

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ БРАССИНОСТЕРОИДОВ НА ИОНООБМЕННЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОЧНЫХ СТенок КОРНЕЙ И ПОБЕГОВ ЯЧМЕНЯ НА ФОНЕ ДЕЙСТВИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

© 2023 г. Н. Р. Мейчик^{а, *}, Ю. И. Николаева^а, М. В. Ефимова^б,
Е. Д. Данилова^б, О. В. Никушин^а, М. А. Кушунина^а

^а Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия

^б Томский государственный университет, Биологический институт, Томск, Россия

*e-mail: meychik@mail.ru

Поступила в редакцию 25.07.2022 г.

После доработки 16.08.2022 г.

Принята к публикации 16.08.2022 г.

Изучено влияние полиметаллического загрязнения и сопутствующей обработки brassinosterоидами (гомокастастероном или гомобрассинолидом) на растения ячменя и на ионообменную способность клеточных стенок, выделенных из побегов и корней. При воздействии полиметаллов наблюдалось снижение сухой массы корней, оводненности и доли клеточной стенки в них, но добавление в среду гомокастастерона приводило к восстановлению значений этих параметров почти до контрольного уровня. В надземной части растений влияние как полиметаллов, так и brassinosterоидов на данные показатели было слабо выражено. В присутствии гомокастастерона возрастало содержание деметилированных карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты в составе пектинов клеточных стенок корней и листьев, являющихся основными сайтами связывания ионов тяжелых металлов в апопласте. Таким образом, можно полагать, что обработка brassinosterоидами (гомокастастероном) приводит к изменению состава и ионообменных свойств клеточной стенки, что позволяет снизить токсическое действие полиметаллов за счет их иммобилизации в апопласте.

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

DOI: 10.31857/S0015330322600474, EDN: AMMZYE

ВВЕДЕНИЕ

Брассиностероиды (БР) играют важную роль в росте и развитии растений, регулируя деление и растяжение клеток, фотоморфогенез, дифференциацию ксилемы, развитие корневых волосков, развитие устьиц, половое размножение, ответы на абиотические и биотические стрессоры [1]. Действие БР ткане- и дозоспецифично, при этом низкие концентрации активируют рост, а высокие – тормозят. Описано более 69 различных структурных форм БР, но наибольшей физиологической активностью обладает брассинолид [1]. В данной работе исследуются два естественных физиологически активных БР: гомокастастерон (кетон-содержащий БР, биосинтетический предшественник брассинолида) и гомобрассинолид (лактон-содержащий БР).

В настоящее время применение БР для борьбы с негативным воздействием на растения тяжелых металлов (ТМ) активно исследуется, хотя полученных данных намного меньше, чем, например, при действии температурного или биотического стресса. Тем не менее, обработки гомобрассинолидом растений уже применяются при фиторемедиации почв [2]. В целом, для многих изученных видов растений отмечено положительное воздействие обработки БР при выращивании на загрязненных ТМ средах: улучшается прорастание семян, рост побегов и корней, биомасса, урожайность. Выявленные пути воздействия БР при ТМ-стрессе включают в себя снижение поглощения ионов металлов из среды (за счет изменения работы ион-транспортных систем), активацию ферментов антиоксидантной защиты, накопление в клетках калия, натрия, пролина, низкомолекулярных антиоксидантов, осмолитов [2]. Также в присутствии БР восстанавливается функционирование фотосинтетического аппарата, как показано, например, для томатов при воздействии кадмия [3].

Сокращения: БР – brassinosterоиды, ГБЛ – гомобрассинолид, ГКК – гидроксикоричные кислоты, ГКС – гомокастастерон, КС – клеточная стенка, ПГК – полигалактуроновая кислота, ПМ – полиметаллы, ТМ – тяжелые металлы.

Для снижения вызванного ТМ стресса применяют обработку семян БР, опрыскивание листьев взрослых растений или добавление БР в питательный раствор в гидропонной культуре. Так, предпосевная обработка семян горчицы (*Brassica juncea*) 1 нМ раствором гомобрассинолида приводила к снижению накопления цинка у семидневных растений по сравнению с контролем, а также улучшала рост побегов [4]. Аналогично, растения риса, выращенные из обработанных 0.1 нМ эпибрассинолидом семян, накапливали меньше хрома, имели большую длину и массу побегов и корней по сравнению с необработанными [5]. Листовая обработка и 10 нМ эпибрассинолидом, и 10 нМ гомобрассинолидом улучшала ростовые параметры растений маша, выращиваемых на среде с алюминием [6]. Добавление брассинолида в питательный раствор в концентрации 2×10^{-13} М и выше при одновременном воздействии алюминия восстанавливало ростовые параметры растений маша и содержание хлорофилла в листьях до уровня контрольных растений на среде без металла [7]. Также, независимо от способа внесения БР у нескольких видов растений наблюдали увеличение активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы, аскорбатпероксидазы, глутатионредуктазы) и транскрипции кодирующих их генов [4–6, 8, 9], а также возрастание содержания в тканях пролина [5, 6]. Известно, что воздействие избыточных концентраций ТМ и алюминия приводит к образованию в тканях растений активных форм кислорода и развитию окислительного стресса. Активация системы антиоксидантной защиты брассиностероидами намного более выражена у растений в присутствии ТМ в среде, чем в контроле, и это позволяет предположить, что данный эффект БР в основном и обеспечивает поддержание роста и фотосинтетической активности при ТМ-стрессе.

БР играют роль в регуляции состава и свойств клеточной стенки (КС), как в обычных, так и при неблагоприятных условиях окружающей среды. Во-первых, БР индуцируют экспрессию генов некоторых изоформ ксиланоглюкан-эндо-трансгликозилаз и экспансинов, которые разрывают водородные связи между микрофибриллами целлюлозы и сшивочными гликанами [10] и, соответственно, повышают растяжимость КС. Во-вторых, БР предположительно регулируют количество целлюлозы в КС и ориентацию микрофибрилл посредством реорганизации кортикальных микротрубочек [11, 12]. В-третьих, при холодовом стрессе БР индуцируют экспрессию пектинметилэстеразы, что приводит к деметилированию пектинов, увеличению количества кальциевых сшивок и к уплотнению келтинового геля, что повышает устойчивость растений к данному стрессору [13]. Наконец, поскольку БР активируют работу антиоксидантных ферментов, в том числе апопластных пероксидаз,

они положительно влияют на синтез лигнина [14] и, возможно, на образование сшивок между мономерами лигнина и оксикоричными кислотами [12]. В результате повышается жесткость КС и снижается содержание активных форм кислорода в апопласте, образование которых было вызвано стрессовыми факторами. Тем не менее, информация о влиянии брассиностероидов непосредственно на ионообменные свойства КС отсутствует, как и данные об индуцируемых БР модификациях КС при воздействии ТМ. В то же время известно, что КС корня выступают как первый защитный барьер на пути поступления металлов в цитоплазму, эффективность которого обусловлена ионообменной способностью КС в отношении катионов ТМ [15]. Вследствие этого цель настоящей работы заключалась в исследовании влияния брассиностероидов (гомокастастерона и гомобрассинолида) в условиях полиметаллического (ПМ) загрязнения на растения ячменя и ионообменную способность КС, выделенных из побегов и корней этих растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выращивание растений. Семена ячменя (*Hordeum vulgare* L., сорт “Биом”) проращивали на свету в перлите в течение 5 сут. Далее растения переносили на жидкую питательную среду (по 10 растений на сосуд объемом 1 л), рН 4.5, содержащую 147.5 мкМ K_2SO_4 , 5 мкМ KH_2PO_4 , 95 мкМ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 120 мкМ NH_4NO_3 , 620 мкМ $CaCl_2$, 275 мкМ $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 0.5 мкМ $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.5 мкМ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 мкМ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.01 мкМ $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 10 мкМ $NaCl$, 1 мкМ H_3BO_3 , 6 мкМ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ и 2.22 г/л ЭДТА. В питательный раствор ежедневно вносили раствор KH_2PO_4 из расчета 1 мкмоль соли на литр среды. Состав данной среды приближен к составу почвенного раствора на кислых почвах, а низкое содержание в ней фосфора и низкий по сравнению с традиционно используемыми питательными средами рН позволяет избежать образования малорастворимых фосфатов при добавлении ТМ [16]. Растения выращивали в климатической камере при температуре 17–19°C, 16-часовом световом дне и интенсивности света 100–110 мкмоль/(м² с).

По истечении 7 сут проводили замену питательной среды, а растения разделяли на 4 варианта: (1) “Контроль” – питательная среда вышеуказанного состава; (2) “ПМ” – питательная среда с добавлением ионов следующих металлов: Al^{3+} – 20 мкМ; Mn^{2+} – 50 мкМ; Cd^{2+} – 2.8 мкМ; Cu^{2+} – 2 мкМ; Ni^{2+} – 16 мкМ; Zn^{2+} – 40 мкМ; Pb^{2+} – 0.3 мкМ; (3) “ГБЛ + ПМ” – питательная среда с добавлением ионов металлов и 10^{-8} М гомобрассинолида; (4) “ГКС + ПМ” – питательная среда с добавлением ионов металлов и 10^{-8} М гомокастастерона. Концентрации ТМ и алюминия были подобраны

на основании типичных значений концентраций этих ионов в почвенном растворе промышленно загрязненных кислых почв [16].

Через 10 сут после замены среды растения разделяли по органам (лист, “стебель” (т. е. влажная часть листьев), корень), определяли их сырую массу (по 5 растений в 10 повторностях на вариант), фиксировали в течение 5 мин при 105°C, а затем высушивали при 60°C до постоянного веса и определяли сухую массу.

Оводненность частей растений (K_{H_2O}) рассчитывали по формуле (1):

$$K_{H_2O} = (m_{сыр} - m_{сух}) / m_{сух}, \quad (1)$$

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

Выделение полимерного матрикса клеточных стенок. Проводили из высушенных листьев, стеблей и корней по описанному ранее методу [17]. Навески растительного материала (~ 1.5 г) помещали в колбы и промывали последовательно 90%-ым этанолом (только листья и стебли, ~0.1 л на колбу) в течение 48 ч, при постоянном перемешивании), 1%-ым раствором NaOH (~0.6 л, в течение 24 ч, при постоянном перемешивании), H₂O (~2 л), 1%-ым раствором HCl (~0.6 л, в течение 24 ч, при постоянном перемешивании) и дистиллированной водой до исчезновения в промывных водах хлорид-ионов. Затем определяли сырую и сухую (после высушивания при 60°C) массу препарата КС. Данный метод выделения позволяет получить препараты КС, в которых сохранена архитектура тканей, но удалено внутриклеточное содержимое, при этом все катионообменные группы полимеров КС присутствуют в H⁺-форме, анионообменные (аминогруппы) – в форме свободного амина [17]. Долю сухой массы КС ($G_{КС}$) в сухой массе органов (%) определяли по формуле (2):

$$G_{КС} = (m_{кк} / m_{к}) \times 100, \quad (2)$$

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

Определение ионообменных свойств клеточных стенок. Исследование ионообменных групп в составе клеточных стенок проводили методом потенциометрического титрования, как описано ранее [18], при постоянной ионной силе раствора (10 мМ), которую создавали добавлением NaCl. Число типов ионообменных групп в КС (j), а также их количество (ΔS^j) определяли по дифференциальным кривым (dS_i/dpH_i) = $f(pH_i)$. Степень ионизации (α_i) для каждой группы рассчитывали по формуле (3):

$$\alpha_i = S_i^j / \Delta S^j, \quad (3)$$

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

Чтобы рассчитать константу ионизации для каждой ионообменной группы, использовали модифицированное Грегором уравнение Хендерсона-Хассельбаха (4):

$$pH = pK_a + n \lg(a/(1-a)), \quad (4)$$

где pK_a – кажущаяся константа ионизации ионообменной группы полимера; α – степень ее ионизации; n – константа, зависящая от строения полимерной матрицы и природы противоиона [18].

Используя установленные значения параметров (ΔS^j , pK_a^j , n^j), рассчитывали S_i^{pac} по суммарному уравнению [18]:

$$S_i^{pac} = S_o^{кат} - \sum_{j,i=1}^{k,m} \left\{ \Delta S^j / (1 + 10^{(pK_a^j - pH_i)/n^j}) \right\}, \quad (5)$$

где S_i^{pac} – расчетное значение ионообменной способности КС при соответствующем значении pH_i ; $S_o^{кат}$ – максимальная катионообменная способность КС; ΔS^j – количество ионообменных групп j -го типа; $S_o^{кат}$, ΔS^j и S_i^{pac} выражены в мкмоль/г сухой массы КС; pK_a^j – кажущаяся константа ионизации ионообменных групп j -го типа; n^j – константа уравнения (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 (6):

$$S_i^{pac} = BS_i^{экс} + A, \quad (6)$$

где S_i^{pac} и $S_i^{экс}$ – рассчитанная по уравнению (4) и экспериментально определенная ионообменная способность при соответствующем значении pH_i , мкмоль/г сухой массы КС; A и B – параметры регрессии.

Поглощение ионов меди изолированными клеточными стенками. Навески сухой измельченной КС массой 40 ± 2 мг инкубировали в течение 72 ч в 12.5 мл 1 мМ раствора CuCl₂ с $pH_{исх}$ 5.1 ± 0.1 , при постоянном перемешивании. Затем образцы КС отделяли от раствора, определяли в нем концентрацию ионов Cu²⁺, как описано в [19], и рассчитывали ионообменную способность КС по формуле (7):

$$S_{Cu} = (C_o - C_i)V/g, \quad (7)$$

где S_{Cu} – сорбционная способность КС в отношении ионов Cu²⁺, мкмоль/г сухой массы КС; C_o и C_i – исходная и конечная концентрации Cu²⁺ в растворе, мМ; V – объем раствора, мл; g – сухая навеска образца КС, г.

Таблица 1. Сухая масса корней ($m_{\text{корень}}$, г), стеблей ($m_{\text{стебель}}$, г) и листьев ($m_{\text{лист}}$, г), отделенных от пяти растений ячменя. Растения были выращены на контрольной среде (контроль), с добавлением полиметаллов (ПМ), в присутствии гомобрасинолида с полиметаллами (ГБЛ + ПМ) или гомокастастерона с полиметаллами (ГКС + ПМ)

Вариант обработки	$m_{\text{корень}}$	$m_{\text{стебель}}$	$m_{\text{лист}}$
Контроль	0.229 ± 0.010	0.280 ± 0.010	0.386 ± 0.014
ПМ	$0.137 \pm 0.005^*$	$0.322 \pm 0.014^*$	0.379 ± 0.011
ГБЛ + ПМ	$0.165 \pm 0.005^*$	0.282 ± 0.007	$0.339 \pm 0.009^*$
ГКС + ПМ	$0.192 \pm 0.005^*$	$0.352 \pm 0.019^*$	$0.431 \pm 0.014^*$

Примечание. Приведены средние значения и их стандартные ошибки. Значения со звездочкой достоверно отличаются от контроля при $P < 0.05$.

Таблица 2. Оводненность (г H_2O /г сухой массы органа) корней ($K_{\text{корень}}$), стеблей ($K_{\text{стебель}}$) и листьев ($K_{\text{лист}}$) ячменя. Растения были выращены на контрольной среде (контроль), с добавлением полиметаллов (ПМ), в присутствии гомобрасинолида с полиметаллами (ГБЛ + ПМ) или гомокастастерона с полиметаллами (ГКС + ПМ)

Вариант обработки	$K_{\text{корень}}$	$K_{\text{стебель}}$	$K_{\text{лист}}$
Контроль	8.612 ± 0.176	5.320 ± 0.089	4.062 ± 0.274
ПМ	$7.685 \pm 0.176^*$	$3.953 \pm 0.106^*$	3.743 ± 0.078
ГБЛ + ПМ	$8.016 \pm 0.220^*$	$4.208 \pm 0.087^*$	3.946 ± 0.101
ГКС + ПМ	8.498 ± 0.159	$3.995 \pm 0.104^*$	3.764 ± 0.137

Примечание. Приведены средние значения и их стандартные ошибки. Значения со звездочкой достоверно отличаются от контроля при $P < 0.05$.

Статистическая обработка данных. Опыты проводили в 3 (потенциометрическое титрование, поглощение Cu) – 10 (определение массы органов) биологических повторностях для каждого варианта выращивания. Обработка данных проводилась с помощью программ Microsoft Excel и IBM SPSS Statistics. Приведены средние значения и их стандартные отклонения или ошибки. Достоверность различий между изучаемыми показателями определяли с помощью двухвыборочного t -критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика растений, выращенных на питательной среде в присутствии полиметаллов и брасиностероидов. Сухая масса корней заметно снижалась по отношению к контролю в присутствии полиметаллов в питательной среде. При добавлении в среду брасиностероидов сухая масса корней также оставалась ниже контрольных значений, но была при этом выше, чем при воздействии только ПМ (табл. 1). Так, если в последнем случае сухая масса снижалась в 1.7 раза, то в присутствии ГБЛ и ГКС – в 1.4 и 1.2 раза соответственно. Таким образом, присутствие в среде брасиностероидов частично нивелировало ингибирующее действие токсичных металлов на рост корней ячменя. Сухая масса стеблей растений была выше или равна контролю при всех обработках. Сухая масса листьев при воздействии

ПМ совместно с ГБЛ снижалась на 14%, а в варианте ГКС + ПМ наоборот была выше контроля на 12%. Следовательно, можно заключить, что присутствие БР на фоне обработки ПМ оказывало положительное влияние на массу корней.

Оводненность тканей корня (табл. 2) снижалась при добавлении в питательную среду ПМ, а при добавлении БР повышалась, и для варианта ГКС + ПМ этот показатель достоверно не отличался от контроля. Оводненность надземных частей растений по-разному изменялась как в ответ на воздействие ПМ, так и на действие ПМ совместно с БР. В стеблях этот показатель снижался в 1.35 раза при действии ПМ, при этом добавление БР не приводило к восстановлению оводненности до контрольного уровня. В листьях же во всех вариантах обработки оводненность тканей достоверно не отличалась от контроля ($P < 0.05$, табл. 2).

Массовая доля клеточной стенки (G^{KC}) возрастала в ряду: корни $>$ листья \geq стебли (табл. 3). В листьях этот показатель достоверно не отличался от контроля при всех вариантах обработки и составлял $41.6 \pm 0.7\%$, а в стеблях и корнях G^{KC} снижалась при воздействии ПМ, при этом добавление в среду гомокастастерона приводило к восстановлению значения G^{KC} до контрольного уровня, тогда как при обработке гомобрасинолидом (вариант ГБЛ + ПМ) значения G^{KC} оставались на уровне значений варианта ПМ (табл. 3).

Таблица 3. Массовая доля КС ($G^{КС}$, %) от сухой массы соответствующих органов ячменя. Растения были выращены на контрольной среде (контроль), с добавлением полиметаллов (ПМ), в присутствии гомобрассинолида с полиметаллами (ГБЛ + ПМ) или гомокастастерона с полиметаллами (ГКС + ПМ)

Вариант обработки	$G_{\text{корень}}^{КС}$	$G_{\text{стебель}}^{КС}$	$G_{\text{лист}}^{КС}$
Контроль	58.85 ± 0.74	41.4 ± 1.16	42.85 ± 0.49
ПМ	53.97 ± 1.1*	38.25 ± 0.61*	40.7 ± 0.71
ГБЛ+ПМ	56.19 ± 0.43*	38.03 ± 0.82*	41.84 ± 0.53
ГКС+ПМ	57.51 ± 0.78	39.46 ± 0.99	41.22 ± 0.57

Примечание. Приведены средние значения и их стандартные ошибки. Значения со звездочкой достоверно отличаются от контроля при $P < 0.05$.

Таблица 4. Коэффициент корреляции ($r_{\text{корр}}^2$) зависимости $S_i^{\text{расч}} = f(S_i^{\text{эксп}})$ и значения параметров регрессии А и В уравнения (6): $S_i^{\text{расч}} = BS_i^{\text{эксп}} + A$, где $S_i^{\text{расч}}$ и $S_i^{\text{эксп}}$ – рассчитанная по уравнению (4) и экспериментально определенная ионообменная способность клеточных стенок, изолированных из корней, стеблей и листьев, при соответствующем значении рН_і

Вариант обработки	Корни			Стебель			Лист		
	A	B	$r_{\text{корр}}^2$	A	B	$r_{\text{корр}}^2$	A	B	$r_{\text{корр}}^2$
Контроль	26.0	0.93	0.975	8.3	0.981	0.983	19.5	0.94	0.985
ПМ	4.62	0.95	0.990	10.2	0.972	0.997	5.41	1.00	0.996
ГБЛ + ПМ	6.09	0.981	0.997	7.64	1.023	0.988	1.96	0.98	0.990
ГКС + ПМ	5.41	0.982	0.998	6.94	1.035	0.997	14.1	1.01	0.988

Таким образом, БР оказывали положительное влияние на сухую массу и оводненность только корней, но не побегов, причем ГКС был более эффективен, чем ГБЛ, и также только его присутствие приводило к восстановлению значения $G^{КС}$ корней и стеблей до контрольного уровня. Следовательно, присутствие в среде ГКС частично нивелирует ингибирующее действие токсичных металлов на корни растений ячменя.

Влияние брассиностероидов на состав ионообменных групп клеточных стенок растений при воздействии полиметаллов. Экспериментальные кривые потенциометрического титрования свидетельствуют о наличии нескольких типов ионообменных групп в составе структурных полимеров КС. Во всех вариантах при рН > 10.8 значения катионообменной способности КС по Na^+ достигали максимального уровня. Это означает, что все ионогенные группы заняты Na^+ , а $S_0^{\text{кат}}$ характеризует общее количество кислотных или катионообменных групп, которые имеются в полимерной структуре КС исследуемых растений. Эти группы могут включаться в реакции ионного обмена при соответствующих значениях рН среды. Следует отметить, что в стенках как надземных органов, так и корней обнаружены анионообменные группы, но их количество не превышало 20 мкмоль/г сухой массы КС. Результаты показали, что рассчитанные значения

ионообменной способности полностью соответствуют полученным экспериментальным данным, о чем свидетельствовали значения коэффициентов корреляции и коэффициентов регрессии для КС и корней, и побегов (табл. 4).

Так же, как и в клеточных стенках других видов растений [19], в КС и корней, и побегов ячменя независимо от варианта обработки обнаружено три типа катионообменных групп (табл. 5): карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты ($S_{\text{ПГК}}$), гидроксикоричных кислот ($S_{\text{ГКК}}$) и фенольные ОН-группы ($S_{\text{Ф-ОН}}$). Последние не принимают участие в ионообменных реакциях, так как значение рK_а этих групп (рK₃, табл. 6) лежит за пределами физиологической области рН.

Расчеты кривых потенциометрического титрования препаратов изолированных КС свидетельствуют о том, что качественный состав ионообменных групп одинаков в КС корней и надземных частей растений, а также в различных вариантах обработки (табл. 6, представлены усредненные между обработками значения рK_і). Следует отметить, что кислотные свойства карбоксильных групп ПГК в КС стеблей более ярко выражены по сравнению с корнями и листьями и убывают в ряду: стебли > листья > корни (табл. 6). Однако количество групп каждого типа (S_j , табл. 5) значительно различается между органами, а в неко-

Таблица 5. Содержание ионообменных групп каждого типа (S_j , мкмоль/г сухой массы КС) в клеточных стенках, изолированных из различных органов ячменя. Растения были выращены на контрольной среде (контроль), с добавлением полиметаллов (ПМ), в присутствии гомобрассинолида с полиметаллами (ГБЛ + ПМ) или гомокастастерона с полиметаллами (ГКС + ПМ). Индексы: ПГК – карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты; ГКК – карбоксильные группы гидроксикоричных кислот; Ф-ОН – фенольные ОН-группы

Вариант обработки	Корни			Стебли			Листья		
	$S_{\text{ПГК}}$	$S_{\text{ГКК}}$	$S_{\text{Ф-ОН}}$	$S_{\text{ПГК}}$	$S_{\text{ГКК}}$	$S_{\text{Ф-ОН}}$	$S_{\text{ПГК}}$	$S_{\text{ГКК}}$	$S_{\text{Ф-ОН}}$
Контроль	119 ± 8	280 ± 25	250 ± 25	260 ± 15	460 ± 20	700 ± 50	270 ± 10	290 ± 25	450 ± 40
ПМ	120 ± 9	260 ± 28	300 ± 30	350 ± 20	540 ± 30	500 ± 30	290 ± 15	290 ± 20	400 ± 30
ПМ + ГБЛ	120 ± 8	280 ± 20	200 ± 20	300 ± 30	300 ± 25	580 ± 45	350 ± 18	300 ± 30	430 ± 35
ПМ + ГКС	140 ± 10	300 ± 25	280 ± 35	280 ± 15	400 ± 35	500 ± 60	350 ± 15	317 ± 35	400 ± 40

Примечание. Приведены средние значения и их стандартные отклонения.

Таблица 6. Средние значения pK_a ионообменных групп в составе клеточных стенок, изолированных из корней и надземных частей растений ячменя. Индексы: ПГК – карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты; ГКК – карбоксильные группы гидроксикоричных кислот; Ф-ОН – фенольные ОН-группы

Орган растений	$pK^{\text{ПГК}}$	$pK^{\text{ГКК}}$	$pK^{\text{Ф-ОН}}$
Корни	4.76 ± 0.04	7.29 ± 0.12	9.71 ± 0.29
Стебли	4.06 ± 0.15	7.46 ± 0.42	9.70 ± 0.47
Листья	4.47 ± 0.04	7.32 ± 0.30	9.54 ± 0.12

Примечание. Приведены средние значения и их стандартные отклонения.

торых случаях и между вариантами обработки. Так, в КС и листьях, и стеблях содержание карбоксильных групп ПГК и фенольных ОН-групп в 2.3–3 и 1.3–2.9 раз выше, чем в КС корней, соответственно. Содержание карбоксильных групп ГКК в КС стеблей выше, чем в КС корней и листьев (табл. 5).

С точки зрения ионообменной способности КС корней ячменя слабо отвечают на присутствие в питательной среде и полиметаллических загрязнений, и брассиностероидов: в варианте ПМ + ГКС содержание ПГК в 1.2 раза выше, чем на других средах, а содержание остальных типов групп близкое во всех вариантах (табл. 5). В КС стеблей в присутствии ПМ содержание карбоксильных групп ПГК в 1.3 раза выше, чем в контроле, но при добавлении БР снижается. Добавление БР в среду существенно снижает количество карбоксильных групп ГКК в КС стеблей, а ПМ (и ПМ + БР) – фенольных ОН-групп. В КС листьев в ответ на воздействие ПМ совместно с БР в 1.3 раза увеличивается содержание карбоксильных групп ПГК.

Чтобы подтвердить данные о содержании карбоксильных групп ПГК в КС разных органов растений ячменя был использован метод, основанный на том, что при $pH < 4$ в ионообменных реакциях с Cu^{2+} участвуют только эти группы, и поэтому Cu -связывающая способность КС изменяется в том же ряду, что и содержание карбоксильных групп ПГК [19]. Полученные нами дан-

ные показали, что после контакта изолированных КС с растворами, содержащими ионы меди в концентрации 1 мМ, pH раствора снижался с 5.0 ± 0.1 до 3.25–3.75. Следовательно, можно утверждать, что при этих условиях в адсорбционном процессе задействованы только карбоксильные группы ПГК. Приведенные в табл. 7 данные доказывают вывод о том, что КС корней ячменя содержат значительно меньшее количество деметилированных пектинов по сравнению с побегами, и оно изменяется в том же ряду, который следует из данных потенциометрического титрования: листья > стебли > корни.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что в ответ на избыток ТМ в среде растения могут реализовывать две стратегии изменения содержания и состава пектинов в КС корня. Изначально секретируемые в КС пектины характеризуются высокой степенью метилирования, а их деметилирование осуществляют апопластные пектинметилэстеразы [20]. Чем ниже степень метилирования пектиновых веществ, тем выше катионообменная способность КС и, следовательно, ее способность накапливать ионы ТМ. Первая из них, обнаруженная большей частью у чувствительных к воздействию тяжелых металлов сортов и видов растений, заключается в увеличении массовой доли деметилированных пектинов в клеточных стенках корня при воздей-

Таблица 7. Си-связывающая способность (мкмоль Си/г сухой массы КС) клеточных стенок, изолированных из различных органов ячменя. Растения были выращены на контрольной среде (контроль), с добавлением полиметаллов (ПМ), в присутствии гомобрассинолида с полиметаллами (ГБЛ + ПМ) или гомакастестерона с полиметаллами (ГКС + ПМ). Исходная концентрация меди в модельном растворе – 1 мМ

Орган растений	Контроль	ПМ	ГБЛ + ПМ	ГКС + ПМ
Корни	45.1 ± 4.9	56.5 ± 4.1	52.7 ± 5.5	55.2 ± 4.5
Стебли	76.0 ± 4.2	63.8 ± 5.8	72.2 ± 5.4	67.0 ± 6.4
Листья	92.0 ± 3.7	88.7 ± 4.7	91.4 ± 4.0	92.0 ± 3.6

Примечание. Приведены средние значения и их стандартные отклонения.

ствии таких тяжелых металлов, как Pb, Cd и Cu, а также алюминий [21, 22]. Вторая, напротив, заключается в уменьшении массовой доли деметилированных пектинов в корневой клеточной стенке в ответ на избыток металла в среде [21, 23]. Так, в клетках корня *Silene paradoxa* происходила генерация клеточных стенок с высокой степенью метилирования. Авторы предположили, что формирование исключающих металл КС является одним из факторов, гарантирующих низкое апопластное накопление меди и, вероятно, ограничивающих симпластное поглощение меди клетками корня [21]. Недавно была обнаружена еще одна стратегия модификации КС в ответ на воздействие повышенных концентраций металлов, заключающаяся в усилении синтеза в равной мере всех полимерных компонентов КС, в том числе и пектинов [24]. Было показано, что реализация такой модификации в КС корня мasha приводит к увеличению массовой доли КС в общей массе корня и, соответственно, к увеличению связывающей способности корня по ионам меди за счет их депонирования в КС. В зависимости от вида, экотипа или сорта растения каждая из стратегий может являться либо механизмом устойчивости к воздействию ТМ, либо наоборот приводит к развитию металл-стресса. Следует отметить, что все указанные стратегии модификации КС в ответ на повышенные концентрации металлов в среде обнаружены в корнях только двудольных растений. В противоположность этим растениям у злаков в клеточных стенках корней не реализуется ни одна из вышеуказанных возможностей модификации КС, как показано для пшеницы и ячменя [24–26]. Однако недавно обнаружено, 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 [26]. Авторы полагают, что такой ответ связан с механизмами поступления ТМ в растения ячменя. 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.

Добавление в питательную среду с полиметаллами БР приводило к изменению и физиологического состояния растений ячменя, и параметров, характеризующих ионообменную способность КС, по сравнению с растениями, находившимися под воздействием только металл-стресса. В присутствии брассиностероида (ГКС) возрастало содержание деметилированных карбоксильных групп ПГК в составе пектинов КС корней, которые, как известно, являются основными сайтами связывания ионов ТМ в КС [15], что предотвращает их избыточное поступление в цитоплазму клеток корня и снижает ингибирующее действие ПМ на рост данного органа. Следовательно, можно предположить, что накопление ПМ в КС корней ячменя усиливается при наличии в среде ГКС, что приводит к их инактивации в апопласте и снижает их ингибирующее действие на рост корней. Положительное действие БР на содержание ПГК возможно связано с опосредованным БР увеличением количества пектинметилэстераз в КС при ПМ стрессе, как это было показано ранее для холодного стресса [13]. В то же время несмотря на то, что БР, как известно, активируют работу антиоксидантных ферментов, в том числе апопластных пероксидаз, и таким образом стимулируют синтез лигнина [14], увеличения содержания фенольных ОН-групп при обработке БР не обнаружено.

В присутствии ПМ в питательной среде заметно снижались сухая масса корней, их оводненность и доля КС по отношению к контролю. И эти результаты соответствуют известным данным о том, что нарушение водного обмена и снижение содержания воды в тканях является одним из первых симптомов токсического действия ТМ и, как правило, острее проявляется в корне, чем в побегах [27, 28]. При добавлении в среду брассиностероидов сухая масса корней также оставалась ниже контрольных значений, но была при этом выше, чем при воздействии только ПМ (табл. 1). Так, если в последнем случае сухая масса снижалась в 1.7 раза, то в присутствии ГБЛ и ГКС – в 1.4 и 1.2 раза соответственно. Таким образом, присутствие в среде брассиностероидов частично ниве-

лировало ингибирующее действие токсичных металлов на рост корней ячменя.

В отличие от КС корней, у которых содержание карбоксильных групп ПГК не изменялось в присутствии ПМ, в КС и листьев, и стеблей содержание деметилированных пектинов увеличивалось при воздействии ПМ. Эти результаты дают основание полагать, что в ответ на воздействие ТМ происходит модификация пектиновых полимеров путем их деметилирования, так содержание карбоксильных групп ПГК возрастало, а массовая доля КС в побегах не изменялась по отношению к контролю. Обработка растений ГБЛ и ГКС на фоне воздействия ПМ не приводила к изменению содержания карбоксильных групп ПГК в КС стеблей, но значительно увеличивала содержание этих групп в КС листьев и соответственно, Ме-связывающую способность КС, что предотвращает избыточное поступление в цитоплазму клеток этого органа. Эти результаты подтверждают приведенное выше предположение [26] о том, что вследствие небольшого содержания карбоксильных групп ПГК в КС корней ячменя, ионы металлов поступают в надземную часть, где накапливаются и инактивируются, в том числе, и в КС.

Также в отличие от корней присутствие ПМ в среде не приводило к снижению массы тканей в надземных частях растений. Обращает на себя внимание тот факт, что обработка ГКС на фоне ПМ увеличивает массу и стеблей, и листьев. Таким образом, присутствие БР на фоне обработки ПМ оказывало существенное положительное влияние как на массу корней, так и побегов.

Таким образом, результаты нашей работы дают основание полагать, что обработка brassinosterоидами (гомокастастероном) может приводить к изменению содержания пектинов, и, соответственно, ионообменных свойств КС и корней, и побегов, которые позволяют снизить токсическое действие ПМ на растения ячменя за счет их депонирования в апопласте соответствующих органов.

Авторы выражают благодарность В.А. Хрипачу (Институт биоорганической химии Национальной академии наук Республики Беларусь, Минск) за предоставление препаратов brassinosterоидов, а также Л.В. Коломейчук и О.К. Мурган (Томский государственный университет, Томск) за участие в проведении экспериментов.

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-54-00013) и в соответствии с научно-исследовательской работой кафедры физиологии растений Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (№ 121032300068-8).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kour J., Kohli S.K., Khanna K., Bakshi P., Sharma P., Singh A.D., Ibrahim M., Devi K., Sharma N., Ohri P., Skalicky M., Brestic M., Bhardwaj R., Landi M., Sharma A. Brassinosteroid signaling, crosstalk and, physiological functions in plants under heavy metal stress // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. P. 608061. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021>
2. Rajewska I., Talarek M., Bajguz A. Brassinosteroids and response of plants to heavy metals action // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 629. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00629>
3. Hayat S., Hasan S.A., Hayat Q., Ahmad A. Brassinosteroids protect *Lycopersicon esculentum* from cadmium toxicity applied as shotgun approach // Protoplasma. 2010. V. 239. P. 3. <https://doi.org/10.1007/s00709-009-0075-2>
4. Sharma P., Bhardwaj R., Arora N., Arora H.K. Effect of 28-homobrassinolide on growth, zinc metal uptake and antioxidative enzyme activities in *Brassica juncea* L. seedlings // Braz. J. Plant Physiol. 2007. V. 19. P. 203. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202007000300004>
5. Sharma P., Kumar A., Bhardwaj R. Plant steroidal hormone epibrassinolide regulate – Heavy metal stress tolerance in *Oryza sativa* L. by modulating antioxidant defense expression // Environ. Exp. Bot. 2016. V. 122. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.08.005>
6. Ali B., Hasan S.A., Hayat S., Hayat Q., Yadav S., Fariduddin Q., Ahmad A. A role for brassinosteroids in the amelioration of aluminum stress through antioxidant system in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) // Environ. Exp. Bot. 2008. V. 62. P. 153. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.07.014>
7. Abdullahi B.A., Gu X.-G., Gan Q.-L., Yang Y.-H. Brassinolide amelioration of aluminium toxicity in mung bean seedling growth // J. Plant Nutr. 2003. V. 26. P. 1725. <https://doi.org/10.1081/PLN-120023278>
8. Fariduddin Q., Khanam S., Hasan S.A., Ali B., Hayat S., Ahmad A. Effect of 28-homobrassinolide on the drought stress-induced changes in photosynthesis and antioxidant system of *Brassica juncea* L. // Acta Physiol. Plant. 2009. V. 31. P. 889. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0302-7>
9. Ramakrishna B., Rao S.S.R. Foliar application of brassinosteroids alleviates adverse effects of zinc toxicity in radish (*Raphanus sativus* L.) plants // Protoplasma. 2015. V. 252. P. 665. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0714-0>
10. Kozuka T., Kobayashi J., Horiguchi G., Demura T., Sakakibara H., Tsukaya H., Nagatani A. Involvement of auxin and brassinosteroid in the regulation of petiole elongation under the shade // Plant Physiol. 2010. V. 153. P. 1608. <https://doi.org/10.1104/pp.110.156802>
11. Bashline L., Lei L., Li S.D., Gu Y. Cell wall, cytoskeleton, and cell expansion in higher plants // Mol. Plant. 2014. V. 7. P. 586. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu018>
12. Rao X., Dixon R.A. Brassinosteroid mediated cell wall remodeling in grasses under abiotic stress // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 806. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00806>

13. Qu T., Liu R.F., Wang W., An L.Z., Chen T., Liu G.X., Zhao Z. Brassinosteroids regulate pectin methylesterase activity and AtPME41 expression in *Arabidopsis* under chilling stress // *Cryobiology*. 2011. V. 63. P. 111. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.07.003>
14. Shen H., Mazarei M., Hisano H., Escamilla-Trevino L., Fu C.X., Pu Y.Q., Rudis M.R., Tang Y., Xiao X., Jackson L., Li G., Hernandez H., Chen F., Ragauskas A.J., Stewart C.N., et al. A genomics approach to deciphering lignin biosynthesis in switchgrass // *Plant Cell*. 2013. V. 25. P. 4342. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.118828>
15. Haynes R.J. Ion exchange properties of roots and ionic interactions within the root apoplasm. Their role in ion accumulation by plants // *Bot. Rev.* 1980. V. 46. P. 75. <https://doi.org/10.1007/BF02860867>
16. Danilova E.D., Zlobin I.E., Kuznetsov V.V., Efimova M.V. Exogenic melatonin reduces the toxic effect of polymetallic stress on barley plants // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2021. V. 499. P. 228. <https://doi.org/10.1134/S1607672921040049>
17. Meychik N.R., Yermakov I.P. Ion exchange properties of plant root cell walls // *Plant Soil*. 2001. V. 234. P. 181. <https://doi.org/10.1023/A:1017936318435>
18. Meychik N.R., Yermakov I.P. A new approach to the investigation on the ionogenic groups of root cell walls // *Plant Soil*. 1999. V. 217. P. 257. <https://doi.org/10.1023/A:1004675309128>
19. Meychik N., Nikolaeva Y., Kushunina M., Yermakov I. Are the carboxyl groups of pectin polymers the only metal-binding sites in plant cell walls? // *Plant Soil*. 2014. V. 381. P. 25. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2111-z>
20. Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis // *Current Opinion in Plant Biology*. 2008. V. 11. P. 266. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>
21. 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. // *Environ. Exp. Bot.* 2012. V. 78. P. 91. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.12.028>
22. Liu T., Shen C., Wang Y., Huang C., Shi J. New insights into regulation of proteome and polysaccharide in cell wall of *Elsholtzia splendens* in response to copper stress // *PLoS One*. 2014. V. 9: e109573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109573>
23. 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 Environ.* 2005. V. 28. P. 1410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01375.x>
24. Meychik N., Nikolaeva Yu., Kushunina M., Yermakov I. Contribution of apoplast to short-term copper uptake by wheat and mung bean roots // *Funct. Plant Biol.* 2016. V. 43. P. 403. <https://doi.org/10.1071/FP15356>
25. Meychik N., Nikolaeva Yu., Kushunina M. The role of the cell walls in Ni binding by plant roots // *J. Plant Physiol.* 2019. V. 234. P. 28. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.01.008>
26. Meychik N.R., Nikolaeva Yu.I., Nikushina 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. V. 501. P. 415. <https://doi.org/10.1134/S160767292106003X>
27. Gabbrielli R., Pandolfini T., Espen L., Palandri M.R. Growth, peroxidase activity and cytological modifications in *Pisum sativum* seedlings exposed to Ni²⁺ toxicity // *J. Plant Physiol.* 1999. V. 155. P. 639. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(99\)80066-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(99)80066-2)
28. Pandey N., Sharma C.P. Effect of heavy metals Co²⁺, Ni²⁺ and Cd²⁺ on growth and metabolism of cabbage // *Plant Sci*. 2002. V. 163. P. 753. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00210-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00210-8)