). Следует также отметить, что в составе экссудатов корней вики 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 меди растениями вики. Дальнейшего изучения требует вопрос, является ли выделение тритерпеновых гликозидов в ответ на избыток Cu^{2+} в среде симптомом стресса или же одним из механизмов защиты растений вики от действия данного ТМ.

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 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 клеток 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 Cu^{2+} в корне. Эти экспериментальные данные позволяют заключить, что в этих условиях происходит усиление биосинтеза всех 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 другого бобового растения – 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 Cu^{2+} (100 мкМ) в отсутствие 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 присутствуют 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 Cu^{2+} , вероятно, можно рассматривать как механизм защиты растений вики от действия Cu^{2+} .

ВЫВОДЫ

1. У растений вики посевной основным местом накопления ионов меди является корневая система. При этом действие гистидина и глутаминна 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 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 метилирования карбоксильных групп ПГК и лигнификации КС корня.
4. Присутствие гистидина и глутаминна в среде выращивания приводит к снижению медь-связывающей способности КС корней и побегов, тем самым дополнительно ограничивая поступление 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 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 brassinosteroidов 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. Meichik 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.** 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.