

УДК 57.023

## ВЛИЯНИЕ ПОЛИМЕТАЛЛИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА ИОНООБМЕННЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОЧНЫХ СТенок КОРНЕЙ И ПОБЕГОВ ЯЧМЕНЯ

© 2021 г. Н. Р. Мейчик<sup>1,\*</sup>, Ю. И. Николаева<sup>1</sup>, О. В. Никушин<sup>1</sup>, М. А. Кушунина<sup>1</sup>

Представлено академиком РАН М.П. Кирпичниковым

Поступило 20.06.2021 г.

После доработки 30.06.2021 г.

Принято к публикации 30.06.2021 г.

Впервые определены ионообменные свойства клеточных стенок (КС), изолированных из корней и побегов ячменя, выращенного в условиях полиметаллического загрязнения. Установлено, что в побегах содержание в КС всех типов катионообменных групп значительно выше, чем в корнях, что обуславливает более высокую металл-связывающую способность КС побегов и степень гидратации ее полимеров. Впервые показано, что воздействие избытка тяжелых металлов на растения приводит к возрастанию содержания деметилованных пектинов в КС побегов.

*Ключевые слова:* клеточная стенка, ионообменные свойства, тяжелые металлы, ячмень

**DOI:** 10.31857/S2686738921060123

Клеточная стенка (КС) – это сложноорганизованная и многофункциональная структура, первая вступающая в контакт с внешним раствором и модифицирующая его состав за счет реакций обмена между ионогенными группами полимеров КС и ионами раствора. Структурные и ионообменные характеристики КС определяют ионный состав среды, которая омывает клеточную мембрану, контролируют перенос растворенных веществ в клетку и влияют на механические и осмотические явления, связанные с ростом клеток [1]. КС является не только сложной, но и динамичной структурой, состав и организация которой могут изменяться в процессе онтогенеза и под действием внешних факторов [2, 3]. Кроме того, реакции ионного обмена в КС клеток корня регулируют поступление веществ в корни растений [4–6], а при повышенной концентрации тяжелых металлов (ТМ) в почвенном растворе КС выступает как первый защитный барьер на пути их поступления в цитоплазму клеток корня, эффективность которого обусловлена ионообменной способностью КС в отношении катионов металлов [5].

Ионообменные свойства КС в отношении двух- и трехвалентных катионов металлов глав-

ным образом определяются содержанием деметилированных карбоксильных групп галактуроновой кислоты [4, 7] в составе пектиновых веществ. В то же время и другие компоненты КС (белки, аминокислоты и фенольные соединения) также принимают участие в связывании и накоплении ТМ в апопласте [6, 7]. Однако в литературе имеются лишь ограниченные данные об изменении количества ионогенных групп полимеров КС в условиях избытка ТМ в среде, а влияние совместного присутствия нескольких токсичных металлов на ионообменные свойства КС у злаковых растений никогда ранее не изучалось.

В настоящей работе мы впервые определили ионообменные свойства КС корней и побегов ячменя (*Hordeum vulgare* L., сорт «Биом») в условиях полиметаллического загрязнения.

Растения выращивали в водной культуре (по 60 растений на сосуд объемом 3 л) в климатической камере (24°C, освещенность 100 мкмоль квантов м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>, 16 ч день) при постоянной аэрации растворов. Контрольные растения выращивали на питательном растворе, содержащем (мкМ): K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 147.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 5, MgSO<sub>4</sub> – 95, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> – 120, CaCl<sub>2</sub> – 620, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> – 275, MnSO<sub>4</sub> – 0.5, ZnSO<sub>4</sub> – 0.5, CuSO<sub>4</sub> – 0.2, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> – 0.01, NaCl – 10, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 1, FeSO<sub>4</sub> – 6, и 2.22 г/л ЭДТА. В опытные сосуды через 7 сут после высадки растений дополнительно вносили растворы ТМ до конечной концентрации: а) опытный вариант с суммарной концентрацией ТМ 65.5 мкМ:

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра физиологии растений, Москва, Россия

\*e-mail: meychik@mail.ru

**Таблица 1.** Сухая масса корня ( $G_{\text{корня}}$ , мг) и надземной части ( $G_{\text{надз}}$ , мг) одного растения, их оводненность ( $Q_{\text{корни}}$ ,  $Q_{\text{надз}}$ , г  $\text{H}_2\text{O}$ /г сухой массы органа), доля КС от общей сухой массы корней и надземной части ( $G_{\text{корни}}^{\text{КС}}$ ,  $G_{\text{надз}}^{\text{КС}}$ ) растений ячменя, выращенных на контрольной среде и средах с добавлением 65.5 мкМ и 131 мкМ ТМ. Приведены средние значения и их стандартные ошибки

Вариант	$G_{\text{корня}}$	$G_{\text{надз}}$	$Q_{\text{корни}}$	$Q_{\text{надз}}$	$G_{\text{корни}}^{\text{КС}}$	$G_{\text{надз}}^{\text{КС}}$
контроль	$11.33 \pm 0.53$	$41.91 \pm 3.82$	$15.47 \pm 0.48$	$10.70 \pm 0.05$	$0.53 \pm 0.02$	$0.41 \pm 0.01$
65.5 мкМ ТМ	$12.33 \pm 0.75$	$43.63 \pm 1.45$	$12.06 \pm 1.25$	$9.28 \pm 0.25$	$0.51 \pm 0.03$	$0.41 \pm 0.01$
131 мкМ ТМ	$11.70 \pm 0.49$	$38.08 \pm 0.74$	$11.78 \pm 0.51$	$9.74 \pm 0.28$	$0.51 \pm 0.01$	$0.41 \pm 0.00$

$\text{Al}^{3+} - 10$ ;  $\text{Mn}^{2+} - 25$ ;  $\text{Cd}^{2+} - 1.4$ ;  $\text{Cu}^{2+} - 1$ ;  $\text{Ni}^{2+} - 8$ ;  $\text{Zn}^{2+} - 20$ ;  $\text{Pb}^{2+} - 0.15$  мкМ; б) опытный вариант с суммарной концентрацией ТМ 131 мкМ:  $\text{Al}^{3+} - 20$ ;  $\text{Mn}^{2+} - 50$ ;  $\text{Cd}^{2+} - 2.8$ ;  $\text{Cu}^{2+} - 2$ ;  $\text{Ni}^{2+} - 16$ ;  $\text{Zn}^{2+} - 40$ ;  $\text{Pb}^{2+} - 0.3$  мкМ. В питательный раствор и для опытных, и для контрольных растений ежедневно вносили раствор  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  из расчета 1 мкмоль на литр среды. Растения выращивали в присутствии ТМ в течение 7 сут, после чего у части растений определяли сырую и сухую массу органов, их оводненность, а оставшиеся использовали для выделения КС (из корней и надземной части) в соответствии с ранее описанной методикой [6]. Исследование ионообменных групп в составе КС проводили методом потенциометрического титрования, как описано ранее [6], при постоянной ионной силе раствора (10 мМ), которую создавали добавлением  $\text{NaCl}$ . Весовой коэффициент набухания КС ( $K^{\text{КС}}$ , г  $\text{H}_2\text{O}$ /г сухой массы КС) в растворах с рН 4–12 и ионной силой 10 мМ определяли в соответствии с методикой, описанной в [6]. Опыты проводили в 3–6 биологических повторностях для каждой концентрации полиметаллов. Приведены средние значения и их стандартные отклонения или ошибки. Различия считали достоверными при  $p < 0.05$  или  $p < 0.01$ .

Сухая масса корней и надземной части, а также их оводненность и массовая доля КС в корнях и побегах растений ячменя достоверно не различались по отношению к контролю ни при 65.5 мкМ, ни при 131 мкМ ТМ в среде ( $p < 0.01$ , табл. 1), причем различий не наблюдалось и между вариантами обработки с разной концентрацией ТМ ( $p < 0.01$ , табл. 1). Эти данные свидетельствуют о том, что воздействие полиметаллических загрязнений в указанных концентрациях не приводит к ингибированию роста растений и не нарушает их водный обмен.

Водный режим в КС регулируется через набухание ее полимерного матрикса, которое изменяется под влиянием состава внешней среды. Способность к набуханию — это свойство полимерного материала, определяемое его строением и составом. Результаты показывают, что коэффициент набухания КС ( $K^{\text{КС}}$ ), изолированных из

корней и надземных частей растений ячменя, увеличивается с рН раствора. С увеличением рН от 4 до 9 этот параметр возрастал от 2.5 до 4.0 и от 2.5 до 5.5 г  $\text{H}_2\text{O}$ /г сухой массы КС в корнях и в побегах соответственно. Существенные отличия в набухании были обнаружены между КС корней и побегов: у последних значение этого показателя было в 1.4–1.5 раза выше вне зависимости от среды выращивания.

Во всех вариантах при рН  $> 10.8$  катионообменная способность КС достигала максимальных значений ( $S_o^{\text{кат}}$ , табл. 2), которые характеризуют общее количество катионообменных групп, имеющих в полимерной структуре КС. Следует отметить, что в КС как побегов, так и корней были обнаружены и анионообменные группы, но их содержание не превышало 20 мкмоль/г сухой массы КС, что соответствует известным данным [4, 6].

Так же, как и в КС других видов растений [6], в КС, изолированных из корней, и из побегов ячменя, обнаружено три типа катионообменных групп (табл. 2): карбоксильные группы полигалактуроновой (ПГК) и гидроксикоричных (ГКК) кислот, и фенольные ОН-группы. Последние не принимают участия в ионообменных реакциях, так как значение  $pK_a$  этих групп ( $9.66 \pm 0.17$  ед. рН) лежит за пределами физиологической области рН.

Полученные в работе значения  $pK_a$  ионообменных групп в составе КС ( $pK_a^{\text{ПГК}} = 4.35 \pm 0.61$ ;  $pK_a^{\text{ГКК}} = 7.27 \pm 0.15$ ;  $pK_a^{\text{ФГ}} = 9.66 \pm 0.17$ ) свидетельствуют о том, что их качественный состав одинаков в КС корней и надземной части, тогда как количество групп каждого типа ( $S_i$ , табл. 2) значительно различается между органами растений. Так, в побегах содержание карбоксильных групп ПГК в КС больше, чем в корнях в 3 раза (контрольные растения) и 4 раза (обработанные ТМ растения), карбоксильных групп ГКК — в 1.6 раза (независимо от среды выращивания), фенольных ОН-групп — примерно в 2 раза. Данный факт объясняет различие в величине коэффициента набухания для КС побегов и корней: более высокое содержание всех типов катионообменных групп в

**Таблица 2.** Содержание катионообменных групп каждого типа ( $S_i$ , мкмоль/г сухой массы КС), общее содержание катионообменных групп ( $S_o^{кат}$ , мкмоль/г сухой массы КС) в клеточных стенках, изолированных из корней и побегов растений ячменя, выращенных на контрольной среде и средах с добавлением 65.5 мкМ и 131 мкМ ТМ. ПГК – карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты; ГКК – карбоксильные группы гидроксикоричных кислот; ФГ – фенольные ОН-группы. Приведены средние значения и их стандартные отклонения

Вариант		$S_{ПГК}$	$S_{ГКК}$	$S_{ФГ}$	$S_o^{кат}$
контроль	КС корней	40 ± 1	330 ± 30	310 ± 21	678 ± 44
	КС побегов	120 ± 12	540 ± 20	530 ± 20	1230 ± 80
65.5 мкМ ТМ	КС корней	38 ± 2	420 ± 25	340 ± 15	798 ± 32
	КС побегов	160 ± 15	540 ± 20	700 ± 30	1400 ± 70
131 мкМ ТМ	КС корней	39 ± 3	450 ± 32	350 ± 20	838 ± 55
	КС побегов	165 ± 20	700 ± 52	650 ± 25	1515 ± 100

побегах приводит к увеличению содержания электроотрицательного элемента кислорода, что, в свою очередь, увеличивает степень гидратации полимеров КС.

С точки зрения ионообменной способности КС корней слабо отвечают на присутствие в питательной среде полиметаллических загрязнений. Другая ситуация в этих условиях наблюдается для КС, изолированных из надземной части. В ответ на воздействие ТМ происходит увеличение количества как обоих типов карбоксильных групп, так и фенольных ОН-групп в 1.3–1.4 раза по отношению к контролю (табл. 2).

Известно, что у бобовых растений содержание карбоксильных групп ПГК в КС стеблей вдвое выше, чем в КС корней [8]. У исследованных же нами растений ячменя различия достигают четырех раз. Чтобы подтвердить эти данные, был применен еще один метод, основанный на том, что при  $pH < 4$  в ионообменных реакциях с  $Cu^{2+}$  участвуют только карбоксильные группы ПГК [9]. После 72 ч инкубации в 131 мкМ растворе  $CuCl_2$  ( $pH 4.0 \pm 0.2$ ) в КС, изолированных из корней ячменя, содержалось  $22.03 \pm 2.84$  мкмоль  $Cu$ /г сухой массы КС, а в КС надземной части –  $33.77 \pm 0.84$  мкмоль  $Cu$ /г сухой массы КС, вне зависимости от среды, на которой были выращены растения. Поскольку КС, выделенные из корней, связали меньше  $Cu^{2+}$ , можно заключить, что содержание деметилированных пектинов в них значительно ниже по сравнению с КС побегов.

Известно, что в ответ на металл-стресс растения могут реализовывать три стратегии изменения состава КС клеток корня и ее ионообменной способности. Первая из них, обнаруженная большей частью у чувствительных к воздействию ТМ сортов и видов растений, заключается в увеличении массовой доли деметилированных пектинов в КС корней при воздействии таких металлов, как  $Pb$ ,  $Cd$  и  $Cu$  [10, 11]. Вторая, напротив, состоит в уменьшении массовой доли деметилированных пектинов в КС в ответ на избыток ТМ в среде [10,

12]. В данном случае формирование “металл-исключающих” КС препятствует накоплению ТМ в апопласте и, вероятно, также ограничивает симпластное поглощение металла клетками корня [10]. Третья стратегия изменения состава КС обусловлена усилением в равной мере биосинтеза всех компонентов КС, в том числе и пектинов с такой же степенью метилирования, как у контрольных растений. Такой ответ на воздействие повышенных концентраций ионов меди был выявлен у бобовых [13].

В настоящее время считается, что основную роль в связывании ТМ играют карбоксильные группы остатков уроновых кислот в составе пектинов [7]. Полученные нами данные о содержании таких групп в КС корней ячменя (табл. 2) свидетельствуют о том, что металл-связывающая способность КС корней, как и ее массовая доля (табл. 1), не изменяются при обработке полиметаллами, и, следовательно, можно заключить, что модификации состава КС в корнях ячменя не происходит при воздействии ТМ на растения ни в “высокой” (131 мкМ), ни в “низкой” (65.5 мкМ) концентрациях.

Напротив, полученные данные о содержании карбоксильных групп ПГК в КС, выделенных из надземной части растений ячменя, позволяют предположить, что в ответ на воздействие ТМ происходит модификация пектиновых полимеров путем их деметилирования, так содержание карбоксильных групп ПГК возрастает в 1.4 раза (табл. 2), а массовая доля КС в побегах не изменяется по отношению к контролю (табл. 1).

Увеличение содержания фенольных ОН-групп в КС и корней, и побегов ячменя в ответ на действие ТМ может быть обусловлено лигнизацией вторичной КС, так как такой ответ был обнаружен при воздействии других неблагоприятных факторов внешней среды, таких как засуха, пониженные температуры, засоление [14] и дефицит азота в среде [15].

Таким образом, нами впервые показано, что при воздействии ТМ на растения может происходить не только модификация КС корней, как было известно ранее, но и модификация КС побегов, которая заключается в деметилировании пектинов с целью увеличения ионообменной способности КС. Можно предположить, что такой ответ связан с механизмами поступления ТМ в растения ячменя. Вероятно, вследствие небольшого содержания карбоксильных групп ПГК в КС корней, ионы металлов поступают в надземную часть, где накапливаются и инактивируются, в том числе, и в КС.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы утверждают об отсутствии конфликтов интересов.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (проект № 20-54-00013) и в соответствии с НИР кафедры физиологии растений МГУ (№ 121032300068-8).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grignon C., Sentenac H. // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1991. V. 42. P. 103–128.
2. Carpita N.C., Gibeaut D.M. // *Plant J.* 1993. V. 3. P. 1–30.
3. Fry S.C. // *New Phytol.* 2004. V. 161. № 3. P. 641–675.
4. Sattelmacher B. // *New Phytol.* 2001. V. 149. P. 167–192.
5. Haynes R.J. // *Bot. Rev.* 1980. V. 46. P. 75–99.
6. Meychik N.R., Yermakov I.P. // *Plant Soil.* 2001. V. 234. № 2. P. 181–193.
7. Krzesłowska M. // *Acta Physiol. Plant.* 2011. V. 33. P. 35–51.
8. Meychik N.R., Yermakov I.P., Nikolaeva Yu I., et al. // *Russ. J. Plant Physiol.* 2010. V. 57. № 5. P. 620–630.
9. Meychik N., Nikolaeva Y., Kushunina M., et al. // *Plant Soil.* 2014. V. 381. № 1–2. P. 25–34.
10. Colzi I., Doumett S., Del Bubba N., et al. // *Env. Exp. Bot.* 2011. V. 72. P. 77–83.
11. Douchiche O., Rihouey C., Schaumann A., et al. // *Planta.* 2007. V. 225. P. 1301–1312.
12. Konno H., Nakashima S., Katoh K. // *J. Plant Physiol.* 2010. V. 167. P. 358–364.
13. Meychik N., Nikolaeva Y., Kushunina M., et al. // *Funct. Plant Biol.* 2016. V. 43. № 5. P. 403–412.
14. Le Gall H., Philippe F., Domon J.M., et al. // *Plants.* 2015. V. 4. P. 112–166.
15. Meychik N.R., Nikolaeva Yu.I., Kushunina M.A. // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. V. 72. P. 74–78.

## THE EFFECT OF POLYMETALLIC POLLUTION ON ION-EXCHANGE PROPERTIES OF BARLEY ROOT AND SHOOT CELL WALLS

N. R. Meychik<sup>a,#</sup>, Yu. I. Nikolaeva<sup>a</sup>, O. V. Nikushin<sup>a</sup>, and M. A. Kushunina<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Department of Plant Physiology, Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: meychik@mail.ru*

Presented by academician of the RAS M.P. Kirpichnikov

For the first time we determined the ion-exchange properties of the cell walls (CWs) isolated from roots and shoots of barley plants grown in the conditions of polymetallic pollution. The content of all the types of cation-exchange groups in the CWs was found to be considerably higher in the shoots than in the roots, which resulted in higher metal-binding capacity of the shoot CWs and higher swelling capacity of CW polymers. It was shown for the first time that the heavy metal excess causes an increase in the content of demethylated pectins in the shoot CWs.

*Keywords:* cell wall, ion-exchange properties, heavy metals, barley