

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Кушунина Мария Александровна

**РОЛЬ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК В ПОГЛОЩЕНИИ ИОНОВ Cu^{2+} И Ni^{2+}
КОРНЯМИ РАСТЕНИЙ**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

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

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Функции и токсические эффекты меди	14
1.2. Функции и токсические эффекты никеля.....	15
1.3. Механизмы поглощения меди и никеля клетками корней растений	16
1.4. Строение и функции полимеров клеточных стенок растений	20
1.4.1. Целлюлоза.....	21
1.4.2. Сшивочные гликаны	21
1.4.3. Пектины.....	25
1.4.4. Структурные белки	28
1.4.5. Лигнин и гидроксикоричные кислоты	29
1.5. Ионообменные группы в составе клеточных стенок растений, участвующие в связывании катионов тяжелых металлов	30
1.6. Роль клеточной стенки в защитных реакциях растений на присутствие в среде повышенных концентраций ионов меди	33
1.7. Роль клеточной стенки в защитных реакциях растений на присутствие в среде повышенных концентраций ионов никеля.....	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	37
2.1. Определение Cu- и Ni-связывающей способности изолированных КС различных видов растений	37
2.1.1. Выращивание растений.....	37
2.1.2. Выделение клеточных стенок корней.....	37
2.1.3. Определение ионообменных групп в составе клеточных стенок корней.....	40
2.1.4. Определение Cu^{2+} - и Ni^{2+} -связывающей способности изолированных клеточных стенок.....	43
2.2. Поглощение ионов меди и никеля растениями маша и пшеницы и изолированными из их корней клеточными стенками.....	44

2.2.1. Выращивание растений.....	44
2.2.2. Поглощение ионов меди и никеля интактными растениями маша и пшеницы.....	44
2.2.2.1. Поглощение никеля разным количеством растений маша..	46
2.2.2.2. Поглощение никеля растениями маша в присутствии ортованадата натрия.....	46
2.2.2.3. Поглощение никеля растениями маша с частично отсеченной надземной частью.....	47
2.2.3. Выделение клеточных стенок.....	47
2.2.4. Поглощение ионов меди и никеля изолированными клеточными стенками.....	47
2.2.4.1. Поглощение никеля клеточными стенками, выделенными из корней разного количества растений маша.....	48
2.2.4.2. Поглощение никеля клеточными стенками, выделенными из корней маша, в присутствии ортованадата натрия.....	49
2.2.5. Статистическая обработка результатов.....	49
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	50
3.1. Cu- и Ni-связывающая способность изолированных клеточных стенок различных видов растений.....	50
3.2. Поглощение меди растениями маша и пшеницы и изолированными из их корней клеточными стенками.....	61
3.2.1. Влияние повышенных концентраций Си в среде на некоторые показатели роста растений. Накопление Си растениями маша и пшеницы при разных концентрациях Си в растворе.....	61
3.2.2. Адсорбция Си изолированными КС корней маша и пшеницы при разных концентрациях Си в растворе.....	65
3.2.3. Вклад клеточных стенок в поглощение Си корнями маша и пшеницы.....	72
3.3. Поглощение никеля растениями маша и пшеницы и изолированными из их корней клеточными стенками.....	77

3.3.1. Влияние повышенных концентраций Ni в среде на некоторые показатели роста растений.....	77
3.3.2. Адсорбция Ni изолированными КС корней маша и пшеницы при разных концентрациях Ni в растворе.....	83
3.3.3. Вклад клеточных стенок в поглощение никеля корнями маша и пшеницы.....	87
3.4. Сравнение поглощения ионов меди и никеля растениями маша и пшеницы и изолированными из их корней клеточными стенками.....	94
3.4.1. Влияние повышенных концентраций Cu и Ni в среде на некоторые показатели роста растений. Накопление Cu и Ni растениями маша и пшеницы при разных концентрациях этих металлов в растворе.....	94
3.4.2. Адсорбция Cu и Ni изолированными КС корней и вклад КС в поглощение этих металлов корнями маша и пшеницы при их разных концентрациях в растворе.....	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	100
ВЫВОДЫ.....	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	104

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГКК – гидроксикоричные кислоты

КС – клеточная стенка

ПГК – полигалактуроновая кислота

ТМ – тяжелые металлы

$C_{Cu(Ni)}$ – концентрация меди (никеля) в растворе

$S_{ПГК}$ – содержание карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты в изолированных клеточных стенках

$S_{ГКК}$ – содержание карбоксильных групп гидроксикоричных кислот в изолированных клеточных стенках

$S_{Cu(Ni)}$ – медь(никель)-связывающая способность изолированных клеточных стенок

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Загрязнение почв тяжелыми металлами (ТМ) в настоящее время является серьезной экологической проблемой. Для растений ТМ в высоких концентрациях становятся мощными ингибиторами жизненных процессов, вызывают множественные нарушения метаболизма, снижение продукционного потенциала и даже гибель. Избыток ТМ в растительных клетках вызывает широкий спектр токсических реакций, среди которых образование активных форм кислорода, связывание ТМ с сульфгидрильными группами в составе белков, что приводит к деструкции клеточных мембран, нарушению организации цитоскелета и ингибированию ферментов и, как следствие, к ингибированию процессов фотосинтеза, дыхания, клеточного деления, ионного транспорта и т.д. (Ouzounidou et al., 1995; Pandey, Sharma, 2002; Gajewska et al., 2006; Lequeux et al., 2010; Ando et al., 2012). В то же время, некоторые из ТМ являются необходимыми для жизнедеятельности растений элементами. Так, медь является микроэлементом для всех растений. В качестве кофактора она входит в состав многих ферментов и белков, таких как цитохромоксидаза электрон-транспортной цепи митохондрий, пластоцианин, некоторые формы супероксиддисмутаза. А никель считается условно-необходимым микроэлементом, является активатором фермента уреазы, участвующего в азотном обмене.

Внутриклеточные защитные механизмы, реализуемые в ответ на металл-стресс широко изучаются и обсуждаются научным сообществом, и освещены в ряде обзоров (например, Burkhead et al., 2009; Klaumann et al., 2011; Pilon, 2011). В то же время, проблема детоксикации ТМ в апопласте изучена недостаточно, хотя стенка клеток корня первой вступает в контакт с ионами ТМ в почвенном растворе, и представляет собой барьер на пути их проникновения в протопласт. Наличие у клеточной стенки способности к связыванию ионов ТМ является движущей силой их поступления в корень из почвенного раствора и может создавать конкуренцию их поглощению симпластом, особенно при низких концентрациях металла в среде (Redjala et al., 2010).

Исследователи связывают адсорбционную способность КС в отношении ионов ТМ только с карбоксильными группами полигалактуроновой кислоты в составе пектинов (Krzeslowska, 2011; Kholodova et al., 2011). Однако, известно, что помимо них в КС присутствуют и другие функциональные группы, способные участвовать в связывании ионов металлов (Meuchik, Yermakov, 1999, 2001), но роль этих групп в процессах адсорбции ионов ТМ клеточными стенками не установлена, как не установлена и динамика таких процессов при развитии реакций устойчивости целого организма.

Накопление меди и никеля в апопласте было показано для разных видов, как устойчивых к действию этих металлов в естественной среде обитания, так и чувствительных к избытку ТМ (например, Nishizono et al., 1987; Iwasaki et al., 1990). Однако имеющиеся в литературе экспериментальные данные, касающиеся накопления металлов в клеточных стенках, получены “непрямыми методами”. Во всех известных исследованиях сначала выращивали растения на питательных растворах, содержащих ионы металла, затем выделяли клеточную стенку (например, Wei et al., 2008; Konno et al., 2010) или проводили фракционирование металла в корнях путем их обработки различными химическими реагентами, а затем оценивали содержание металла в стенке (Redjala et al., 2010). Такие методы оценки могут приводить как к завышенным, так и заниженным результатам. Прямых определений сорбционной способности клеточной стенки по ионам Cu^{2+} и Ni^{2+} в зависимости от pH, вида растения и в связи с количеством функциональных групп, способных участвовать в связывании данных ТМ, проведено не было.

Следует подчеркнуть, что на сегодняшний день информация о роли апопласта в поглощении ионов меди и никеля корнями растений крайне ограничена. Кроме того, в литературе отсутствуют данные о влиянии концентрации ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} в растворе на эффективность клеточной стенки в качестве барьера для проникновения металла в цитоплазму.

Цель и задачи исследования

Цель работы. Определить Cu- и Ni-связывающую способность клеточных стенок, изолированных из корней растений разных видов, и оценить роль апопласта в поглощении Cu^{2+} и Ni^{2+} при их разной концентрации в среде растениями маша (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek) и пшеницы (*Triticum aestivum* L.), резко отличающихся содержанием катионообменных групп в КС.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Определить максимальную Cu- и Ni-связывающую способность клеточных стенок, изолированных из корней растений пшеницы (*Triticum aestivum* L.), кукурузы (*Zea mays* L.), сведы (*Suaeda altissima* Pall.), шпината (*Spinacia oleracea* L., сорт «Матадор»), маша (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek), нута (*Cicer arietinum* L., сорт «Bivaniј») и вики нарбонской (*Vicia narbonensis* L.) при изменении pH среды;
2. Выяснить, только ли карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты полимерного матрикса клеточных стенок принимают участие в связывании ионов меди и никеля;
3. Провести сравнительный анализ поглощения ионов меди и никеля интактными растениями маша и пшеницы и изолированными из их корней клеточными стенками и оценить вклад клеточных стенок в накопление Cu и Ni корнями растений в зависимости от их концентрации в среде.

Научная новизна

Впервые показано, что способность КС корней растений к связыванию Cu^{2+} и Ni^{2+} зависит от pH среды и вида растения. В интервале pH 3–4 для всех исследованных растений установлена прямая зависимость между содержанием карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты и Cu(Ni)-связывающей способностью КС. Впервые установлено, что наряду с карбоксильными группами полигалактуроновой кислоты в адсорбции Cu^{2+} и Ni^{2+} клеточными стенками участвуют карбоксильные группы гидроксикоричных кислот. На примере пшеницы выявлено функционирование как апопластного, так и симпластного

механизмов накопления Cu^{2+} и Ni^{2+} в корне в зависимости от концентрации металла и показано, что внутриклеточные механизмы «включаются», когда $\geq 90\%$ карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты заняты катионами Cu^{2+} или Ni^{2+} . Установлено, что у мasha депонирование Cu^{2+} и Ni^{2+} в КС корня является основным ответом на присутствие этих металлов в среде во всем исследованном диапазоне концентраций, что обеспечивается более высоким содержанием карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты в КС мasha по сравнению с пшеницей.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработан новый экспериментальный подход к оценке эффективности КС как барьера для проникновения металла в цитоплазму клеток корня растений. Данный подход позволил выявить функционирование как апопластного, так и симпластного механизмов накопления Cu^{2+} и Ni^{2+} в корне, а также провести сравнительный анализ Cu(Ni)-связывающей способности КС в зависимости от состава структурных полимеров и концентрации токсичного металла в среде. Полученные в работе данные расширяют фундаментальные знания о механизмах ионообменной адсорбции Cu^{2+} и Ni^{2+} в КС, показывают роль этих механизмов в устойчивости растений к действию повышенных концентраций ионов меди и никеля в окружающей среде и могут быть использованы в исследовательской практике, а также включены в курсы лекций по минеральному питанию и стресс-устойчивости растений.

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. В интервале рН от 3 до 4 единиц в связывание и Cu^{2+} , и Ni^{2+} включаются только карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты, при этом существует прямая корреляция между содержанием данных групп и содержанием металлов в КС корней различных видов растений.
2. При $\text{pH} \geq 5$ наряду с карбоксильными группами полигалактуроновой кислоты в связывании ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} могут принимать участие карбоксильные группы гидроксикоричных кислот.
3. Количество меди и никеля, связанных как в корнях интактных растений маша и пшеницы, так и в изолированных КС корней, прямо пропорционально содержанию карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты в стенках клеток корня и возрастает при увеличении концентрации Cu^{2+} или Ni^{2+} в растворе.
4. Основным механизмом, предотвращающим накопление меди и никеля в симпласте корня у растений маша и пшеницы, является депонирование этих ионов в апопласт корня, и внутрь клеток корня данные металлы поступают только при самой высокой концентрации в среде, когда $\geq 90\%$ карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты заняты катионами Cu^{2+} или Ni^{2+} .

Апробация работы

По теме диссертации опубликовано 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК и включенных в базы данных Scopus (все статьи) и Web of Science (4 статьи), а также 6 тезисов докладов научных конференций.

Результаты работы были представлены в материалах конференций: Международная конференция «Клеточная биология и биотехнология растений» (Минск, Беларусь, 2013); XX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013» (секция «Биология», Москва, 2013); Всероссийская научная конференция с международным участием «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015); Всероссийская научная конференция с

международным участием «Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде» (Иркутск, 2016); Всероссийская научная конференция с международным участием «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты» (Судак, 2017). Результаты и выводы работы докладывались и обсуждались на научных семинарах кафедры физиологии растений биологического факультета МГУ.

Публикации по теме диссертации

Статьи в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus

1. 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 and Soil*. – 2014. – Vol. 381, № 1–2. – P. 25–34. Импакт-фактор журнала – 3,306.
2. Meychik N., Nikolaeva Y., **Kushunina M.**, Yermakov I. Contribution of apoplast to short-term copper uptake by wheat and mung bean roots // *Functional Plant Biology*. – 2016. – Vol. 43, № 5. – P. 403–412. Импакт-фактор журнала – 2,083.
3. Meychik N., Nikolaeva Yu., **Kushunina M.**, Titova M., Nosov A. Ion-exchange properties of the cell walls isolated from suspension-cultured plant cells // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2017. – Vol. 129, № 3. – P. 493–500. Импакт-фактор журнала – 2,004.
4. Meychik N., Nikolaeva Yu., **Kushunina M.** The role of the cell walls in Ni binding by plant roots // *Journal of Plant Physiology*. – Vol. 234–235. – P. 28–35. Импакт-фактор журнала – 2,833.

Статья в журнале, индексируемом в базе данных Scopus

1. Мейчик Н.Р., Николаева Ю.И., **Кушунина М.А.** Влияние дефицита азота на ионообменные свойства полимеров клеточных стенок корней пшеницы // *Вестник Московского Университета. Серия 16. Биология*. – 2017. – Т. 72, № 2. – С. 87–91. (Meychik N.R., Nikolaeva Yu.I., Kushunina M.A. Effect of nitrogen

deficiency on the ion-exchange properties of cell wall polymers from wheat roots // Moscow University biological sciences bulletin. – 2017. – Vol. 72, № 2. – P. 74–78.)

Тезисы докладов конференций

1. Мейчик Н.Р., Николаева Ю.И., Ермаков И.П., **Кушунина М.А.** Барьерная функция клеточной стенки при поглощении Ni^{2+} // Клеточная биология и биотехнология растений: Тез. докл. – Минск: Изд. Центр БГУ, 2013. – С. 104.
2. **Кушунина М.А.** Роль клеточной стенки в поглощении Cu^{2+} корнями растений (на примере *Triticum aestivum* L. и *Vigna radiata* (L.) R.Wilczek) // Ломоносов-2013: XX Междунар. конф. студентов, аспирантов и мол. ученых: Тез. докл. / под ред. Е.Н. Темеревой. – М.: Макс-Пресс, 2013. – С. 305.
3. **Кушунина М.А.**, Николаева Ю.И., Мейчик Н.Р. Влияние органических и синтетических лигандов на поглощение ионов меди клеточными стенками корней растений // Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий: Тез. докл. Всеросс. научн. конф. с междунар. участием / под ред. А.Ф. Титова. – Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2015. – С. 301.
4. **Кушунина М.А.**, Николаева Ю.И., Мейчик Н.Р. Влияние различных условий азотного питания на некоторые биохимические характеристики клеточных стенок корней пшеницы // Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде: Материалы Всерос. научн. конф. с междунар. участием. – Иркутск: Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2016. – С. 119–120.
5. Мейчик Н.Р., Николаева Ю.И., **Кушунина М.А.** Изменение состава ионообменных групп клеточных стенок корней пшеницы при различных условиях азотного питания // Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты: Годичное собрание ОФР, науч. конф. и школа для мол. уч. / под ред. В.В. Кузнецова. – М.: Изд-во АНО «Центр содействия научной, образовательной и просветительской деятельности «Соцветие», 2017. – С. 228.

6. Мейчик Н.Р., Николаева Ю.И., **Кушунина М.А.** Роль клеточных стенок в поглощении меди и никеля корнями растений // Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты: Годичное собрание ОФР, науч. конф. и школа для мол. уч. / под ред. В.В. Кузнецова. – М.: Изд-во АНО «Центр содействия научной, образовательной и просветительской деятельности «Соцветие», 2017. – С. 227.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

1.1. Функции и токсические эффекты меди

Медь является необходимым элементом для всех растений. В качестве кофактора она входит в состав многих ферментов и белков, таких как цитохромоксидаза электрон-транспортной цепи митохондрий, пластоцианин, лакказы (апопластные пероксидазы) и некоторые формы супероксиддисмутаза. В среднем необходимая для нормального развития растения концентрация меди в вегетативных тканях побега находится в пределах 1–5 мкг (0,016–0,079 мкмоль) на 1 г сухой массы. Эти значения существенно различаются в зависимости от вида, возраста растения и факторов окружающей среды (например, при избыточном азотном питании потребность в Cu резко возрастает). Токсические симптомы начинают проявляться при 20–30 мкг (0,3–0,5 мкмоль) Cu на 1 г сухой массы надземной части (Marschner, 1995). Даже двукратное превышение нормальной концентрации меди в клетке вызывает нарушение метаболизма, что может приводить к развитию хлороза, некроза, к остановке роста побега и корня. Токсические симптомы на уровне целого растения включают в себя снижение массы (особенно резко – корней) и межжилковый хлороз, вызванные в первую очередь недостаточностью элементов минерального питания (главным образом K, Ca, Mg, Fe и Mn), а не прямым токсическим действием Cu^{2+} (Kopittke, Menzies, 2006). На клеточном уровне токсическое действие меди проявляется в (1) связывании Cu^{2+} с SH-группами белков, приводящему среди прочего к ингибированию мембранного транспорта и недостатку элементов питания; (2) индукции образования активных форм кислорода, вызывающих окислительные повреждения (Kholodova et al., 2011). Медь является одним из распространенных токсикантов. Загрязнение почв медью обычно является результатом деятельности человека (разработка месторождений, выплавка руд, сброс отходов с предприятий, использование пестицидов и т.д.). В почвенном растворе концентрация Cu находится в нано- или микромолярном диапазоне, однако в загрязненных почвах она может достигать 10^{-5} М (Marschner, 1995). Даже низкие концентрации свободных ионов Cu^{2+} (1,9–2,7 мкМ) в питательном растворе приводят к появлению токсических симптомов у растений,

в первую очередь к укорочению и утолщению корней, их потемнению, разрывам эпидермиса и кортекса на концевых участках (Kopittke et al., 2011). У большинства растений накопление меди происходит в корнях, и содержание Cu в подземной части превосходит таковое в побегах как минимум в 10 раз (Bravin et al., 2010; Kopittke et al., 2011). Существует также около 30 видов-сверхнакопителей (hyperaccumulators) меди, отличающихся высоким содержанием металла в надземной части (более 1 мг Cu /г сухой массы), большая часть которых является эндемиками почв с высоким содержанием меди в ДР Конго (Krämer, 2010).

1.2. Функции и токсические эффекты никеля

Никель является необходимым микроэлементом для большинства растений. Он участвует в метаболизме азота и прорастании семян у некоторых злаков и бобовых, активируя фермент уреазу (Walker et al., 1985; Brown et al., 1987). С другой стороны, избыток никеля в растении вызывает нарушения в процессах фотосинтеза, дыхания (Yang et al., 1996), минерального питания (Kopittke et al., 2007), транспорта воды в побеги (Gajewska et al., 2006), ферментативной активности и функционирования мембран (Pandolfini et al., 1992), что провоцирует ингибирование роста и поглощения воды. Симптомы токсического действия Ni появляются при его содержании в тканях более 20 мкмоль/г сухой массы надземной части у чувствительных видов (например, пшеницы и ячменя; Davis, Beckett, 1978), и более 50 – у устойчивых (L'Huillier et al., 1996). Морфологически они проявляются в ингибировании роста корня, замедлении роста и увядании побегов и межжилковом хлорозе, который обусловлен влиянием Ni^{2+} на синтез хлорофилла (Kopittke et al., 2007). В отличие от меди, никель не меняет своей степени окисления, поэтому механизм его токсического действия в основном связан с замещением других микроэлементов, главным образом железа (Pandolfini et al., 1992; Yang et al., 1996), а также ингибированием ферментов, вероятно за счет образования устойчивых координационных связей с остатками гистидина в их составе (Серегин, Кожевникова, 2006). Необходимая для нормального развития растения концентрация никеля в надземных частях растения выше, чем для меди и

составляет от 0,1 до 10 мкг Ni/г сухой массы (Marschner, 1995). Число видов-сверхнакопителей Ni намного больше, чем сверхнакопителей Cu, и приближается к 400 (Krämer, 2010).

1.3. Механизмы поглощения меди и никеля клетками корней растений

Механизмы поглощения меди клетками корня до конца не изучены, однако очевидно их явное сходство с механизмами поглощения железа. У злаков не происходит восстановления Cu(II) перед ее переносом в цитоплазму, но имеет место связывание с органическими комплексообразователями (так же как в случае с Fe(III); Ryan et al., 2013). Двудольные и часть однодольных растений (кроме злаков), восстанавливают и железо Fe(III), и медь Cu(II) с помощью мембранных редуктаз. Восстановление Cu(II) осуществляют специфичные Cu(II)-хелатредуктазы FRO4 и FRO5, экспрессия генов которых усиливается при дефиците меди в среде (Bernal et al., 2012). Восстановленные ионы Cu⁺ переносятся в цитоплазму транспортерами, принадлежащими к семейству COPT/Ctr-подобных белков, из которых основным является COPT1. Это высокоаффинный транспортер, присутствующий во многих органах и у арабидопсис преимущественно располагающийся в клетках кончика корня. COPT/Ctr были обнаружены и у однодольных растений: у риса в этом семействе насчитывается 7 генов с тканеспецифичной экспрессией и разным ответом экспрессии на уровень металла в среде (Yuan et al., 2011). Роль ZIP транспортеров в низкоселективном поглощении Cu(II) не доказана, также как и роль H⁺/Cu²⁺ антипортеров плазмалеммы в выведении металла из клетки (Milner et al., 2013). Загрузку ионов меди в вакуоль и вывод их из клетки через плазмалемму осуществляют АТФ-азы P1B-типа HMA5 (Deng et al., 2013; Migocka et al., 2015). На растениях риса было показано, что за загрузку меди в ксилему отвечает белок OsHMA5, переносящий ионы Cu⁺ (Deng et al., 2013).

Поскольку «свободные» (т.е. гидратированные) ионы Cu⁺ и Cu²⁺ обладают высокой реакционной способностью, внутри растительного организма их содержание ничтожно мало. В зависимости от степени окисления, медь внутри

растительного организма связывается с различными соединениями. В восстановленной форме, Cu(I), она в основном связана ковалентными или координационными связями с тиоловыми или тиоэфирными группами, а в окисленной – координируется атомами кислорода или восстановленного азота (Cohu, Pilon, 2010). О преобладании той или иной формы в растительных тканях существуют различные точки зрения. Так, на *Vigna unguiculata* было показано, что через 24 ч после пересадки растений на 1,5 мкМ раствор CuCl₂ 60% ионов Cu²⁺ связано с карбоксильными группами полигалактуроновой кислоты (ПГК) в КС клеток ризодермы и внешнем слое коры корня, остальные связаны с лимонной кислотой, цистеином, или находятся в свободной (гидратированной) форме. В то же время после трехчасового контакта распределение было иным – 45–60% связывалось с цистеином, остальное – с лимонной кислотой или гистидином. Авторы предположили, что в первоначальном связывании меди участвуют цистеин-содержащие соединения, а связывание с карбоксильными группами ПГК происходит после насыщения этих сайтов (Kopittke et al., 2011). У сверхнакопителя Cu *Elsholtzia splendens* медь в растении присутствует в двухвалентной форме и связана преимущественно с атомами O и N, в составе полимеров клеточной стенки и гистидина, соответственно (Shi et al., 2008). У овса и томата и в корнях, и в побегах доминирующей внутриклеточной формой является Cu(I) (связана с глутатионом и цистеином), а подавляющая часть Cu(II) связана с гистидином (Ryan et al., 2013). При этом внутри сосудов ксилемы, по-видимому, происходит окисление Cu(I) до Cu(II), так как установлено, что транспортируемой в побег формой как у одно-, так и у двудольных растений являются комплексы Cu(II) с азотсодержащими соединениями (Ryan et al., 2013). Основными хелаторами, содержащимися в ксилемном соке и образующими наиболее стабильные комплексы с Cu(II), считаются гистидин, никотианамин и его производное мугеновая кислота (Pich, Scholz, 1996; Ando et al., 2012). Гистидин и никотианамин имеют очень высокое сродство к Cu: было показано, что при pH 5,6 гистидин способен связать 98,9% Cu²⁺ в растворе, никотианамин – 99,6% (Liao et al., 2000). Перед поступлением внутрь клеток Cu(II) в составе комплекса

восстанавливается мембранной редуктазой FRO4, и затем свободный ион Cu^+ переносится через плазмалемму транспортерами COPT (Ryan et al., 2013). Возможен и перенос комплексов меди (а также железа) с хелаторами через плазмалемму, который осуществляют протонные симпортеры семейства YSL, принадлежащие к суперсемейству OPT транспортеров (DiDonato et al., 2004).

Внутри клетки Cu(I) связывается со специфичными белками-шаперонами и металлотионеинами, которые имеют высокое сродство к Cu(I) и предотвращают накопление свободных ионов меди в цитоплазме (Ryan et al., 2013). Металлотионеины (MT) – это белки, содержащие большое количество цистеина, тиоловые группы которого связывают Cu(I) , Zn(II) и Cd(II) . У *Arabidopsis thaliana* выявлены четыре группы генов металлотионеинов, уровень экспрессии которых зависит от органа и ткани, а также от содержания меди в них (Guo et al., 2003). Показана роль этих белков в перераспределении Cu(I) между стареющими и растущими тканями, включающая в том числе транспорт Cu(I) -MT по проводящим тканям (Benatti et al., 2014). Металлошапероны – это гидрофильные цитоплазматические белки, имеющие в своем составе металлсвязывающие домены MxSxxC (HMA-домены; Del Pozo et al., 2010). На арабидопсис было показано, что белки-шапероны CSH и ATX1 осуществляют адресную доставку меди к располагающимся на тонопласте транспортеру COPT5 и АТФ-азе HMA5, а также к АТФ-азам HMA6 и HMA8 на внутренней мембране пластид (Abdel-Ghany et al., 2005; Del Pozo et al., 2010). Во внутриклеточном хелатировании и транспорте Cu(I) также участвует глутатион. В частности, было показано, что он входит в комплекс Cu(I) с металлошапероном ATX1 (Miras et al., 2008).

О белках, участвующих в поглощении и транспорте никеля в растении известно немного. На растениях арабидопсис было показано, что за поглощение Ni^{2+} клетками ризодермы отвечает транспортер AtIRT1, относящийся к семейству ZIP транспортеров и также обеспечивающий вход Fe^{2+} и других двухвалентных катионов тяжелых металлов (Nishida et al., 2011). Внутри растения ионы Ni^{2+} координируются с атомами азота в составе никотианамина, гистидина, мугеновой кислоты, а также с атомами кислорода в составе органических кислот, главным

образом лимонной и яблочной (Vacchina et al., 2003; Krämer et al., 2000). В ксилемном экссудате никель хелатирован главным образом цитратом при pH 5, и гистидином – при pH 6,5 (Riesen, Feller, 2005). Трансмембранный перенос комплексов с азотсодержащими хелаторами внутрь клеток вероятно осуществляют транспортеры семейства YSL (Schaaf et al., 2004), хотя прямых экспериментальных данных получено пока не было. За загрузку никеля в ксилему у арабидопсис отвечает транспортер AtIREG1/FPN1, тогда как AtIREG2/FPN2 переносит Ni²⁺ через тонопласт в вакуоль (Morrissey et al., 2009). На тонопласте сверхнакопителя никеля *Thlaspi goesingense* (*Noccaea goesingensis*) обнаружены транспортеры TgMTP1t1 и TgMTP1t2, переносящие Ni (возможно, в комплексе с хелатором) в вакуоль и играющие ключевую роль в детоксикации Ni (Persans et al., 2001). У других сверхнакопителей, *Alyssum lesbiacum* и *Psychotria gabriellae*, схожую функцию выполняют, соответственно, пока не идентифицированные Ni²⁺/H⁺-антипортеры (Ingle et al., 2008) и транспортеры из семейств NRAMP и IREG/FPN (Merlot et al., 2014). Глутатион и металлотioneины не принимают участия во внутриклеточном связывании никеля, по причине низкого сродства этого металла к тиоловым группам (Серегин, Кожевникова, 2006).

Аминокислоты, мугеновая кислота и близкие соединения образуют комплексы с ионами ТМ не только внутри растения, но и в почвенном растворе. Несмотря на то, что они поглощаются почвенной микробиотой, высокие концентрации (по сравнению с концентрацией ТМ) этих соединений, локально поддерживаемые растением в приграничном с корнем слое, вероятно играют важную роль в увеличении доступности ТМ для корней (Brynhildsen, Rosswall, 1995; Fageria, Stone, 2006). Хелатирование определенными лигандами, такими как гистидин (Richau et al., 2009), никотианамин (Pich, Scholz, 1996) и цитрат (Senden et al., 1995), является предпосылкой для быстрого перемещения ионов ТМ в ксилему и затем в надземную часть растения, что стимулирует накопление ТМ в ней. Индукция синтеза гистидина, глутамина и никотианамина при увеличении концентрации меди в среде была показана для цикория и томатов (Liao et al., 2000), синтеза гистидина – у сверхнакопителей никеля *Noccaea caerulea* и *Alyssum*

lesbiacum при увеличении его концентрации в среде (Kerkeb, Krämer, 2003; Richau et al., 2009). Следует отметить, что присутствие низкомолекулярных лигандов, образующих комплексы с катионами металлов, оказывает влияние на адсорбцию металлов клеточными стенками. Внутри сосудов ксилемы, по-видимому, существует рН-зависимое равновесие между свободной формой катиона ТМ, его комплексами с низкомолекулярными хелаторами, свободной формой этих веществ и металл-связывающими сайтами в КС (Clemens et al., 2002). С другой стороны, о возможности перемещения комплексов ТМ с низкомолекулярными лигандами по апопласту корня к ксилеме почти ничего не известно. Константы устойчивости комплексов Cu и других ТМ с органическими кислотами в среднем выше, чем комплексов Cu(ТМ)-ПГК (Field et al., 1974; Yadava et al., 1976; Davarski et al., 1994; Cataldo et al., 2012). Поэтому при достаточной концентрации в апопласте лиганды могут составлять сильную конкуренцию карбоксильным группам ПГК, но при этом возможна и адсорбция комплексов ТМ-лиганд в полимерном матриксе КС (Senden et al., 1995).

1.4. Строение и функции полимеров клеточных стенок растений

Клеточная стенка высших растений представляет собой сложную структуру, состоящую из взаимосвязанных сетей полимеров главным образом полисахаридной природы. В среднем, первичная клеточная стенка двудольных растений содержит в расчете на единицу сухой массы 15–40% целлюлозы, 30–50% пектинов, 20–30% сшивочных гликанов (гемицеллюлоз) и 2–10% структурных белков. КС злаков содержит меньше пектинов (2–10%), но больше гемицеллюлоз (до 50%), с которыми связаны гидроксикоричные кислоты, главным образом феруловая (Keegstra et al., 1973; McNeil et al., 1984; Cosgrove, Jarvis, 2012). Вторичная КС характеризуется более высоким содержанием целлюлозы и более низким содержанием гемицеллюлоз, пектинов и белков, а также наличием ароматических полимеров – лигнина и суберина. Далее мы кратко рассмотрим разнообразие и состав полимеров КС, а также взаимосвязи между ними. Следует отметить, что данные о составе КС растений получены на разных объектах и для

разных типов тканей, преимущественно надземной части или культивируемых *in vitro*, и данные по КС корней крайне ограничены.

1.4.1. Целлюлоза

Целлюлоза является неразветвленным полимером, состоящим из остатков D-глюкозы, соединенных β -(1 \rightarrow 4)-гликозидной связью. Полимерные цепочки (от 18 до 36 единиц) собраны в микрофибриллы, паракристаллическая структура которых поддерживается водородными связями и ван-дер-Ваальсовыми взаимодействиями (Kim et al., 2013). Микрофибриллы вторичной КС имеют более прочную кристаллическую структуру и протяженность, чем микрофибриллы первичной КС (McNeil et al., 1984). Целлюлоза синтезируется многосубъединичными целлюлозосинтазными комплексами, встроенными в плазмалемму и перемещающимися в ней благодаря взаимодействию с цитоскелетом. Комплексы имеют гексамерную структуру и состоят, по последним данным, из 18 или 24 молекул целлюлозосинтазы, каждая из которых синтезирует одну глюкоановую цепь (Oehme et al., 2015). Целлюлоза не содержит ионообменных групп, способных к диссоциации в физиологических условиях, поэтому не вносит вклада в связывание катионов металлов в КС.

1.4.2. Сшивочные гликаны

Сшивочные гликаны (гемицеллюлозы) представляют собой разнородную группу полисахаридов, в которую входят разветвленные полимеры с β -(1 \rightarrow 4)-связью моносахаридов в основной цепи (ксилоглюканы, ксиланы, маннаны и глюкоманнаны) и глюканы со смешанным β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4) типом связи (Рисунок 1). Последние обнаружены только у злаков, тогда как остальные типы присутствуют в той или иной степени в КС всех высших растений (Scheller, Ulvskov, 2010). Для гемицеллюлоз характерно разнообразие структуры в зависимости от типа ткани и вида растения.

Ксилоглюканы являются преобладающим типом гемицеллюлоз в первичной КС двудольных, их массовая доля может составлять до 25% (Scheller, Ulvskov,

2010). Основная цепь состоит из соединенных β -(1→4)-связью остатков D-глюкозы, к которым с определенной периодичностью присоединен (1→6)-связью остаток D-ксилозы. Последние замещаются в О-2 положении остатками D-галактозы или L-арабинозы. К галактозному остатку может быть присоединена L-фукоза. К остаткам ксилозы могут присоединяться и другие моносахариды (ксилоза, арабиноза, галактуроновая кислота), поэтому в настоящее время выделяют около 17 типов структур ксилоглюканов (Schultink et al., 2014). Регулярность расположения боковых заместителей и состав боковых цепочек приурочены к определенным таксономическим группам растений и/или типам ткани (Fry et al., 1993).

Ксиланы представлены глюкуроноксилами и глюкуроноарабиноксилами, которые являются преобладающими гемицеллюлозами соответственно во вторичной КС двудольных и КС злаков (как первичной, так и вторичной). Основная цепь глюкуроноксианов состоит из соединенных β -(1→4)-связью остатков D-ксилозы, к некоторым из которых по О-2 положению присоединен остаток D-глюкуроновой кислоты. Глюкуроноарабиноксианы имеют ту же структуру, но боковыми заместителями являются также остатки L-арабинозы (присоединяются в О-2 и/или О-3 положениях), которые могут быть этерифицированы феруловой кислотой (Scheller, Ulvskov, 2010). Соотношение между остатками глюкуроновой кислоты и арабинозы видо- и тканеспецифично (Peña et al., 2016). Арабинозные боковые заместители также были обнаружены и у некоторых двудольных (Darvill et al., 1980).

В отличие от ксилоглюканов, ксиланы не имеют определенного порядка присоединения боковых моносахаридов. Остатки ксилозы часто (особенно у двудольных) ацетилированы по О-3 или О-2 положению, что влияет на конформацию макромолекулы (Ebringerova et al., 2005; Rennie, Scheller, 2014).

Маннаны и глюкоманнаны являются минорными компонентами КС двудольных. Первые являются полимерами D-маннозы, к которой в О-6 положении может быть присоединена D-галактоза; вторые – нерегулярными полимерами, состоящими из D-маннозы и D-глюкозы (Scheller, Ulvskov, 2010).

Галактоглокоманнаны, в которых в качестве боковых заместителей присутствует D-галактоза, обнаружены во вторичной КС хвойных растений, где составляют до 30% массы (Ebringerova et al., 2005). Также как и ксиланы, маннаны и глюкоманнаны часто ацетируются.

Все гемицеллюлозы синтезируются разнообразными гликозилтрансферазами, локализованными в аппарате Гольджи. После секреции в апопласт цепи гликанов укорачиваются специфичными изоформами апопластных

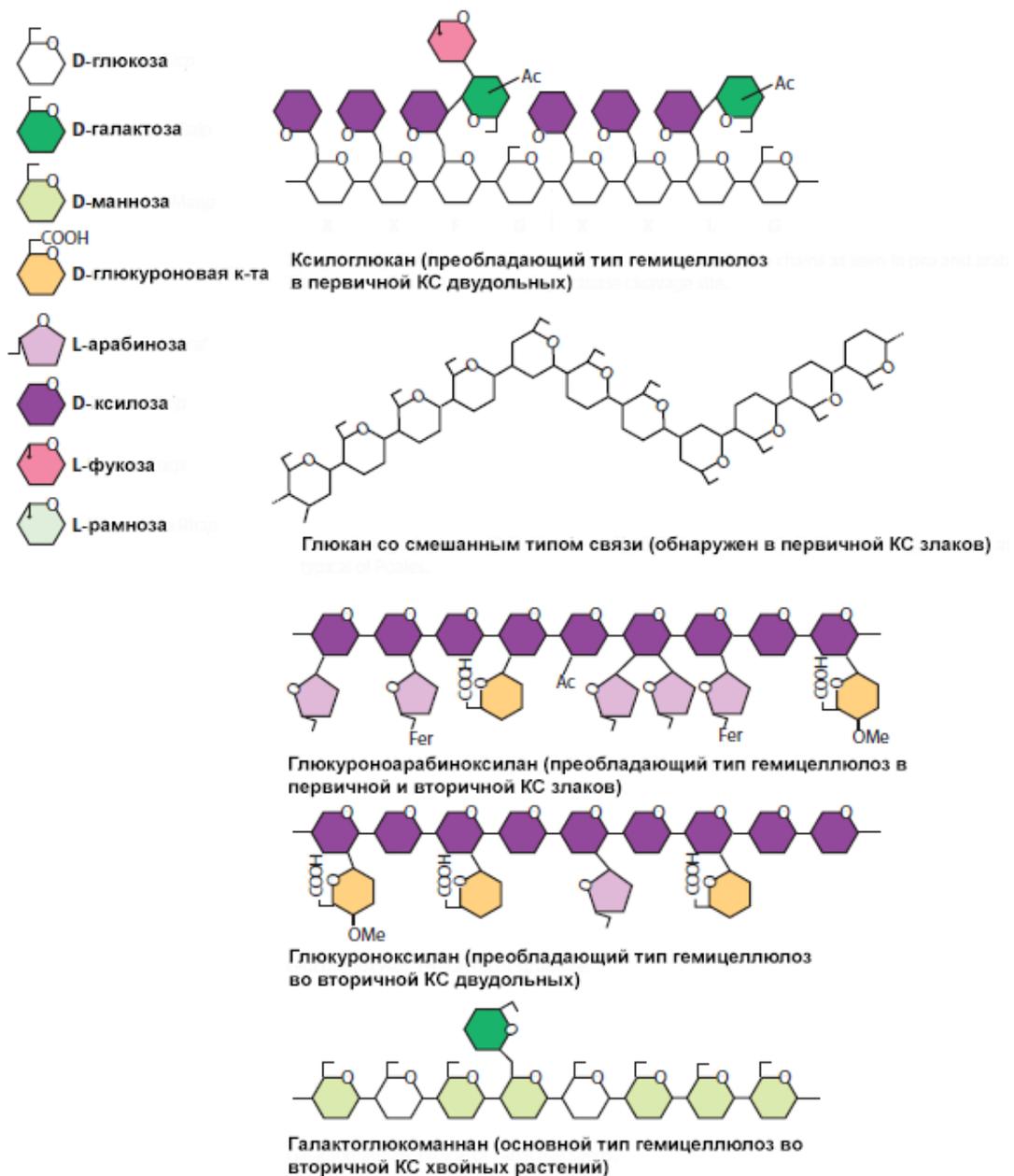


Рисунок 1. Схемы строения основных типов сшивочных гликанов. Fer – остаток феруловой кислоты, Me – метильная группа, Ac – ацетильная группа. Из Scheller, Ulvskov (2010), с изменениями.

гликозидаз, что обеспечивает гетерогенность гемицеллюлоз в КС. Гидролазы (трансгликолазы), представленные множеством изоформ, и родственные им экспансины обеспечивают соответственно перестройки ковалентных связей полимера и водородных межмолекулярных связей (Scheller, Ulvskov, 2010).

Главной физиологической функцией сшивочных гликанов является образование связей с другими полисахаридами КС (и лигнином в случае злаков) и объединение их в единую полимерную сеть, что увеличивает прочность КС. Ранее предполагалось, что сшивочные гликаны непосредственно соединяют целлюлозные микрофибриллы (посредством образования водородных связей между ними и при «застревании» гликана в микрофибрилле во время ее кристаллизации), или же что взаимодействие между гликаном и целлюлозой осуществляется через образование связей с пектинами (Keegstra et al., 1973). Согласно последним исследованиям, в КС двудольных до 30% ксилоглюканов ковалентно связано с пектином (рамногалактуронаном I), причем сшивки образуются еще на стадии синтеза данных полимеров в аппарате Гольджи (Ropper, Fry, 2008). В КС злаков ксилоглюканы функционально замещаются глюкуроноарабиноксиланами, и остатки феруловой кислоты в их составе играют основную роль в образовании внутри- и межмолекулярных сшивок. При воздействии пероксидаз происходит образование связи между соседними остатками феруловой кислоты, принадлежащими одной или разным молекулам глюкуроноарабиноксилана, или между остатком феруловой кислоты и ароматическим спиртом в составе лигнина (Grabber, 2005). Недавно и для злаков, и для арабидопсис было показано наличие большого числа участков электростатических взаимодействий полярных групп ксиланов и гидрофобных доменов лигнина (Kang et al., 2019). Таким образом, во вторичной КС полимерные сети сшивочных гликанов и лигнина могут быть связаны или ковалентно, или электростатически.

В отличие от целлюлозы, гемицеллюлозы могут принимать ограниченное участие в связывании катионов металлов. Глюкуроно(арабино)ксиланы содержат в качестве боковых заместителей остатки глюкуроновой кислоты, карбоксильная

группа которых вероятно диссоциирована при физиологических значениях pH. Однако маловероятно, что конфигурация полимера такова, чтобы два остатка глюконовой кислоты оказались достаточно близко для того, чтобы связать катион двухвалентного металла. Способность к связыванию алюминия была показана для ксиланов (Yang et al., 2011), хотя каким образом происходит связывание, пока не известно, так как ксиланы не содержат ионогенных групп.

1.4.3. Пектины

Пектины – это разнородное семейство кислых полисахаридов, содержащих галактуроновую кислоту в основной цепи. Помимо структурной, пектины выполняют множество функций в КС, таких как связывание катионов, поддержание пористости, вязкости и оводненности КС, межклеточной адгезии, защита от патогенов и межклеточный сигналинг. В первичной КС двудольных растений пектины составляют до 35% сухой массы, у злаков – не более 10% (McNeil et al., 1984; Carpita, 1996). Выделяют четыре основных типа пектинов в зависимости от их структуры: гомогалактуронаны, рамногалактуронаны I типа, рамногалактуронаны II типа и ксиланогалактуронаны.

Гомогалактуронаны составляют до 65% пектинов в первичной КС двудольных и являются неразветвленными полимерами галактуроновой кислоты, остатки которой соединены α -(1→4)-связью и могут быть метилированы по карбоксильной группе и ацетилированы в O-2 или O-3 положении (Caffall, Mohnen, 2009).

Наиболее сложной структурой обладают рамногалактуронаны II типа, составляющие около 10% всех пектинов в КС двудольных (Рисунок 2). У большинства исследованных видов растений они состоят из короткой основной цепи связанных α -(1→4)-связью остатков D-галактуроновой кислоты, к которым присоединяются разветвленные или линейные боковые цепи, классифицируемые на 4 типа (A, B, C, D) и имеющие в своем составе 10–12 различных моносахаридов, соединенных несколькими типами связей. В клеточной стенке рамногалактуронаны

II обычно присутствуют в виде димеров благодаря боратной сшивке остатков апиозы в боковой цепи типа А (Mohnen, 2008).

Рамногалактуронаны I типа составляют у двудольных от 20 до 35% пектиновых веществ КС. В их основной цепи чередуются остатки галактуроновой кислоты и рамнозы $[-\alpha\text{-D-GalA-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow\text{4)-}]_n$ (Рисунок 3). Боковые цепи состоят из остатков галактозы и/или арабинозы, они могут быть линейными или разветвленными и имеют различную структуру в зависимости от вида растения, типа и возраста ткани, ее функциональной специализации. Степень разветвленности также не является постоянным признаком: боковые заместители могут присутствовать у 20–80% остатков рамнозы основной цепи (Mohnen, 2008).

Ксилогалактуронаны являются полимерами галактуроновой кислоты, содержащими также ксилозу, присоединенную $\beta\text{-(1}\rightarrow\text{3)}$ -связью к некоторым из остатков галактуроновой кислоты. Они присутствуют в основном в репродуктивных органах растений, однако у арабидопсис были также обнаружены в листьях и стеблях (Mohnen, 2008).

Известно, что гомогалактуронаны, рамногалактуронаны I и II типов ковалентно связаны в КС (Mohnen, 2008), а рамногалактуронаны I образуют сшивки с ксилоглюканами (Popper, Fry, 2008). У растений из семейства маревые (Chenopodiaceae) к остаткам галактозы и арабинозы в боковых цепях рамногалактуронана I присоединяется феруловая кислота (Ralet et al., 2005), что способствует образованию межмолекулярных сшивок с пектинами и структурными белками. Также было показано, что нейтральные боковые цепи рамногалактуронанов способны связываться с целлюлозой *in vitro*, хотя и не так активно, как ксилоглюканы (Zykwinska et al., 2008).

Биосинтез пектинов происходит в аппарате Гольджи и требует участия по меньшей мере 67 гликозил-, метил- и ацетилтрансфераз. Секретируемые в КС пектины характеризуются высокой степенью метилирования и деметилируются апопластными пектинметилэстеразами (Mohnen, 2008). Степень метилирования пектиновых веществ в КС определяет их катионообменную способность, жесткость структуры (деметилированные карбоксилы могут сшивать соседние цепочки за

счет образования кальциевых мостиков) и силу межклеточной адгезии (Jarvis et al., 2003).

Благодаря высокому содержанию галактуроновой кислоты (около 70% по массе), пектины обладают высокой катионообменной способностью и определяют способность КС к связыванию тяжелых металлов (Krzyszowska, 2011).

1.4.4. Структурные белки

Структурные белки составляют от 2 до 10% сухой массы КС (Keegstra et al., 1973) и подразделяются на два семейства в зависимости от аминокислотного состава – гидроксипролин-обогащенные и глицин-обогащенные белки.

К семейству гидроксипролин-обогащенных белков относятся экстенсины, пролин-обогащенные и арабиногалактановые белки. У *Arabidopsis thaliana* с помощью биоинформатического анализа выявлено 59 генов, кодирующих экстенсины, 18 – пролин-обогащенные, и 85 – арабиногалактановые белки (Showalter et al., 2010). Общим для белков всех трех групп является гидроксирование остатков пролина и возможность присоединения к этому гидроксилу углеводного фрагмента. При этом самой высокой степенью гликозилирования характеризуются арабиногалактановые, а самой низкой – пролин-обогащенные белки. Экстенсины – наиболее изученная группа белков КС. Они содержат повторяющиеся и протяженные гидроксипролиновые участки, гликозилированные короткими арабиноолигосахаридами, обладают основными свойствами и имеют спиральную структуру (Lamport et al., 2011). Соседние молекулы экстенсинов могут соединяться за счет образования сшивок между остатками тирозина (Brady et al., 1998).

Арабиногалактановые белки характеризуются высокой степенью гликозилирования (массовая доля углеводной части может составлять до 98%) и разнообразием структур, гомологичны протеогликанам животных и заякориваются в плазмалемме с помощью фосфатидилинозитола. Их углеводным компонентом являются арабиногалактаны II типа, которые также являются боковыми цепями в составе пектинов, а именно рамногалактуронанов I. Поэтому в КС

арабиногалактановые белки ковалентно связаны с пектинами и, возможно, ксиланами (Tan et al., 2012). Арабиногалактановые белки выполняют в основном сигнальную функцию, участвуя в регуляции таких процессов как деление и растяжение клеток, соматический эмбриогенез, дифференциация ксилемы и ответы на абиотические стрессы (Tan et al., 2012).

Пролин-обогащенные белки отличаются низким содержанием гидроксипролина и слабо гликозилированы (Jose-Estanyol, Puigdomenech, 2000). Высокое содержание тирозина указывает на их возможное участие в ответах на нарушение целостности тканей: под действием пероксидаз происходит образование тирозиновых сшивок между молекулами белка, а также с лигнином, что повышает прочность КС (Jose-Estanyol, Puigdomenech, 2000).

Глицин-обогащенные белки содержат глициновые повторы различной протяженности и характеризуются тканеспецифичной экспрессией. Для некоторых белков данной группы была показана роль в регуляции лигнификации и синтеза вторичной КС в проводящих тканях (Mangeon et al., 2010).

Содержание свободных аминокрупп в составе структурных белков невелико (у пшеницы – 20–25 мкмоль/г сухой массы КС; Мейчик и др., 2017) и по этой причине КС растений обладают низкой анионообменной способностью, проявляющейся только при $pH < 3$, когда все карбоксильные группы других полимеров КС протонированы.

1.4.5. Лигнин и гидроксикоричные кислоты

Лигнин является гетерополимером фенилпропаноидных спиртов (монолигнолов) – пара-кумарового, кониферилового и синапового. Полимеризация монолигнолов в КС происходит посредством их окисления пероксидазами и лакказами по радикальному механизму, вследствие чего полимер имеет нерегулярную структуру с различными типами связей (Bonawitz, Chapple, 2010). Содержание лигнина во вторичной КС может достигать 30%, и оно определяет ее прочность. Фенилпропаноидные спирты синтезируются в цитозоле и проникают через плазмалемму либо путем простой диффузии (Voija, Johansson, 2006), либо с

помощью АВС-транспортеров (Alejandro et al., 2012). Количественное соотношение мономеров лигнина может быть различным и влияет на его структуру и свойства. У двудольных в составе лигнина преобладают синаповый и кониферилловый спирты, у злаков – *n*-кумаровый (Bonawitz, Chapple, 2010). Помимо указанных фенилпропаноидных спиртов, в структуре лигнина также присутствуют феруловая кислота, посредством которой лигнин сшивается с ксиланами, кониферилловый альдегид, а также остатки уксусной, *n*-кумаровой и *n*-гидроксibenзойной кислот, связанные с монолигнолами сложноэфирной связью (Bonawitz, Chapple, 2010). Таким образом, лигнин содержит два типа ионогенных групп – фенольные ОН-группы ($pK_a \sim 10$) и карбоксильные группы гидроксикоричных кислот (pK_a 6–7), однако только вторые могут участвовать в ионообменных реакциях при характерных для апопласта значениях pH 5–6 (Meuchik, Yermakov, 2001).

Гидроксикоричные кислоты (феруловая и *n*-кумаровая) обнаруживаются главным образом в первичной и вторичной КС растений из семейств злаковые и маревые. У последних эти соединения связываются сложноэфирными связями с остатками арабинозы и галактозы в составе пектинов, тогда как у злаков – с глюкуроноарабиноксиланами (см. п. 1.4.2). ГКК также могут присоединяться различными типами связей к мономерам лигнина и, таким образом, являться сшивками между полисахаридами и лигнином (Vogel, 2008). Свободные карбоксильные группы присутствуют у тех молекул ГКК, которые не образуют сложноэфирную связь, т.е. связаны другим типом связи с лигнином или с другой молекулой ГКК (Ralet et al., 2005; Vogel, 2008).

1.5. Ионообменные группы в составе клеточных стенок растений, участвующие в связывании катионов тяжелых металлов

Клеточная стенка клеток корня первой вступает в контакт с внешним (почвенным) раствором, состав которого изменяется в ходе ионообменных реакций с функциональными группами в составе полимеров КС. Этот процесс имеет важное значение в регуляции транспорта минеральных элементов по апопласту и их

проникновения в симпласт (Grignon, Sentenac, 1991; Sattelmacher, 2001). Известно, что состав КС постоянно модифицируется в ответ на изменение метаболизма клеток и факторов внешней среды (Colzi et al., 2012; Zhang et al., 2014). При повышенной концентрации тяжелых металлов в почвенном растворе КС корня выступают как первый защитный барьер на пути их поступления в цитоплазму, эффективность которого обусловлена сорбционной способностью КС в отношении катионов металлов (Haynes, 1980).

Полисахариды КС играют ключевую роль в связывании и накоплении тяжелых металлов в апопласте, хотя и другие его компоненты (белки, аминокислоты и фенольные соединения) также принимают участие в этом процессе (Мейчик и др., 1999, 2006а, 2011; Krzesłowska, 2011). В составе структурных полимеров КС растений обнаружено три типа катионообменных групп (Meuchik, Yermakov, 1999, 2001): 1) карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты (ПГК; pK_a 4–5) в составе пектинов; 2) карбоксильные группы гидроксикоричных кислот (ГКК; pK_a 6–7); 3) фенольные ОН-группы (pK_a ~10) в составе лигнина; 4) первичные аминогруппы, которые принадлежат структурным белкам КС и аминокислотам, связанным с другими полимерами КС, и проявляются на кривых потенциометрического титрования при $pH < 3$. В физиологических условиях (pH 4–8) только карбоксильные группы ионизированы и способны к реакциям обмена с катионами внешней среды. Фенольные ОН-группы не принимают участия в ионообменных реакциях, так как значение их pK_a лежит за пределами указанного диапазона pH (Meuchik, Yermakov, 2001). Суммарное количество ионообменных групп в КС растений колеблется в широких пределах и составляет 700–1500 мкмоль/г сухой массы КС (Grignon, Sentenac, 1991; Meuchik, Yermakov, 2001; Sattelmacher, 2001). При этом самое высокое содержание карбоксильных групп ПГК обнаружено в КС корней бобовых растений (500–700 мкмоль/г сухой массы КС), а самое высокое содержание карбоксильных групп ГКК – у злаков и маревых (400–500 мкмоль/г сухой массы КС (Meuchik, Yermakov, 2001; Мейчик и др., 2006а). Эти показатели коррелируют с содержанием соответствующих полимеров в КС. У двудольных и однодольных (за исключением

злаков) пектины составляют 20–50% сухой массы КС, тогда как у злаков – не более 10% (McNeil et al., 1984; Carpita, 1996). Гидроксикоричные кислоты (главным образом, феруловая кислота), наряду с уроновыми, принимают участие в ионообменных реакциях (Мейчик и др., 2006а) и играют важную роль в образовании сшивок между полимерными цепями в КС злаков и маревых (Saulnier, Thibault, 1999). У злаков дополнительным сайтом связывания катионов металлов могут быть карбоксильные группы глюкуроновой кислоты в составе глюкуроноарабиноксиланов (Carpita, Gibeaut, 1993).

Ионообменные свойства КС в отношении двух- и трехвалентных катионов металлов главным образом определяются содержанием деметилированных карбоксильных групп галактуроновой кислоты (Sattelmacher, 2001; Krzesłowska, 2011) в составе пектиновых веществ. Известно, что Cu^{2+} образует бидентатный комплекс с двумя карбоксильными группами соседних полимерных цепей (Allan, Jarrel, 1989), а в отсутствие катионов тяжелых металлов эти группы связаны, как полагают, ионами кальция (Carpita, Gibeaut, 1993). Двухвалентные катионы меди, свинца, кадмия, цинка и никеля, а также Al^{3+} , вытесняют кальций, причем Cu^{2+} и Pb^{2+} образуют наиболее прочные связи с карбоксильными группами уроновых кислот, а Zn^{2+} и Cd^{2+} – наименее прочные (Kartel et al., 1999). Однако однозначно расположить катионы тяжелых металлов в ряд по способности связываться с пектиновыми веществами не представляется возможным, поскольку механизмы взаимодействия зависят от плотности заряда пектинов, прочности связывания катионов конкретных металлов с пектиновыми веществами (Renard, Jarvis, 1999), а также ионной силы и pH во внешнем растворе (Meuchik, Yermakov, 2001), которые, впрочем, в интактном растении поддерживаются на постоянном уровне.

Вследствие того, что состав и структура КС зависят от вида растения, особенностей его минерального питания и возраста конкретной ткани, катионообменная способность КС представляется весьма лабильной величиной. Так, например, развитие вторичной КС в некоторых тканях с возрастом вызывает снижение катионообменной способности КС из-за уменьшения содержания пектиновых веществ, которые замещаются лигнинами (Straczek et al., 2008).

Поступление азота в растение только в аммонийной форме препятствует накоплению пектинов и гемицеллюлоз в КС корней, что также вызывает снижение ее катионообменной способности (Wang et al., 2015).

1.6. Роль клеточной стенки в защитных реакциях растений на присутствие в среде повышенных концентраций ионов меди

По мнению многих авторов, депонирование меди в клеточной стенке является универсальным механизмом ее детоксикации (обобщено в Kholodova et al., 2011). Существенная роль клеточных стенок в компартментации ионов Cu^{2+} при их повышенной концентрации в среде установлена для многих видов, растущих на почвах с высоким содержанием этого металла и устойчивых к его воздействию (металлофитов). Так, в КС корней папоротников *Athyrium yokoscense* и *Lygodium japonicum* удерживается, соответственно, до 60 и 90% Cu от общего содержания металла в тканях этого органа (Nishizono et al., 1987; Konno et al., 2005), при этом максимальных значений Cu-связывающая способность изолированных КС достигала при pH 5,5. Преимущественное накопление меди в КС клеток корня было также обнаружено у *Sedum plumbizincicola*, сверхнакопителя Cd и Zn (Li et al., 2013), накопителей Cu *Elsholtzia splendens* и *E. haichowensis* (Lou et al., 2004; Peng et al., 2005; Shi et al., 2008), в КС протонемы металлофитного мха *Scopelophila cataractae* (Konno et al., 2010). Для всех этих видов-металлофитов накопление меди в КС считается эффективным механизмом ее детоксикации, который позволяет ограничить перемещение Cu в протопласт клеток корней, а также в надземную часть растения. Высокая сорбционная способность КС клеток корня в отношении ионов Cu^{2+} характерна и для видов растений, не приспособленных к произрастанию на загрязненных медью почвах, в том числе для сельскохозяйственных культур, что объясняется высокой прочностью связи Cu^{2+} с карбоксильными группами галактуроновой кислоты в составе пектинов (Kartel et al., 1999). От 50 до 80% связанной в корне Cu обнаруживалось в КС у растений пшеницы (Bravin et al., 2010), *Vigna unguiculata* (Kopittke et al., 2011), *Sorghum sudanense* и *Chrysanthemum coronarium* (Wei et al., 2008), а также плевела (*Lolium multiflorum*) и клевера

(*Trifolium pratense*) (Iwasaki et al., 1990), при этом у двудольных (хризантемы и клевера) содержание меди в КС было значительно выше, чем у злаков, вероятно за счет более высокого содержания пектинов в КС. Несмотря на то, что в вышеуказанных работах было показано, что клеточная стенка является основным местом накопления Cu, данное явление не обязательно коррелирует с высокой устойчивостью растений к этому тяжелому металлу. Например, у растений *Vigna unguiculata* связывание Cu с карбоксильными группами ПГК в КС клеток ризодермы нарушало способность КС к растяжению, что вызывало появление трещин поверхности корня и замедляло его рост в длину (Kopittke et al., 2008).

Известно, что КС активно модифицируется при Cu стрессе, при этом выделяют две стратегии изменения состава КС корня, присущие разным видам растений. Для некоторых видов было показано, что избыток меди в среде вызывает увеличение содержания пектиновых веществ с низкой степенью метилирования карбоксильных групп, что приводит к накоплению металла в КС. В зависимости от вида растений, такое накопление является либо механизмом детоксикации Cu (у *Elsholtzia splendens* (Liu et al., 2014) и у *Lygodium japonicum* (Konno et al., 2005), либо причиной ингибирования роста (у *Silene paradoxa*; Colzi et al., 2012). У других видов защитные реакции на избыток меди в среде включают в себя снижение содержания пектинов в КС и повышение степени метилирования карбоксильных групп ПГК (Konno et al., 2010; Colzi et al., 2012), что препятствует накоплению Cu в КС, поскольку в ионообменные реакции с катионами могут вступать только деметилированные карбоксильные группы (Sattelmacher, 2001). Образующиеся в присутствии меди активные формы кислорода могут быть посредниками в изменении состава КС. Так, было показано, что гидроксил-радикал ($\bullet\text{OH}$) вызывает неферментативное расщепление полисахаридов КС в пределах 100 нм от места своего образования, что приводит к локальному разрыхлению матрикса КС (Fry et al., 2002). Более долгоживущий пероксид водорода H_2O_2 активирует пектинметилэстеразы, что приводит к деметилированию карбоксильных групп ПГК, а также индуцирует синтез пектинов в клетках корня (Xiong et al., 2015). Кроме того, при высоких концентрациях Cu в среде и сопутствующем

окислительном стрессе наблюдается увеличение активности апопластных пероксидаз и лакказ, и, как следствие, увеличение содержания ГКК и усиление лигнификации КС (Lin et al., 2005; Vuletic et al., 2014).

1.7. Роль клеточной стенки в защитных реакциях растений на присутствие в среде повышенных концентраций ионов никеля

Данные о связывании никеля в клеточной стенке растений крайне немногочисленны. Тем не менее, для исследованных видов вклад КС в накопление этого металла весьма значителен. Для КС корней пшеницы он составляет от 60 до 86% в зависимости от сорта (Dalir, Khoshgoftarmanesh, 2014). С использованием метода рентгеновской абсорбционной спектроскопии Krämer et al. (2000) показали, что у сверхнакопителя Ni *Noccaea goesingensis* 68% клеточного никеля в листьях связано с функциональными группами КС, 28% – с цитратом (предположительно в вакуоли), 4% – с гистидином (предположительно в цитоплазме). У другого сверхнакопителя Ni, *Leptoplax emarginata*, вклад апопласта в поглощение никеля корнями растения при высоких концентрациях Ni в среде (250 мкМ) составляет 90,6–95,5%, а для кукурузы этот показатель достигает 81,3–88,0% (Redjala et al., 2010). Преобладающее связывание никеля с КС в корне было показано и для сверхнакопителя *Berkheya coddii* (Moradi et al., 2010). Мейчик и др. (2011) установили, что у неустойчивых к избытку Ni видов адсорбционная способность КС корня варьирует от 50 до 150 мкмоль Ni²⁺/г сухой массы КС, возрастая в ряду злаковые < маревые < бобовые. В некоторых исследованиях, напротив, ведущая роль в накоплении Ni отводится протопласту клеток корня (к примеру, у растений кукурузы (Серегин и др., 2003) и сои (Cataldo et al., 1978)), или же доля металла, накапливаемого в КС и внутри клеток предполагается примерно равной (Liu, Kottke, 2003).

Таким образом, анализ данных литературы показывает, что при повышенной концентрации тяжелых металлов в окружающей среде их депонирование в КС является одним из механизмов защиты от повреждающего действия ТМ,

функционирование которого связано с адсорбционной способностью КС. Для определения локализации ТМ в тканях и оценки вклада апопласта в их поглощение используются различные методы, такие как рентгеновская спектроскопия (Liu, Kottke, 2003; Kopittke et al., 2011), окрашивание тканей диметилглиоксимом (Серегин и др., 2003; Moradi et al., 2010), физико-химическое фракционирование металла в корне (Redjala et al., 2010; Dalir, Khoshgoftarmanesh, 2014) и сравнение поглощения металла при различных температурах (Zhao et al., 2002). Однако описанные в литературе способы определения металл-связывающей способности КС включают в себя использование деструктивных и разных по своей сути методик, позволяющих только полуколичественно оценить накопление металлов в КС и выявить его взаимосвязь с содержанием карбоксильных групп ПГК (например, Wei et al., 2008; Konno et al., 2010). Кроме того, экспериментальные условия в известных работах, в частности концентрации тяжелых металлов в растворе и состав питательной среды, очень различны. Также нет никакой информации о влиянии концентрации ТМ в растворе на эффективность КС в качестве барьера, препятствующего проникновению ионов металлов в цитоплазму. Эти обстоятельства не позволяют адекватно проводить сравнительный анализ адсорбционной способности клеточной стенки по ТМ у растений разных видов. В настоящей работе будет определена Cu и Ni-обменная способность КС, изолированных недеструктивным методом и определена взаимосвязь между этими параметрами и количеством ионообменных групп в составе полимеров КС, а также выявлен вклад апопласта в поглощение меди и никеля корнем.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

2.1. Определение Cu- и Ni-связывающей способности изолированных КС различных видов растений

2.1.1. Выращивание растений

Объектами исследования являлись: а) растения из семейства маревые – 50-дневные растения сведы (*Suaeda altissima* Pall.) и шпината (*Spinacia oleracea* L., сорт «Матадор»); б) растения из семейства злаковые – 21-дневные растения пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и 16-дневные растения кукурузы (*Zea mays* L.); в) растения из семейства бобовые – 20-дневные растения маша (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek), нута (*Cicer arietinum* L., сорт «Bivaniј») и вики нарбонской (*Vicia narbonensis* L., сорт «Sel2384»).

Семена сведы и шпината в течение двух недель проращивали во влажном вермикулите, а затем проростки пересаживали на питательный раствор Робинсона (Robinson, Downton, 1984) следующего состава: 6 мМ KNO₃, 4 мМ Ca(NO₃)₂, 2 мМ MgSO₄, 1 мМ KH₂PO₄, 50 мкМ FeNa(EDTA)₂, 50 мкМ H₃BO₃, 10 мкМ MnCl₂, 1 мкМ ZnSO₄, 0,5 мкМ CuSO₄, 0,1 мкМ Na₂MoO₄. Семена остальных растений проращивали на влажной фильтровальной бумаге в термостате при 24°C в темноте в течение 2–3 суток. После этого растения выращивали на модифицированном питательном растворе Прянишникова (1 мМ NH₄NO₃, 1 мМ KCl, 0,25 мМ MgSO₄, 1,3 мМ CaSO₄, 0,5 мМ CaHPO₄, 0,07 мМ FeNa(EDTA)₂). Концентрация Cu²⁺ и Ni²⁺ во всех питательных растворах не превышала 0,5 мкМ. Питательные растворы в сосудах с растениями подвергались постоянной аэрации и обновлялись каждые 5 дней. Растения содержали в климатической камере при температуре 24–26°C и световом режиме 14 ч (день) и 10 ч (ночь), освещенности 110 мкмоль фотонов/м²×с.

2.1.2. Выделение клеточных стенок корней

Клеточные стенки корней выделяли в соответствии с ранее описанной методикой (Meuchik, Yermakov, 1999), позволяющей получать материал, в котором не изменены форма и размеры КС. Данная процедура выделения клеточной стенки

основана на методе, который широко используется в химии полимеров для очистки макропористых ионообменных материалов от высоко- и низкомолекулярных продуктов их синтеза (Helfferich, 1962). Метод, традиционный в физической химии полимеров, но практически не используемый в физиологии растений.

Отсеченные и промытые дистиллированной водой корни (массой 1–2 г) промывали последовательно 1% NaOH (~0,5 л, в течение 24 часов, при постоянном интенсивном перемешивании), дистиллированной водой (~2 л), 1% HCl (~0,5 л, в течение 24 часов, при постоянном интенсивном перемешивании) и затем дистиллированной водой до исчезновения хлорид-ионов в промывных водах (проверяли титрованием с $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$), затем высушивали при 55–60°C в течение 7 суток.

В полученных препаратах все имеющиеся в структуре КС катионообменные группы присутствовали в протонированной форме, а анионообменные (аминогруппы) – в форме свободного амина ($-\text{NH}_2$), что позволяет проводить сравнительное исследование сорбционных свойств образцов с различной структурой функциональных групп. Подробное описание и обоснование метода даны в статьях Мейчик и др. (1999, 2003, 2006а,б), Meuchik, Yermakov (1999, 2001). Описанный выше метод выделения позволяет получать стабильный препарат КС, что принципиально важно для количественного анализа содержания ионогенных групп в структурных полимерах. Метод ранее был опробован на различных объектах: высшие растения (Meuchik, Yermakov, 1999; 2001; Мейчик и др. 1999; 2001; 2003, 2006а,б; 2009а,б), лишайники (Воробьев и др. 2009; Мейчик, Воробьев, 2012), водоросли (Мейчик и др., 2011) и грибы (Андрянова и др., 2010).

Известно, что для выделения растительных клеточных стенок используются разные методы. Часть из них включает гомогенизацию образца (например, Feiz et al., 2006), но наряду с этим используются методы, в которых очистку стенки проводят без механического разрушения КС, используя только химические методы (например, Wei et al., 2008). В качестве экстрагирующих реагентов используют: а) смесь «метанол и хлороформ (в объемном соотношении 1:1) (например, Wei et al., 2008; Konno et al., 2010); б) детергент (Triton X-100), растворитель (ацетон) и

раствор электролита (соли натрия) (например, Morvan et al., 1979); в) только раствор электролита (25 мМ HCl) (например, Richter, Dainty, 1989). При этом только в последней упомянутой работе приведено доказательство чистоты выделения препаратов КС методом сканирующей электронной микроскопии. Как правило, в известной литературе исследователи не приводят критериев оценки чистоты выделяемых КС, ограничиваясь указанием количества реагентов, которые они используют для выделения. Тогда как использованный нами метод выделения ранее был проверен с использованием разных экспериментальных подходов:

- 1) методом элементного анализа показано, что содержание элементов (С, Н, N) в препаратах клеточных стенок, выделенных по нашему методу и через процедуру гомогенизации, практически совпадало (Мейчик, Воробьев, 2012);
- 2) цитологическим методом показана полнота очистки препаратов клеточной стенки от компонентов протопласта: в препаратах стенки не выявлялись фрагменты ядер и ДНК-содержащие органеллы (окрашивание DAPI, флуоресцентная микроскопия) (Мейчик и др., 2006б);
- 3) известно, что в клеточных стенках полисахаридная сеть, состоящая из целлюлозы, гемицеллюлоз и пектинов, образует потенциальную ловушку для загрязняющих веществ, таких как внутриклеточные белки (Feiz et al., 2006). Было показано, что в препаратах КС, полученных с помощью нашего метода, практически отсутствуют белки, адсорбированные из протопласта в процессе выделения стенки (Мейчик и др., 2009а).

Также важно отметить, что наши данные о составе КС разных видов растений, полученные с использованием примененной нами методологии исследования КС, полностью соответствуют выводам, которые делают другие авторы, используя иные методы выделения и исследования:

- 1) содержание пектинов выше у бобовых по сравнению со злаковыми (Meuchik, Yermakov, 1999; 2001; Haynes, 1980; Grignon, Sentenac, 1991);
- 2) содержание структурных белков в КС выше у двудольных по сравнению с однодольными (Мейчик и др., 2009а; Cassab, 1988);
- 3) содержание полигалактуроновой кислоты в КС корней *Silene paradoxa* (350–800

мкмоль ПГК/г сухой массы КС в зависимости от возраста, Colzi et al., 2012) согласуется с ее содержанием в полученных нами препаратах из корней двудольных растений других видов (300–600 мкмоль ПГК/г сухой массы КС, см. п.3.1).

Следует также отметить, что использованная нами процедура выделения КС не приводит к изменению степени метилирования карбоксильных групп в составе пектинов. Как известно, для деметилирования пектинов используются два метода – ферментативный (с использованием пектинметилэстеразы) и щелочной гидролиз. Последний описан, к примеру, в работе Klavons, Bennett (1986) для разбавленных растворов очищенного препарата пектина и заключается в их обработке 0,5 М раствором NaOH. Нами же в процессе выделения КС используется вдвое более низкая концентрация щелочи (0,25 М). Ранее было показано, что содержание деметилированных карбоксильных групп в препаратах КС, полученных с помощью методики без обработки NaOH и с помощью описанного метода, не различается (Мейчик и др., 1999). Кроме того, пектины в составе полимерного матрикса КС сложнее поддаются модификации, чем чистый водорастворимый пектин.

2.1.3. Определение ионообменных групп в составе клеточных стенок

Потенциометрическое титрование осуществляли согласно методике, описанной в работе Meuchik & Yermakov (1999). Измельченные сухие образцы КС массой $40 \pm 0,1$ мг инкубировали в течение 48 ч в 12,5 мл раствора NaOH или HCl с концентрацией от 0 до 10 мМ и одинаковой ионной силой (100 мМ), которую создавали добавлением необходимого количества NaCl. Диапазон равновесных значений pH в растворах составлял от 2,7 до 12,0 единиц. Исходную и равновесную концентрацию кислоты или щелочи в растворе определяли титрованием с индикатором бромтимоловым синим. Ионообменную способность КС рассчитывали по формуле:

$$S_i^{кат,ан} = \frac{|(C_o - C_i)| \times V}{g} \quad (2.1)$$

где $S_i^{кат,ан}$ – катионо-(анионо-)обменная способность КС, мкмоль/г сухой массы КС; C_o и C_i – исходная и соответствующая равновесная концентрация NaOH или

НСI в растворе, мМ; V – объем раствора для инкубации КС, мл; g – сухая масса образца КС, г.

Для всех исследованных видов экспериментальные кривые потенциометрического титрования имели сложную полисигмоидную форму, что указывает на присутствие нескольких типов ионообменных групп в составе структурных полимеров КС (Рисунок 4, приведена кривая для КС корней вики). При $pH \approx 11$ катионообменная способность КС ($S_o^{кат}$) достигала максимальных значений, соответствующих общему количеству кислотных групп, содержащихся в КС корней исследуемых растений. Число типов ионообменных групп в КС (j), а также их количество (S^j) определяли по дифференциальным кривым ($dS^j/dpH_i = f(pH_i)$), как описано ранее (Meuchik, Yermakov, 2001). Для КС всех исследованных видов дифференциальные кривые имели аналогичный характер, и каждая их характеризовалась наличием трех точек перегиба, что свидетельствует о присутствии в КС четырех типов ионообменных групп с $pK_a < 3$, $\sim 4,0$; $\sim 7,5$ и ~ 10 (Рисунок 5). Первый тип представлен анионообменными группами (в данной области pH происходит не выделение протона, а его поглощение), а два другие – катионообменными.

Исходя из задач работы, в разделе «Результаты и обсуждение» мы представили данные только о содержании карбоксильных групп полигалактуроновой и гидроксикоричных кислот, и не приводим значения других параметров (S^j , pK_a) для каждого исследованного вида.

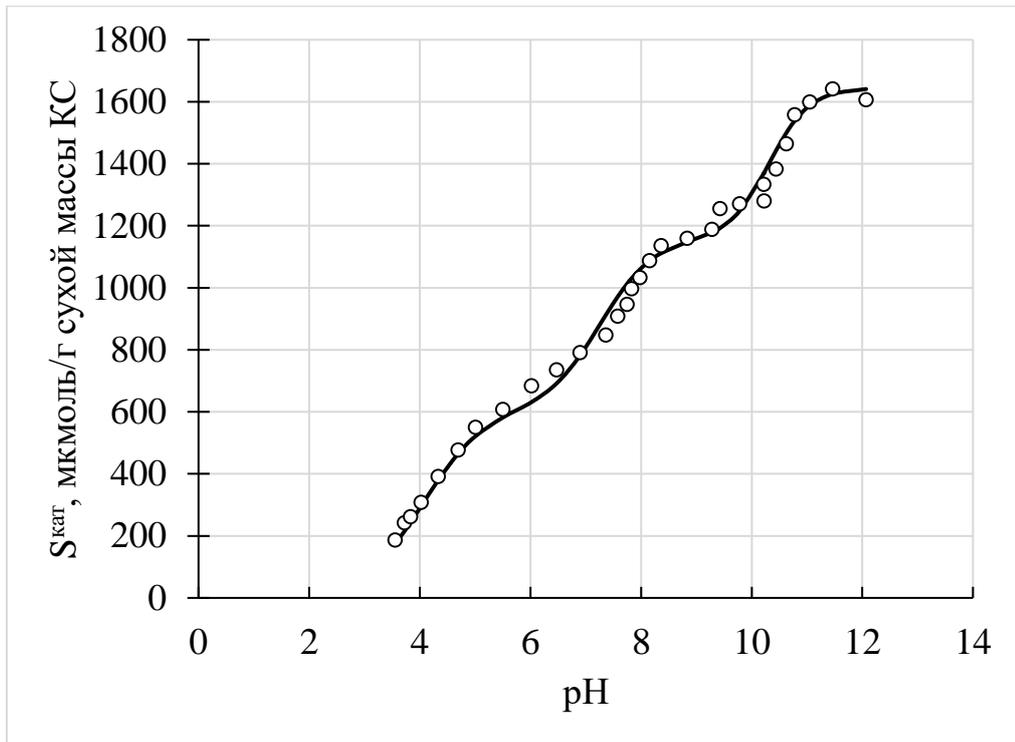


Рисунок 4. Потенциометрическая кривая титрования клеточных стенок корней 20-дневных растений вики. По оси ординат отложена катионообменная способность клеточных стенок ($S^{\text{кат}}$, мкмоль на 1 г сухой массы КС). Точки – экспериментальные данные, сплошные линии – рассчитанные по уравнению (2.4) значения $S_i^{\text{кат}}$.

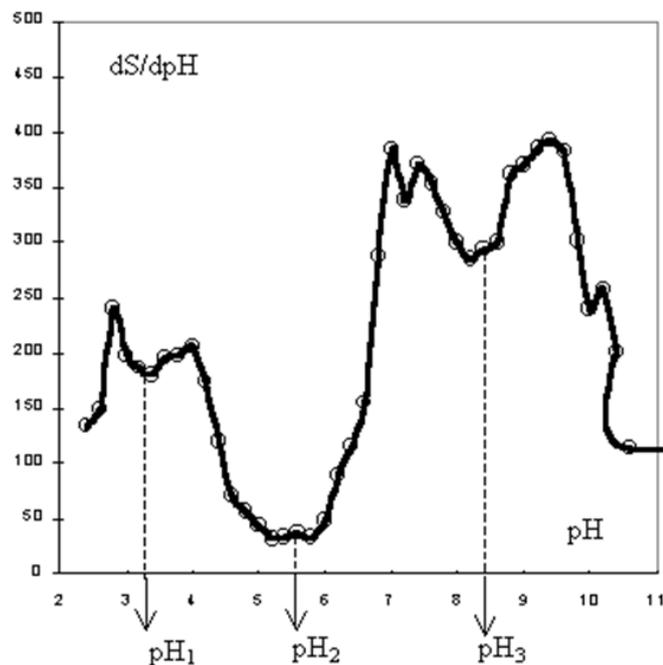


Рисунок 5. Типичная дифференциальная кривая, рассчитанная из экспериментальных потенциометрических кривых.

2.1.4. Определение Cu^{2+} - и Ni^{2+} -связывающей способности изолированных клеточных стенок

Сухие измельченные образцы КС ($40 \pm 0,1$ мг) инкубировали в течение 7 суток в 12,5 мл 1 мМ раствора CuCl_2 или NiCl_2 . Мы использовали высокую концентрацию ионов металлов в растворе и проводили инкубацию КС в них в течение длительного времени для того, чтобы установить максимальную ионообменную способность КС корней разных видов в отношении Cu^{2+} и Ni^{2+} . Начальную и равновесную концентрацию Cu^{2+} определяли колориметрическим методом (фотоколориметр КФК-3-01, ЗОМЗ, Россия) по реакции с купризомом (бис(циклогексанон)оксальдигидразон), Ni^{2+} – по реакции с диметилглиоксимом (Марченко, 1971). $\text{Cu}(\text{Ni})$ -связывающую способность КС рассчитывали по формуле:

$$S_{\text{Cu}(\text{Ni})} = \frac{(C_{in} - C_{eq}) \times V}{g} \quad (2.6)$$

где $S_{\text{Cu}(\text{Ni})}$ – сорбционная способность КС в отношении ионов Cu^{2+} (Ni^{2+}), мкмоль/г сухой массы КС; C_{in} и C_{eq} – исходная и равновесная концентрации Cu^{2+} (Ni^{2+}) в растворе, мМ; V – объем раствора, мл; g – сухая навеска образца КС, г.

Для установления вклада карбоксильных групп ПГК и ГКК в Cu - и Ni -связывающую способность изолированных КС последнюю определяли при разных рН раствора CuCl_2 или NiCl_2 : а) $\text{pH}_{\text{исх}}$ $5,00 \pm 0,05$, без буфера, в этих растворах равновесный рН после 7 суток инкубации составлял 3,1–3,8 в зависимости от вида растения; б) растворы с 1 мМ ацетатным буфером ($\text{pH}_{\text{исх}} = \text{pH}_{\text{равн}} = 5,0$); в) растворы с 1 мМ аммонийным буфером ($\text{pH}_{\text{исх}} = \text{pH}_{\text{равн}} = 6,5$). Известно, что образование нерастворимого $\text{Cu}(\text{OH})_2$ начинается при значениях $\text{pH} \geq 5,5$, $\text{Ni}(\text{OH})_2$ – при $\text{pH} \geq 6,7$. При рН 6,5–6,8 от 6 до 10% ионов Cu^{2+} в растворе осаждаются в виде гидроксида (Ермаков и др., 2004). Однако, в аммонийном буфере (рН 6,5) образование $\text{Cu}(\text{OH})_2$ и $\text{Ni}(\text{OH})_2$ не происходит из-за включения Cu^{2+} (Ni^{2+}) в состав аммонийных комплексов.

После сорбции ионов меди, образцы КС отделяли от раствора и тщательно промывали дистиллированной водой до исчезновения Cu^{2+} (Ni^{2+}) в промывных

водах. Затем препараты обсушивали фильтровальной бумагой и выдерживали в течение 7 суток в 10 мл 0,1 М раствора HCl. После инкубации КС отделяли от раствора, измеряли в нем концентрацию Cu^{2+} (Ni^{2+}) и рассчитывали Cu(Ni)-связывающую способность КС по формуле:

$$S_{\text{Cu(Ni)}} = \frac{C_{\text{Cu(Ni)}} V_p}{g}, \quad (2.7)$$

где $S_{\text{Cu(Ni)}}$ – Cu(Ni)-связывающая способность КС, мкмоль/г сухой массы КС;

$C_{\text{Cu(Ni)}}$ – концентрация Cu^{2+} (Ni^{2+}) в растворе после десорбции, мМ; V_p – объём 0,1 М HCl для десорбции, мл; g – масса сухой навески КС, г.

Значения Cu-(Ni)-связывающей способности КС, полученные при измерении сорбции металлов из растворов и последующей десорбции, не отличались в пределах погрешности эксперимента, поэтому были усреднены.

2.2. Поглощение ионов меди и никеля растениями маша и пшеницы и изолированными из их корней клеточными стенками

2.2.1. Выращивание растений

Объектами исследования являлись 9-дневные растения пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и маша (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). Семена растений проращивали на влажной фильтровальной бумаге в термостате при 24°C в темноте в течение 2–3 суток. После этого растения выращивали на низкосолевым питательном растворе (0,065 мМ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,05 мМ KH_2PO_4 , 0,435 мМ CaCl_2 , 0,1 мМ MgSO_4 , 0,01 мМ FeCl_3). Концентрация Cu^{2+} и Ni^{2+} в питательном растворе не превышала 0,5 мкМ. Питательные растворы в сосудах с растениями подвергались постоянной аэрации и обновлялись каждые 5 дней. Растения содержали в климатической камере при температуре 24–26°C и световом режиме 14 ч (день) и 10 ч (ночь), освещенности 110 мкмоль фотонов/м²×с.

2.2.2. Поглощение ионов меди и никеля интактными растениями маша и пшеницы

Растения девятидневного возраста переносили на растворы CuCl_2 или NiCl_2 (150 мл) с концентрацией меди(никеля) 10, 50 или 100 мкМ (количество Cu (Ni) на 1

растение см. в таблице 1) и выдерживали в климатической камере 24 ч при непрерывной аэрации растворов. Количество растений (8 – для маша, 10 – для пшеницы) было подобрано таким образом, чтобы сырая масса корней 10-дневных растений (после эксперимента) составляла 1,0–1,2 г. Начальный pH растворов составлял $5,0 \pm 0,1$. Контрольные растения выращивались все 10 дней на низкосолевого питательном растворе. После эксперимента количество Cu и Ni, оставшихся в растворе, снижалось (Таблица 1), и в растворах с исходной концентрацией 10 мкМ было ниже предела обнаружения колориметрическим методом.

Таблица 1. Схема экспериментов по поглощению Cu и Ni интактными растениями маша и пшеницы

Растения	Кол-во растений	Объем раствора CuCl ₂ (NiCl ₂), мл	Исходная концентрация CuCl ₂ (NiCl ₂), мкМ	Исходное количество CuCl ₂ (NiCl ₂) в объеме раствора, мкмоль	Исходное количество Cu (Ni) на 1 растение, мкмоль	Конечное количество CuCl ₂ (NiCl ₂) в объеме раствора, мкмоль
Маш	8	150	10	1,5	0,19	н.о.
	8	150	50	7,5	0,94	0,75 (5,7)
	8	150	100	15	1,88	6,0 (12,6)
Пшеница	10	150	10	1,5	0,15	н.о.
	10	150	50	7,5	0,75	2,9 (4,9)
	10	150	100	15	1,5	9,4 (11,1)

н.о. – ниже предела обнаружения

По истечении 24 часов растения извлекали из раствора, часть опытных растений использовали для выделения КС корней (см. п.2.2.3), а остальные разделяли на надземную часть и корни, взвешивали, а затем высушивали в течение 7 суток в термостате при температуре 60°C, после чего определяли сухую массу и рассчитывали оводненность корней и надземной части (K_{H_2O}) по формуле:

$$K_{H_2O} = \frac{(m_{сыр} - m_{сух})}{m_{сух}} \quad (2.8)$$

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

Высушенные корни и побеги заливали концентрированной азотной кислотой и озоляли при t_{\max} 420°C в течение 8–15 ч в муфельной печи (СНОЛ 3/10-В, Россия). Зола растворяли в концентрированной соляной кислоте, затем раствор разбавляли дистиллированной водой и определяли в нем концентрацию Cu^{2+} или Ni^{2+} колориметрическим методом.

2.2.2.1. Поглощение никеля разным количеством растений маша

9-дневные растения маша, выращенные как указано в п.2.2.1, переносили на 10 мкМ раствор NiCl_2 , $\text{pH}_{\text{исх}}$ 5,0±0,1, и выдерживали в климатической камере 24 ч при непрерывной аэрации растворов. На один и тот же объем раствора NiCl_2 (150 мл) приходилось разное число растений (4, 8 или 12). Анализ содержания Ni проводили как описано в п.2.2.2. Аналогичный эксперимент на пшенице и с CuCl_2 не проводили, т.к. целью было показать, что накопление и, следовательно, токсическое действие металла на растения при его заданной концентрации в растворе снижается при инкубации большего числа растений в заданном объеме, что не зависит от вида растения и металла.

2.2.2.2. Поглощение никеля растениями маша в присутствии ортованадата натрия

Эксперимент по определению «пассивного» поглощения Ni растениями маша в присутствии ортованадата (ингибитора H^+ -АТФаз плазмалеммы Р-типа) был проведен согласно методике, изложенной в работе (Dalir, Khoshgoftarmanesh, 2015). Девятидневные растения маша (8 шт.) инкубировали в течение 24 ч в 150 мл раствора, содержащего 10 мкМ NiCl_2 и 100 мкМ Na_3VO_4 , $\text{pH}_{\text{исх}}$ 5,0±0,1. Прочие экспериментальные условия и анализ содержания Ni совпадали с вышеописанными (п.2.2.2).

2.2.2.3. Поглощение никеля растениями маша с частично отсеченной надземной частью

Данный эксперимент проводили для установления вклада транспирационного тока в поглощение Ni растениями. У девятидневных растений маша (8 шт.) отрезали эпикотиль и листья, а оставшиеся части (гипокотиль и корень) инкубировали в течение 24 ч в 150 мл раствора, содержащего 10 мкМ NiCl₂, рН_{исх} 5,0±0,1. Прочие экспериментальные условия и анализ содержания Ni совпадали с вышеописанными (п.2.2.2).

2.2.3. Выделение клеточных стенок

Выделение клеточных стенок проводили из корней 8 десятидневных растений маша или 10 растений пшеницы, выращенных на растворах с низким содержанием элементов минерального питания («контрольные» растения), или из того же числа растений после экспериментов по поглощению растениями Cu или Ni («опытные» растения, п.2.2.2). У растений отсекали корни, обсушивали фильтровальной бумагой, определяли их сырую массу и проводили выделение КС, как описано в п.2.1.2, но не проводили высушивания образцов КС.

2.2.4. Поглощение ионов меди и никеля изолированными клеточными стенками

Образцы КС выдерживали в течение 24 ч в 150 мл 10, 50 или 100 мкМ раствора CuCl₂ или NiCl₂ (Таблица 2), рН_{исх} 5,0±0,1, при постоянном перемешивании. Затем образцы КС отделяли от раствора, определяли в нем концентрацию ионов Cu²⁺ или Ni²⁺ колориметрическим методом и рассчитывали ионообменную способность КС по формуле (2.6). Затем проводили десорбцию ионов Cu²⁺ (Ni²⁺) как описано в п.2.1.4.

Значения Cu-(Ni)-связывающей способности КС, полученные при измерении сорбции металлов из растворов и последующей десорбции, не отличались в пределах 5%-ной погрешности эксперимента, поэтому были усреднены.

Таблица 2. Схема экспериментов по поглощению Cu и Ni клеточными стенками, изолированными из корней маша и пшеницы

Растения	Количество корней, из которых выделяли КС	Объем раствора CuCl ₂ (NiCl ₂), мл	Начальное количество CuCl ₂ (NiCl ₂) на одно растение, мкмоль	Концентрация CuCl ₂ (NiCl ₂), мкМ
Маш	8 контрольных растений	150	0,19	10
	8 растений после обработки 1	150	0,19	10
	8 контрольных растений	150	0,94	50
	8 растений после обработки 2	150	0,94	50
	8 контрольных растений	150	1,88	100
	8 растений после обработки 3	150	1,88	100
Пшеница	10 контрольных растений	150	0,15	10
	10 растений после обработки 1	150	0,15	10
	10 контрольных растений	150	0,75	50
	10 растений после обработки 2	150	0,75	50
	10 контрольных растений	150	1,5	100
	10 растений после обработки 3	150	1,5	100

После процедуры десорбции КС высушивали при 60 °С в течение 7 суток, измеряли сухую массу КС, а также определяли долю КС ($G_{КС}$) в сухой массе корней по формуле:

$$G_{КС} = (G_{КС} / G_{к}) \times 100 \quad (2.9)$$

где $G_{к}$ – сухая масса корней, $G_{КС}$ – сухая масса изолированных КС корней, г.

2.2.4.1. Поглощение никеля клеточными стенками, выделенными из корней разного количества растений маша

КС были выделены как описано в п.2.2.3 из корней 4, 8 или 12 10-дневных растений маша, выращенных на низкосолевым питательном растворе, и инкубировались 24 ч в 150 мл 10 мкМ раствора NiCl₂ (рН_{исх} 5,0±0,1) при непрерывной аэрации. По

истечении 24 ч образцы КС отделяли от раствора, определяли в нем концентрацию ионов никеля колориметрическим методом и рассчитывали сорбционную способность КС по формуле (2.6).

2.2.4.2. Поглощение никеля клеточными стенками, выделенными из корней маша, в присутствии ортованадата натрия

КС были выделены как описано в п.2.2.3 из корней восьми 10-дневных растений маша, выращенных на низкосолевым питательном растворе, и инкубировались 24 ч в 150 мл раствора, содержащего 10 мкМ NiCl_2 и 100 мкМ Na_3VO_4 , $\text{pH}_{\text{исх}} 5,0 \pm 0,1$, при постоянной аэрации. По истечении 24 ч образцы КС отделяли от раствора, определяли в нем концентрацию ионов никеля колориметрическим методом и рассчитывали сорбционную способность КС по формуле (2.6).

2.2.5. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью программ Microsoft Excel и IBM SPSS Statistics. Приведены средние значения и их стандартные ошибки. Достоверность различий между изучаемыми показателями определяли с помощью двухвыборочного t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Cu- и Ni-связывающая способность изолированных клеточных стенок различных видов растений

Известно, что химический состав клеточной стенки различается в зависимости от вида, органа и ткани растения, и изменяется в процессе онтогенеза (Thompson, Fry, 2000; Ridley et al., 2001; Willats et al., 2001). То же самое относится и к трехмерной структуре полимерного матрикса КС. Однако, разнообразие ионообменных групп в семи изученных нами видах растений ограничивается четырьмя типами, три из которых представляют собой катионообменные группы (карбоксильные группы полигалактуроновой и гидроксикоричных кислот (ПГК и ГКК) и фенольные гидроксильные группы), а четвертый тип представлен анионообменными группами (первичные аминогруппы). При физиологических значениях pH (4–8) только карбоксильные группы диссоциированы и способны принимать участие в реакциях ионного обмена, так как значения pK_a двух других групп лежат вне пределов указанной области pH. Карбоксильные группы ПГК, имеющие $pK_a \sim 4-5$, ионизированы при pH выше 3–6, а карбоксильные группы ГКК с $pK_a \sim 6-7$ – при $pH \geq 5-8$ в зависимости от вида растения (Meuchik, Yermakov, 1999; 2001; Meuchik et al., 2005). Исходя из задач нашей работы, далее мы представляем данные только о содержании этих двух типов групп.

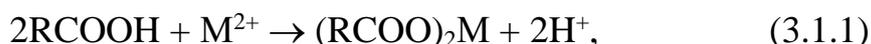
У изученных видов содержание и карбоксильных групп ПГК ($S_{ПГК}$), и карбоксильных групп ГКК ($S_{ГКК}$) значительно различается. $S_{ПГК}$ возрастает в ряду кукуруза < пшеница < шпинат < сведа \approx нут < маш < вика (злаки < маревые < бобовые), тогда как $S_{ГКК}$ – в ряду вика < нут < маш < пшеница < шпинат < кукуруза < сведа (бобовые < злаки \approx маревые; Таблица 3). Следует подчеркнуть, что $S_{ПГК}$ у изученных двудольных (300–600 мкмоль/г сухой массы КС, Таблица 3) близко к содержанию галактуроновой кислоты (325–800 мкмоль/г сухой массы КС) в КС корней *Silene paradoxa* (также двудольное растение; Colzi et al., 2012). Данных по содержанию гидроксикоричных кислот в КС корней растений нам найти не удалось, однако значения этого параметра для других тканей (зерновки пшеницы, мякоть плодов кофе: Rhodes et al., 2002; Torres-Mancera et al., 2011) имеют тот же

порядок, что и установленные нами для КС корней. При этом необходимо отметить, что в указанных работах применялись традиционные методы выделения КС, которые включают стадии деструкции, гомогенизации и обработки органическими реагентами.

Таблица 3. Количество карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты ($S_{\text{ПГК}}$) и гидроксикоричных кислот ($S_{\text{ГКК}}$) в изолированных КС корней исследованных растений. Приведены средние значения и их стандартные отклонения ($n = 3$).

Растение	$S_{\text{ПГК}}$ (мкмоль/г сухой массы КС)	$S_{\text{ГКК}}$ (мкмоль/г сухой массы КС)
Шпинат	303±14	400±15
Сведа	420±50	503±15
Маш	550±45	220±45
Нут	420±40	210±21
Вика	590±50	60±30
Кукуруза	80±20	450±25
Пшеница	120±20	330±25

В этой части работы, помимо определения Cu- и Ni-связывающей способности изолированных КС различных видов растений, нашей задачей было выяснить только ли карбоксильные группы ПГК в составе пектинов участвуют в связывании этих металлов. Для ответа на этот вопрос мы использовали подход, который заключался в том, что, изменяя pH раствора, контактирующего с КС, мы можем следить за участием в ионообменных реакциях функциональных групп, имеющих разное значение pK_a , определяя отношение удвоенного количества адсорбированного металла ($2S_{\text{Cu(Ni)}}$) к количеству карбоксильных групп ПГК ($S_{\text{ПГК}}$), так как две карбоксильные группы связывают один катион двухвалентного металла (M) в соответствии с уравнением:



Если соотношение $2S_{\text{Cu(Ni)}} : S_{\text{ПГК}}$ меньше или равно 1, то в реакции обмена участвуют только карбоксильные группы ПГК, если оно больше единицы, то можно утверждать, что в связывание катионов металлов включаются группы,

отличные от карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты. Необходимо еще раз подчеркнуть, что до настоящей работы считалось, что только карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты принимают участие в связывании и меди, и никеля (Krzesłowska, 2011).

При опубликовании наших результатов этой части работы, часто возникал вопрос: почему мы использовали растворы со столь высокой исходной концентрацией меди и никеля ($C_{\text{исх}} 1 \text{ мМ}$)? Одна из задач нашей работы состояла в том, чтобы прояснить вопрос об участии в связывании меди и никеля карбоксильных групп гидроксикоричных кислот в составе полимеров КС, существование которых было впервые обнаружено в исследованиях, проведенных ранее в нашей лаборатории (Meuchik, Yermakov, 2001). Поскольку суммарное содержание карбоксильных групп в клеточных стенках растений высоко (0,5–1 ммоль на 1 г сухой массы КС, Таблица 3), то и концентрация металла в растворе должна быть высокой (1 мМ) для того, чтобы в его связывании были задействованы все карбоксильные группы. Следует подчеркнуть, что мы могли бы использовать концентрацию металла в растворе в 100 раз меньше (10 мкМ), но тогда и объем раствора, контактирующего с препаратами КС, должен быть в 100 раз больше (1250 мл). Однако в этом случае концентрация металла в растворе после контакта со стенками была бы ниже предела обнаружения металлов для любого из известных методов определения металла в растворе. Таким образом, 1 мМ концентрация металла является необходимой и обоснованной в рамках данного эксперимента.

Следует также отметить, что исследователи часто используют высокую концентрацию металла для обнаружения четкого проявления каких-либо свойств биологических объектов. Например, Kinraide и Yermiyahu (2007) для оценки эффективности деполяризации КС металлами использовали 1 мМ растворы LaCl_3 , а для оценки величин рН растворов солей, контактирующих с сухими корнями – 5 мМ растворы разных металлов, в том числе и меди.

Наши результаты показывают, что способность изолированной КС связывать ионы Cu и Ni из раствора варьирует от 30 до 250 (Ni) и 320 (Cu) мкмоль/г сухой массы КС (Рисунок 6) в зависимости от вида растения и рН раствора. Самые низкие

значения $S_{Cu(Ni)}$ обнаружены у пшеницы и кукурузы, самые высокие – у бобовых (маш, вика, нут), при этом во всех случаях и во всем исследованном дискретном диапазоне pH S_{Cu} значительно выше, чем S_{Ni} (Рисунок 6).

Полученные нами данные о способности КС к адсорбции Cu в целом согласуются с данными других авторов. Так, в КС корней хризантемы (*Chrysanthemum coronarium*) накапливалось до 70 мкмоль Cu/г сухой массы КС, сорго (*Sorghum sudanense*) – 100 мкмоль Cu/г сухой массы КС, плевела (*Lolium multiflorum*) – 30 мкмоль Cu/г сухой массы КС, клевера (*Trifolium pratense*) – 70 мкмоль Cu/г сухой массы КС (Iwasaki et al., 1990; Wei et al., 2008). Однако, Cu-связывающие способности КС корней исследованных нами растений в среднем в два раза выше (Рисунок 6), чем в упомянутых работах, так как в наших экспериментах исходная концентрация Cu в растворах была выше, а для исследования были выбраны другие виды растений. Данных о сорбционной способности растительных КС в отношении ионов никеля почти нет. Она была определена только для КС клеток ксилемы дуба (49 мкмоль Ni/г сухой массы КС при 30 мкМ никеля в растворе, Araújo et al., 2009), и соответствует порядку значений, полученных нами.

У всех исследованных видов $S_{Cu(Ni)}$ значительно зависит от pH раствора (Рисунок 6). С увеличением значений pH от 3–4 до 5 этот показатель возрастает более, чем в 2 раза, а при pH 6,5 достигает значений 200–300 мкмоль Cu и 100–250 мкмоль Ni в расчете на 1 г сухой массы КС в зависимости от вида растения (Рисунок 6).

В не-буферных растворах с исходным значением pH 5 равновесные значения этого показателя изменялись от 3,1 до 3,8 в зависимости от количества поглощенных из раствора ионов Cu или Ni и вида растения (Таблица 4), причем чем больше клеточные стенки адсорбировали Cu^{2+} или Ni^{2+} , тем ниже было значение pH равновесного раствора. Следует подчеркнуть, что для экспериментов мы использовали стандартизованные препараты КС, т.е. все карбоксильные группы полимерного матрикса находились в H^+ -форме. И, таким образом, очевидно, что

наблюдаемые изменения рН вызваны ионообменными реакциями, протекающими в КС в соответствии с уравнением (3.1.1).

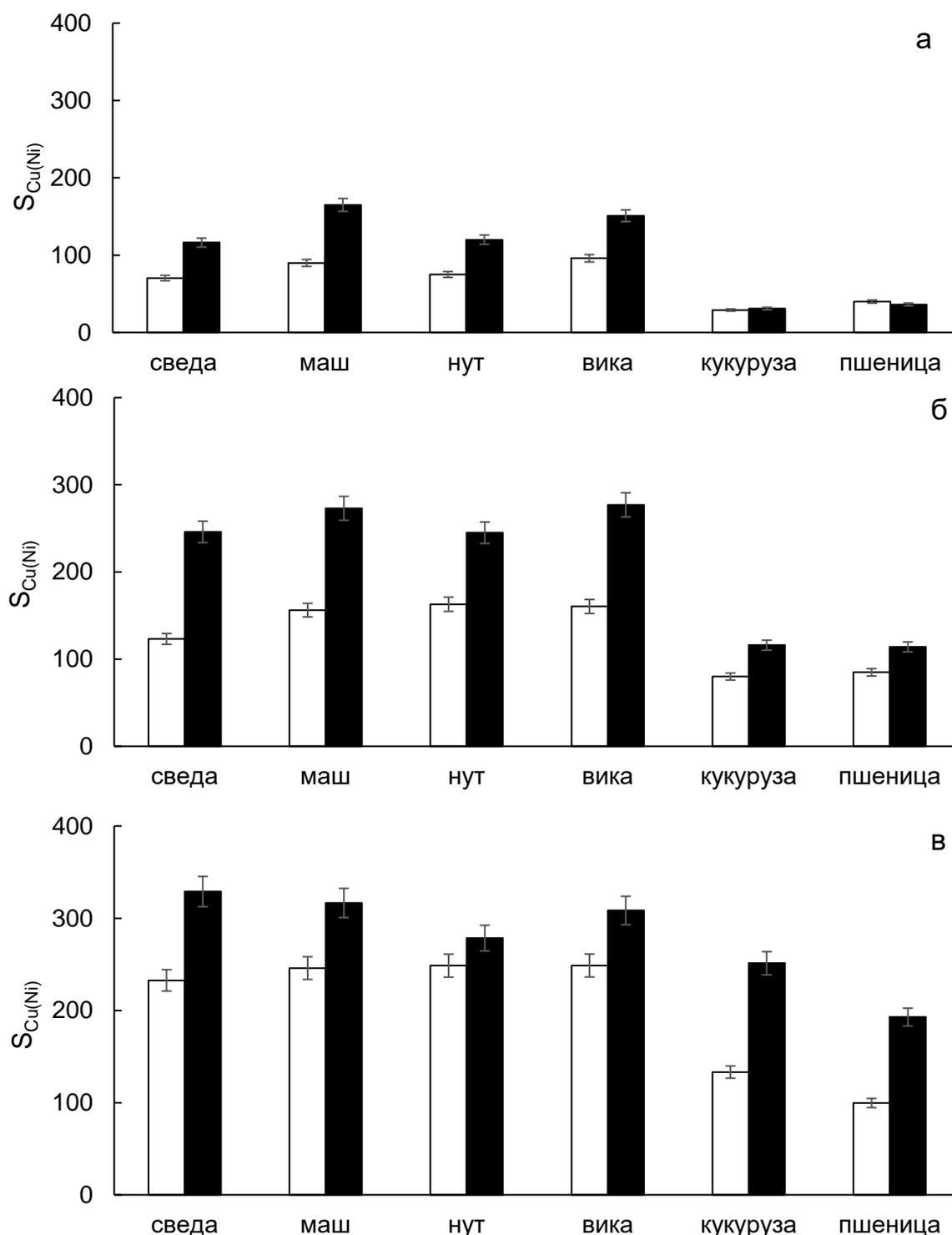


Рисунок 6. Сорбционная способность изолированных КС корней в отношении ионов Cu^{2+} (S_{Cu} (мкмоль/г сухой массы КС) – черные прямоугольники) и Ni^{2+} (S_{Ni} (мкмоль/г сухой массы КС) – белые прямоугольники) при разных рН раствора: а – $\text{pH}_{\text{равн}}$ 3–4; б – $\text{pH}_{\text{равн}}$ 5 (ацетатный буфер); в – $\text{pH}_{\text{равн}}$ 6,5 (аммиачный буфер). Исходная концентрация Cu^{2+} (Ni^{2+}) в растворах – 1 мМ. Приведены средние значения и их стандартные отклонения ($n = 3-5$).

Таблица 4. Значения pH равновесных растворов после инкубации изолированных КС корней в растворах CuCl_2 ($\text{pH}_{\text{равн}}^{\text{Cu}}$) или NiCl_2 ($\text{pH}_{\text{равн}}^{\text{Ni}}$) без буфера с начальным значением pH 5 и исходной концентрацией Cu^{2+} (Ni^{2+}) 1 мМ.

Растение	$\text{pH}_{\text{равн}}^{\text{Cu}}$	$\text{pH}_{\text{равн}}^{\text{Ni}}$
Шпинат	3,28	3,59
Сведа	3,20	3,37
Маш	3,14	3,19
Нут	3,22	3,34
Вика	3,15	3,28
Кукуруза	3,87	4,00
Пшеница	3,86	4,31

Сравнительный анализ данных о $\text{Cu}(\text{Ni})$ связывающей способности КС в небуферных растворах (с $\text{pH}_{\text{исх}}$ 5 и $\text{pH}_{\text{равн}}$ 3–4, Таблица 4) и о содержании в них карбоксильных групп ПГК показывает, что значения $S_{\text{Cu}(\text{Ni})}$ изменяются в том же ряду, что и значения $S_{\text{ПГК}}$ (Таблица 3, Рисунок 6а) и, кроме того, являются взаимозависимыми параметрами. Об этом свидетельствуют коэффициенты корреляции прямолинейных зависимостей $S_{\text{Cu}(\text{Ni})} = f(S_{\text{ПГК}})$ (Рисунок 7; $r^2=0,97$ для меди, $r^2=0,99$ – для никеля). На основании этих результатов и рассчитанных соотношений $Q_{\text{Cu}(\text{Ni})}$ (Таблица 5) можно полагать, что при $\text{pH}_{\text{равн}}$ 3–4 у всех изученных видов в ионообменных реакциях с Cu^{2+} и Ni^{2+} участвуют только карбоксильные группы ПГК. Однако, при указанных значениях pH всего лишь 50–70% данных групп находятся в ионизированном состоянии и способны участвовать в ионообменных реакциях с катионами металлов (Таблица 5).

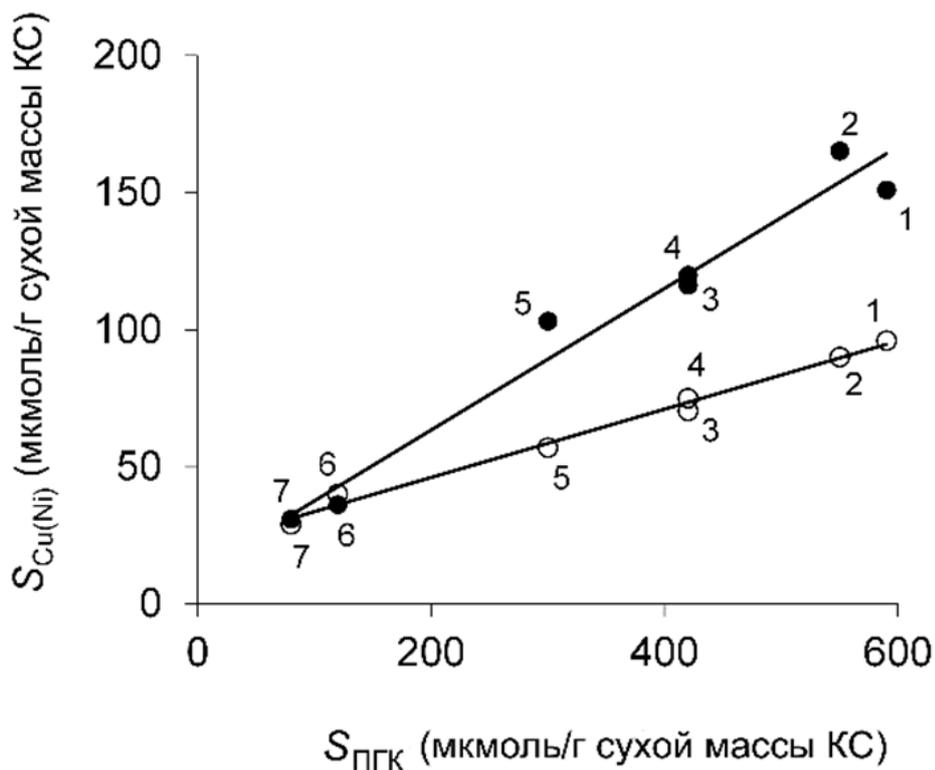


Рисунок 7. Зависимость между сорбционной способностью изолированных КС корней в отношении Cu^{2+} (S_{Cu} , мкмоль Cu/г сухой массы КС – черные точки) и Ni^{2+} (S_{Ni} , мкмоль Ni/г сухой массы КС – белые точки) и содержанием карбоксильных групп ПГК в КС ($S_{\text{ПГК}}$, мкмоль/г сухой массы КС). S_{Cu} и S_{Ni} определены в небуферных растворах ($\text{pH}_{\text{равн}}$ 3–4) с исходной концентрацией Cu^{2+} (Ni^{2+}) 1 мМ. 1 – вика, 2 – маш, 3 – сведа, 4 – нут, 5 – шпинат, 6 – пшеница, 7 – кукуруза. Уравнения линейных зависимостей: $S_{\text{Cu}} = 0,26 \times S_{\text{ПГК}} + 11,7$, $r^2 = 0,970$; $S_{\text{Ni}} = 0,12 \times S_{\text{ПГК}} + 21,2$, $r^2 = 0,990$, где r – коэффициент корреляции.

Таблица 5. Отношение $Q_{Cu(Ni)}=2 \times S_{Cu(Ni)} / S_{ПГК}$, где $S_{Cu(Ni)}$ – количество Cu(Ni), связанного изолированными КС корней при различных pH раствора (мкмоль/г сухой массы КС), $S_{ПГК}$ – содержание карбоксильных групп ПГК в КС (мкмоль/г сухой массы КС).

Растение	pH 3–4		pH 5		pH 6,5	
	Q_{Cu}	Q_{Ni}	Q_{Cu}	Q_{Ni}	Q_{Cu}	Q_{Ni}
Шпинат	0,69	0,41	1,60	-	1,80	-
Сведа	0,55	0,34	1,20	0,59	1,60	1,10
Маш	0,60	0,35	1,00	0,57	1,20	0,90
Нут	0,57	0,43	1,10	0,78	1,30	1,20
Вика	0,51	0,33	0,95	0,54	1,20	0,84
Кукуруза	0,77	0,72	2,90	2,00	6,30	3,30
Пшеница	0,60	0,67	1,60	1,40	2,80	1,70

Широко известно, что способность КС к адсорбции двух- и трехвалентных катионов металлов главным образом определяется количеством пектинов, в первую очередь гомогалактуронанов (Krzesłowska, 2011). К примеру, было показано, что в КС корней металлофитного папоротника *Lygodium japonicum* медь накапливается в пектиновой фракции, и по крайней мере 60% ионов Cu^{2+} прочно связаны с гомогалактуронанами (Konno et al., 2005). Положительная корреляция между накоплением меди и количеством пектинов и урсонических кислот в их составе была обнаружена также для *Silene paradoxa* (Colzi et al., 2012) и *Chrysanthemum coronarium* (Wei et al., 2008). Наши результаты полностью согласуются с известными представлениями о ведущей роли пектинов в связывании ионов ТМ. Так, нами показано, что бобовые растения имеют и самое высокое содержание карбоксильных групп ПГК в КС (Таблица 3), и самую высокую Cu- и Ni-связывающую способность КС (Рисунок 6). У злаков, напротив, и тот, и другой показатель наименьшие. Полученные нами данные согласуются с известными данными о высоком содержании пектинов в КС бобовых (например, до 40% массы КС у гороха – Talbot, Ray, 1992) и их низком содержании в стенках злаковых растений (Vogel, 2008).

При $pH_{равн}$ 5 (ацетатный буфер) степень диссоциации карбоксильных групп ПГК возрастает (Meuchik, Yermakov, 2001), что приводит к увеличению Cu^{2+} - и Ni^{2+} -связывающей способности КС по сравнению с таковой при $pH_{равн}$ 3–4 (Рисунок 6б). При $pH_{равн}$ 5 тип ионообменных групп, связывающих Cu^{2+} и Ni^{2+} , зависит от металла и вида растения. У бобовых как медь, так и никель связываются только карбоксильными группами ПГК, при этом в адсорбции Cu^{2+} задействованы все группы данного типа ($Q_{Cu} \sim 1$, Таблица 5), а в адсорбции Ni^{2+} – только 50–80%, что может быть связано с более высокой стабильностью комплексов Cu^{2+} -пектин, чем Ni^{2+} -пектин (Davarski et al., 1994; Cataldo et al., 2012). У сведы и шпината Ni -связывающая способность КС определяется только наличием в них карбоксильных групп ПГК ($Q_{Ni} < 1$, Таблица 5), а в связывании Cu^{2+} участвуют и карбоксильные группы ПГК, и ГКК ($Q_{Cu} > 1$, Таблица 5). У злаков обе карбоксильные группы полимерного матрикса КС принимают участие в связывании и меди, и никеля при $pH_{равн}$ 5 ($Q_{Cu(Ni)} > 1$, Таблица 5).

Повышение $pH_{равн}$ до 6,5 (сорбция в аммонийном буфере) приводит к дальнейшему возрастанию способности КС связывать ионы меди и никеля (Рисунок 6в). В этих условиях у всех исследованных растений помимо карбоксильных групп ПГК в связывание меди вовлекаются карбоксильные группы ГКК, о чем свидетельствуют соотношения между количеством связанной меди и содержанием карбоксильных группы ПГК ($Q_{Cu} > 1$, Таблица 5). В связывании ионов Ni у маша и вики участвуют только карбоксильные группы ПГК, так как $Q_{Ni} < 1$ (Таблица 5). У всех других исследованных растений оба типа карбоксильных групп принимают участие в этом процессе ($Q_{Ni} > 1$, Таблица 5).

Приведенные выше данные доказывают полученные ранее результаты о существовании в КС корней исследованных растений второго типа карбоксильных групп, принадлежащих гидроксикоричным кислотам (Meuchik, Yermakov, 1999, 2001; Meuchik et al., 2005) и принимающих участие в ионообменных реакциях при физиологических значениях pH в апопласте.

Никель и медь занимают соседствующее положение в периодической таблице Менделеева. Такое расположение в некоторой степени определяет их

близкие физические и химические свойства. Однако сравнительный анализ наших результатов показывает, что для исследованных растений Cu-связывающая способность КС значительно выше, чем Ni-связывающая способность во всем исследуемом дискретном диапазоне pH (кроме КС злаков при $pH_{равн}$ 3–4, Рисунок 6(a)). Эти результаты могут быть рассмотрены с позиций концепции жёстких и мягких кислот и оснований, качественно описывающей способность кислот и оснований Льюиса к эффективному взаимодействию. В соответствии с данным принципом, кислоты и основания Льюиса делятся на жёсткие, мягкие и промежуточные, причём мягкие кислоты преимущественно реагируют с мягкими основаниями, а жёсткие кислоты – с жёсткими основаниями. Было показано, что клеточные стенки относятся к жестким лигандам в отношении связывания металлов, потому что они обогащены донорными кислородсодержащими группировками, такими как карбоксильные, карбонильные и гидроксильные группы (Kinraide, Yermiyahu, 2007; Kinraide, 2009). Указанные авторы предложили шкалу силы относительного связывания ионов металлов с жесткими лигандами, которую они характеризовали величиной $\log K_{Scale}$ (таблица 2 из Kinraide, Yermiyahu, 2007), и показали, что значение этого параметра составляет 2,66 для Cu^{2+} и 2,21 для Ni^{2+} . Используя эти значения, можно оценить, насколько будут отличаться адсорбционные способности КС исследуемых нами растений в отношении ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} , так как чем выше значение $\log K_{Scale}$, тем выше адсорбционная способность (рисунок 5a из Kinraide, Yermiyahu, 2007). Расчеты показывают, что различие в Cu- и Ni-связывающей способности КС должны составлять менее 20%. Таким образом, рассмотрение различий в связывании ионов меди и никеля клеточными стенками с позиций шкалы относительной прочности связывания ионов металлов с жесткими лигандами не объясняет тех больших различий (до 100%) между Cu- и Ni-связывающей способностью КС, которые мы наблюдали в наших экспериментах. Поэтому мы полагаем, что существует некий компонент полимерного матрикса КС, который облегчает связывание ионов меди с карбоксильными группами. Можно полагать, что этот компонент образует с металлом не ионную, а координационную связь, что изменяет конформацию

полимерных цепей матрикса, и таким образом создает благоприятные условия для взаимодействия двух карбоксильных групп и иона Cu^{2+} . Кандидатами на такую роль могут быть аминокислоты, не входящие в состав структурных белков. Ранее было показано, что КС корней характеризуются высоким содержанием свободных аминогрупп (20–50%, с самым высоким содержанием у злаков; Мейчик и др., 2009а), которое значительно превышает количество свободных аминогрупп в белках КС (~10%, Doblin et al., 2010). Было высказано предположение, что КС корней растений содержат аминокислотные остатки, не участвующие в образовании пептидной связи и принадлежащие, вероятно, оксиаминокислотам (серину и треонину), которые по гидроксильной группе связаны с углеводной частью гликопротеина или другого структурного полимера (Мейчик и др., 2009а). При pH 3–6 эти аминогруппы находятся в цвиттерионной форме и, таким образом, не могут образовывать ионных связей с Cu^{2+} . Кроме того, известно, что аминокислотные остатки, ковалентно связанные с нерастворимым полимером, могут образовывать комплексы с медью и никелем, при этом лиганд связывает ионы меди более прочно, чем ионы никеля, так как константа образования комплексов азотсодержащих соединений с медью на два порядка величин выше, чем таковая для никеля (Либинсон, 1969). На основании этих данных и результатов настоящей работы мы пришли к заключению, что более высокая способность клеточных стенок к адсорбции ионов Cu^{2+} по сравнению с Ni^{2+} может быть обусловлена связыванием Cu^{2+} с остатками оксиаминокислот в составе КС.

Таким образом, нами установлено, что Cu- и Ni-связывающая способность изолированных КС изменяется в зависимости от вида растения и от pH раствора. При $\text{pH} < 5$ количество ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} , адсорбированных клеточными стенками корней всех исследованных видов растений, меньше по сравнению с количеством карбоксильных групп ПГК. При $\text{pH} \geq 5$ отношение $2 \times S_{\text{Cu(Ni)}} / S_{\text{ПГК}}$ выше единицы для некоторых видов, что свидетельствует об участии карбоксильных групп ГКК в связывании меди и никеля в КС.

3.2. Поглощение меди растениями маша и пшеницы и изолированными из их корней клеточными стенками

3.2.1. Влияние повышенных концентраций Cu в среде на некоторые показатели роста растений. Накопление Cu растениями маша и пшеницы при разных концентрациях Cu в растворе

Сухая масса корней исследуемых растений по-разному изменялась в ответ на увеличение концентрации меди (C_{Cu}) в среде (Таблица 6). У маша при увеличении C_{Cu} до 10 мкМ этот показатель возрастал на 12%, а затем с увеличением концентрации Cu^{2+} постепенно снижался. При C_{Cu} 100 мкМ снижение было наибольшим и достигало 24%. У пшеницы при C_{Cu} 50 мкМ и ниже сухая масса корней оставалась неизменной, а при 100 мкМ снижалась на 15% по сравнению с контролем. Прирост корней за 24 ч (по сухой массе) был значимым только для маша, а именно для контрольных растений ($\Delta=0,7$ мг) и растений при C_{Cu} 10 мкМ ($\Delta=1,5$ мг). После обработки 100 мкМ Cu у маша сухая масса корней была на 1,1 мг ниже, чем у 9-дневных растений. У пшеницы прироста корней не наблюдалось при 50 и 100 мкМ Cu в среде. У обоих видов растений сухая масса побегов не изменялась по сравнению с контролем во всем исследуемом диапазоне концентраций меди в растворе. Значительный суточный прирост наблюдался для побегов маша во всех обработках (Таблица 6).

У пшеницы оводненность корней не изменялась (Таблица 7), а у маша возросла на 9,9% при C_{Cu} 50 мкМ, и на 18,9% – при 100 мкМ (Таблица 7). В надземных частях обоих растений этот показатель достоверно не изменялся. При C_{Cu} 10 мкМ доля КС от сухой массы корней у маша снизилась на 8%, но увеличилась при 50 и 100 мкМ на 21 и 34%, соответственно, по сравнению с контрольными растениями. В корнях пшеницы этот показатель не зависел от концентрации меди в растворе (Таблица 7).

Таблица 6. Сухая масса корней (m_k) и побега (m_n) одного растения маша и пшеницы: 9-дневных растений, 10-дневных контрольных и после обработок растворами $CuCl_2$ различной концентрации (C_{Cu}). Приведены средние значения и их стандартные ошибки ($n=12$). Внутри одного столбца средние с одинаковыми буквенными индексами достоверно не отличаются (при $p<0,05$).

C_{Cu} (мкМ)	Маш		Пшеница	
	m_k (мг)	m_n (мг)	m_k (мг)	m_n (мг)
0,5 (9-дн. растения)	6,59±0,12 ^a	25,61±0,45 ^a	7,34±0,33 ^{ab}	14,06±0,53 ^a
0,5	7,28±0,22 ^b	27,15±1,90 ^b	8,12±0,35 ^a	14,77±0,26 ^a
10	8,16±0,30 ^b	30,98±1,75 ^b	7,43±0,40 ^{ab}	15,37±0,39 ^a
50	6,66±0,33 ^a	30,56±2,50 ^b	7,10±0,51 ^{ab}	14,53±0,35 ^a
100	5,53±0,21 ^г	28,53±2,02 ^b	6,92±0,40 ^b	14,73±0,42 ^a

Таблица 7. Оводненность корней (K_k) и побегов (K_n) и доля КС от сухой массы корней (G) растений маша и пшеницы после 24 ч поглощения Cu из растворов разной концентрации. Приведены средние значения и их стандартные ошибки ($n=12$). Значения, отмеченные звездочкой (*), достоверно отличаются от соответствующих значений для контрольных растений (при $p<0,05$).

C_{Cu} (мкМ)	Маш			Пшеница		
	K_k (г H_2O /г сухой массы корней)	G (%)	K_n (г H_2O /г сухой массы побегов)	K_k (г H_2O /г сухой массы корней)	G (%)	K_n (г H_2O /г сухой массы побегов)
0,5	20,5±0,3	46,6±0,7	11,6±0,3	12,3±0,3	62,9±1,0	6,74±0,07
10	20,5±0,34	43,1±0,9*	11,3±0,3	12,1±0,3	59,2±3,2	6,74±0,14
50	22,5±0,8*	54,4±1,4*	11,0±0,4	11,8±0,4	58,8±1,1	6,54±0,14
100	24,4±0,6*	57,5±3,3*	11,3±0,4	11,80±0,3	63,8±1,3	6,45±0,15

С увеличением концентрации меди от 0,5 до 100 мкМ содержание меди в корнях исследуемых растений увеличивалось (Рисунок 8) и при C_{Cu} 100 мкМ было приблизительно в 35 и в 110 раз больше в корнях пшеницы и маша по сравнению с контролем, соответственно. В надземных частях растений содержание меди также увеличивалось, но по сравнению с корнями увеличение было незначительным и составляло при C_{Cu} 10, 50 и 100 мкМ соответственно 1–1,5, 3 и 5 раз по отношению

к контролю как для пшеницы, так и для маша, независимо от того на сырую или сухую массу корней производился расчет. Максимальное содержание Cu (при C_{Cu} 100 мкМ) в побегах маша составляло 1,62 мкмоль/г сухой массы, побегах пшеницы – 1,16 мкмоль/г сухой массы.

При всех обработках исследуемые растения значительно различались по количеству накопленной меди в корнях. В расчете на сухую массу корни растений маша при C_{Cu} 10 мкМ накапливали в 2,1–2,7 раза больше Cu, чем корни пшеницы, и различие возрастало с увеличением концентрации меди в растворе (Рисунок 8).

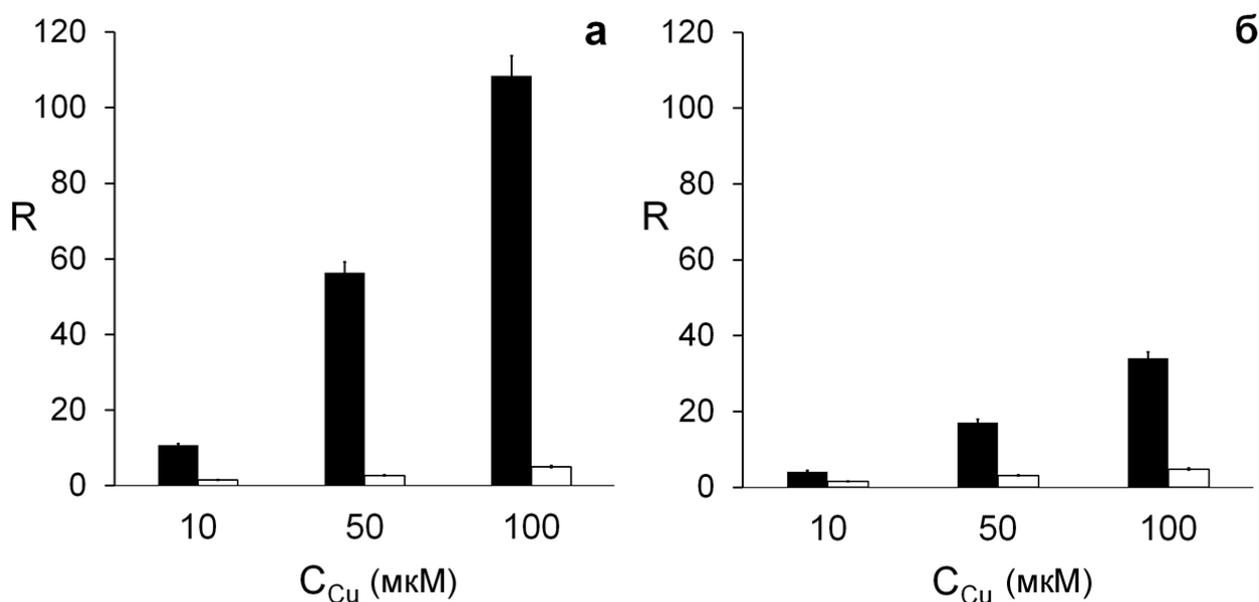


Рисунок 8. Содержание меди в корнях (черные прямоугольники) и побегах (белые прямоугольники) растений маша (а) и пшеницы (б) после 24 ч поглощения Cu. R – отношение количества Cu в органах обработанных и контрольных растений (в расчете на сухую массу). Приведены средние значения и их стандартные ошибки (n=6–10).

Поскольку сырая и сухая массы, а также оводненность тканей растений обоих видов не отличались от контроля после 24 ч обработки 10 мкМ Cu (Таблицы 6 и 7), можно заключить, что данная концентрация металла не является стрессовой для исследуемых растений (при соответствующем объеме раствора и количестве растений). У маша даже наблюдался прирост сухой массы корня по сравнению с 9-дневными растениями. Однако, при C_{Cu} 50 и 100 мкМ у этого вида наблюдалось

значительное снижение массы корней по сравнению с контролем. При 100 мкМ Cu имел место некроз корней, сопровождавшийся их разрушением и потерей массы по сравнению с 9-дневными растениями (Таблица 6). Эти результаты подтверждают вывод о том, что маш более чувствителен к Cu, чем пшеница, как ранее показали Lee et al. (2008), и соотносятся с отмеченным ранее сильным повреждением корней других видов при избытке меди в среде (Peng et al., 2005; Kopittke, Menzies, 2006).

Во всех обработках увеличение содержания Cu было более резким в подземной, чем в надземной части как для маша, так и для пшеницы (Рисунок 8). Преобладающее накопление меди в корнях было показано для многих растений (Taylor, Foy, 1985; Ouzounidou et al., 1995; Kopittke, Menzies, 2006; Lequeux et al., 2010). Отсутствие значительного снижения массы корней (Таблица 6) и симптомов хлороза свидетельствуют о том, что 24 ч контакта с Cu недостаточно для проявления ее токсического действия в побегах, хотя у обоих видов содержание Cu на единицу сухой массы надземной части выше, чем у контрольных растений (при 50 и 100 мкМ Cu в среде). Следует отметить, что в других работах межжилковый хлороз наблюдался у растений при большем содержании меди в среде (в расчете на одно растение) и более длительном воздействии (от 8 суток; см., напр., Kopittke, Menzies, 2006; Michaud et al., 2008; Bravin et al., 2010).

Также отметим, что не только концентрацию металла в среде, но и соотношение между объемом раствора и количеством растений в сосуде необходимо принимать во внимание при сравнении результатов разных экспериментов. Так, ранее было показано, что рост корней и побегов *Vigna unguiculata* ингибируется при выращивании растений в течение 14 суток в 22-литровых контейнерах с питательным раствором с постоянной $C_{Cu} \sim 1,7$ мкМ (Kopittke, Menzies, 2006). В данном случае на одно растение приходилось 9,35 мкмоль Cu (объем раствора $\times C_{Cu}$ / количество растений в сосуде). В наших экспериментах на одно растение приходилось в среднем в 50, 10 или 5 раз меньше Cu, а также была меньше продолжительность обработки.

3.2.2. Адсорбция Си изолированными КС корней маша и пшеницы при разных концентрациях Си в растворе

Также как в корнях интактных растений, в КС обоих видов наблюдалось увеличение содержания меди при возрастании ее концентрации в растворе. При изменении концентрации Си в растворе от 10 до 50 мкМ Си-связывающая способность КС корней увеличивается в 5,3 и 2,5 раза для маша и пшеницы, соответственно (Рисунок 9). При всех концентрациях Си-связывающая способность КС корней маша была выше по сравнению с КС пшеницы. Кроме того, различия между видами в накоплении Cu^{2+} в КС корней возрастали с концентрацией и составляли 1,9 (при C_{Cu} 10 мкМ), 4,0 (C_{Cu} 50 мкМ) и 4,7 (C_{Cu} 100 мкМ) раза в расчете на сухую массу корней или КС (Рисунок 9).

Анализ данных о сравнительной оценке адсорбции меди клеточными стенками исследуемых растений показывает, что важно правильно выбирать единицы измерения при сравнении металлсвязывающей способности КС, особенно при небольших концентрациях ТМ в растворе. Так, например, при C_{Cu} 10 мкМ количество меди, связанной КС пшеницы в расчете на сырую массу корней, в 1,3 раза больше, чем у маша, а при расчете на сухую массу, наоборот, у маша этот показатель в 1,4 раза больше, чем у пшеницы. Такие различия в сравнительных оценках при расчетах на разные единицы обусловлены значительными отличиями в оводненности тканей корней исследуемых растений (Рисунок 9, Таблица 7).

Си-связывающая способность изолированных КС корней значительно отличается между исследованными видами (Рисунок 9). Так как рН исходных растворов составлял 5,0–5,5, можно полагать, что разница в значениях S_{Cu} преимущественно обеспечивается разным содержанием карбоксильных групп ПГК, которые, в основном, включаются в ионообменные процессы при данных значениях рН. Тот факт, что КС бобовых растений содержат в 2–7 раз больше этих групп, чем КС злаков (Таблица 3; Meuchik, Yermakov, 1999; Vogel, 2008), объясняет более высокую Си-связывающую способность клеточных стенок маша по сравнению с пшеницей.

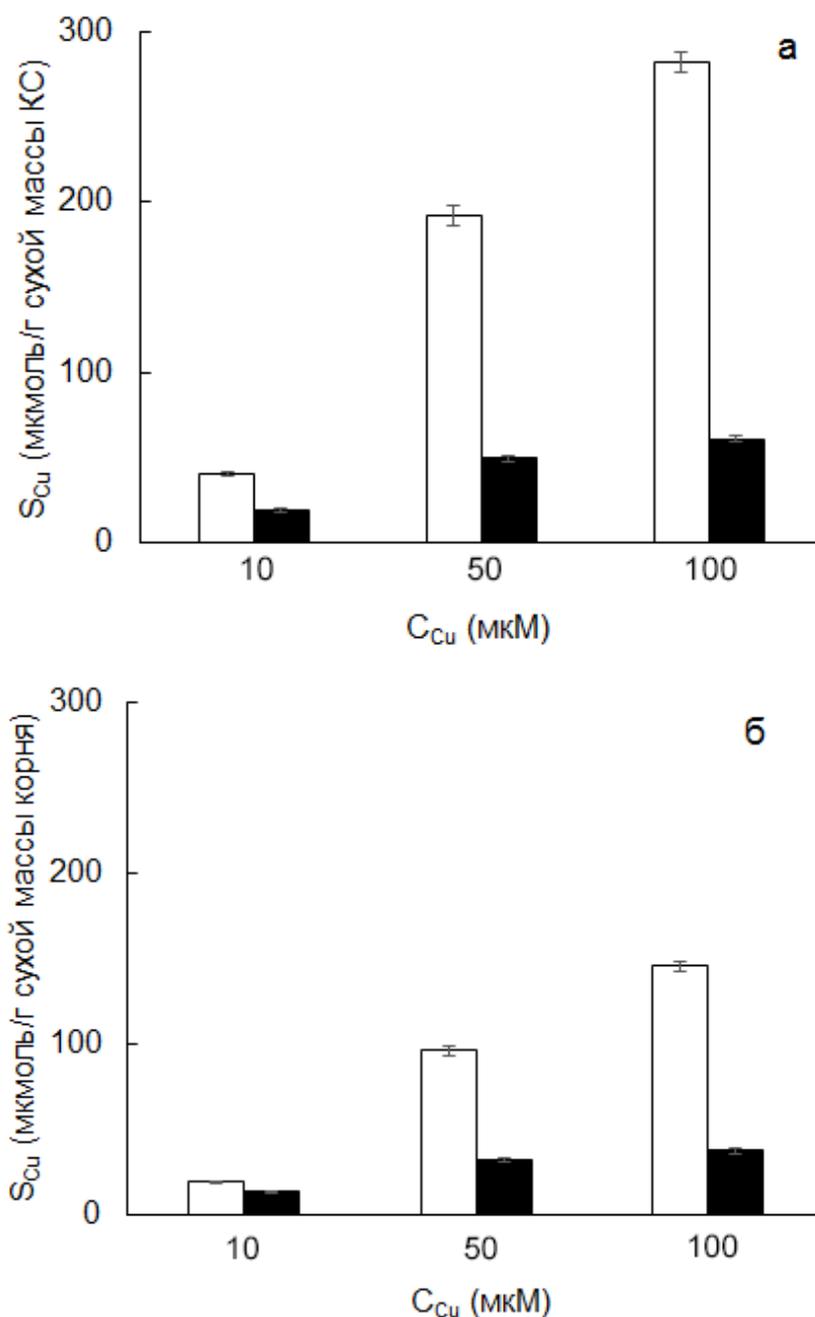


Рисунок 9. Содержание меди, выраженное в расчете на 1 г сухой массы клеточных стенок (а) и на 1 г сухой массы корней (б), в изолированных клеточных стенках корней мasha (белые прямоугольники) и пшеницы (черные прямоугольники) после 24 ч сорбции из растворов с разной начальной концентрацией Cu . КС были выделены из контрольных растений (не подвергавшихся воздействию Cu). Приведены средние значения и их стандартные ошибки ($n=5-9$).

Таблица 8. Содержание карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты ($S_{\text{ПГК}}$) и гидроксикоричных кислот ($S_{\text{ГКК}}$), Cu-связывающая способность КС корней маша и пшеницы (S_{Cu}) и соотношение содержания Cu и карбоксильных групп ПГК в КС ($Q_{\text{Cu}} = 2 \times S_{\text{Cu}} / S_{\text{ПГК}}$). Приведены средние значения и их стандартные ошибки ($n=5-10$). КС были выделены из контрольных растений (не подвергавшихся воздействию Cu).

	$S_{\text{ПГК}}$ (мкмоль/г сухой массы КС)	$S_{\text{ГКК}}$ (мкмоль/г сухой массы КС)	C_{Cu} (мкМ)	S_{Cu} (мкмоль/г сухой массы КС)	Q_{Cu}
Маш	550±45	220±45	10	40,3±1,4	0,15
			50	191,8±5,7	0,70
			100	282,4±5,9	1,03
Пшеница	90±20	350±25	10	23,7±1,2	0,53
			50	55,0±1,8	1,22
			100	62,5±1,8	1,38

Как показано в Таблице 8, содержание групп ПГК и ГКК у маша в 6,1 выше и 1,6 раз ниже, чем у пшеницы, соответственно. Вклад этих групп различается в зависимости от вида растения и концентрации металла в растворе. У маша при всех концентрациях в связывании ионов меди участвуют только карбоксильные группы ПГК, при этом при 10 мкМ Cu в среде только 15% этих групп задействовано в связывании металла. При 50 и 100 мкМ Cu данный показатель возрастает до 70 и 100%, соответственно.

При C_{Cu} 10 мкМ у пшеницы, как и у маша, в связывании Cu принимают участие только карбоксильные группы ПГК, но доля этих групп, «занятых» ионами Cu^{2+} , выше, чем у маша и составляет около 50%. В отличие от маша, у пшеницы при 50 и 100 мкМ Cu в растворе помимо карбоксильных групп ПГК в связывание меди вовлекаются и карбоксильные группы ГКК, которые связывают 8 и 26% ионов меди в КС, соответственно (расчет по данным из Таблицы 8). В КС корней пшеницы содержание карбоксильных групп ГКК превышает таковое для ПГК, и поэтому данный тип групп вносит существенный вклад в связывание ионов меди при C_{Cu} 100 мкМ. Тем не менее, можно заключить, что карбоксильные группы ПГК

в составе пектинов являются основными сайтами связывания ионов меди в КС корней маша, и пшеницы. Преимущественное связывание Cu с пектиновыми веществами ранее было показано для КС корней как устойчивых к Cu-стрессу растений (Konno et al., 2010), так и чувствительных к нему (Kopittke et al., 2011).

Поскольку показано, что S_{Cu} изменяется в том же ряду, что и $S_{ПГК}$ (раздел 3.1, Рисунок 7), а карбоксильные группы ПГК являются основным сайтом связывания ионов меди, можно заключить, что разные значения S_{Cu} отражают разное содержание этих групп в КС и/или степень их метилирования. Следовательно, по изменению Cu-связывающей способности КС возможно сделать заключение об изменении состава пектинов, не проводя прямого измерения содержания карбоксильных групп ПГК. Поэтому мы провели эксперименты по определению S_{Cu} КС, выделенных из корней растений после 24-часовой экспозиции на растворах с 10, 50 или 100 мкМ $CuCl_2$ («опытных растений»). Было обнаружено, что в зависимости от концентрации меди в среде выращивания растений и среде инкубации КС Cu-связывающая способность КС корней растений изменялась по-разному. Поэтому рассмотрим каждую концентрацию Cu в растворах отдельно.

10 мкМ Cu в среде

Клеточные стенки, выделенные из корней растений маша после обработки 10 мкМ Cu, обладали значительно меньшей медь-связывающей способностью при сорбции из растворов этой же концентрации, чем КС контрольных растений в расчете и на сухую массу корней, и на сухую массу КС (Таблица 9). Доля КС в общей массе корней также была ниже, чем в контроле (Таблица 7).

Можно предположить, что в ответ на присутствие 10 мкМ Cu в среде выращивания, в КС корней маша или уменьшается содержание карбоксильных групп ПГК, или возрастает степень их метилирования. Исходя из данных о снижении Cu-связывающей способности КС на 15% и доли КС на 7,5%, можно

Таблица 9. Cu-связывающая способность КС (S_{Cu}), выделенных из корней контрольных и опытных растений маша, в расчете на сухую массу корней и на сухую массу КС при разных концентрациях меди в растворе (C_{Cu}). Приведены средние значения и их стандартные ошибки ($n=15$). Значения S_{Cu} КС опытных растений, достоверно (при $p<0,05$) отличающиеся от S_{Cu} КС контрольных растений, обозначены звездочкой.

C_{Cu} (мкМ)	КС выделены из:	S_{Cu} (мкмоль/г сухой массы корней)	S_{Cu} (мкмоль/г сухой массы КС)
10	контрольных растений	19,0±0,8	40,2±1,4
	после обработки 10 мкМ Cu	14,9±0,4*	34,3±0,8*
50	контрольных растений	96,1±2,7	191,8±5,7
	после обработки 50 мкМ Cu	109,2±4,5*	197,4±5,2
100	контрольных растений	145,3±3,0	282,4±5,9
	после обработки 100 мкМ Cu	171,1±13,6*	284,2±14,4

заклучить, что обе эти стратегии изменения состава КС корней реализуются у маша при обработке 10 мкМ Cu. Ранее такой тип ответа был обнаружен у устойчивых к воздействию повышенных концентраций меди растений-накопителей Cu *Athyrium yokoscense* и *Silene paradoxa* (Konno et al., 2010; Colzi et al., 2012). Colzi с соавторами (2012) предположили, что следствием такого ответа было снижение накопления Cu как в апопласте, так и в симпласте корней *Silene paradoxa*. По-видимому, при нетоксичной для растений маша концентрации Cu 10 мкМ (т.к. имеет место прирост сухой массы корней, см. Таблицу 6) происходит модификация состава полимеров КС, направленная на ограничение накопления Cu в корнях. Следует отметить, что несмотря на то, что всего лишь около 15%

карбоксильных групп ПГК занято ионами Cu (Таблица 8), в КС маша происходят изменения, направленные на снижение содержание этого токсичного металла в корнях.

Сравнение Cu-связывающей способности КС корней у опытных и контрольных растений пшеницы показывает, что в ответ на воздействие этого металла в концентрации 10 мкМ не происходит изменений ни в содержании карбоксильных групп ПГК, ни в доле КС от сухой массы корней по сравнению с контролем (Таблица 10). Но, по сравнению с растениями маша, у пшеницы выше степень заполнения КС ионами Cu (~40%, Таблица 8) при этих условиях.

Таблица 10. Cu-связывающая способность КС (S_{Cu}), выделенных из корней контрольных и опытных растений пшеницы, в расчете на сухую массу корней и на сухую массу КС, при разных концентрациях меди в растворе (C_{Cu}). Приведены средние значения и их стандартные ошибки (n=10). Значения S_{Cu} КС опытных растений достоверно (при $p < 0,05$) не отличались от S_{Cu} КС контрольных растений.

C_{Cu} (мкМ)	КС выделены из	S_{Cu} (мкмоль/г сухой массы корней)	S_{Cu} (мкмоль/г сухой массы КС)
10	контрольных растений	13,3±0,8	23,7±1,2
	после обработки 10 мкМ Cu	11,3±0,7	18,5±1,2
50	контрольных растений	32,1±1,3	55,0±1,8
	после обработки 50 мкМ Cu	29,1±1,8	49,1±3,3
100	контрольных растений	37,6±1,6	62,5±1,8
	после обработки 100 мкМ Cu	38,9±1,9	61,5±2,5

50 и 100 мкМ Cu

У растений маша после обработки 50 и 100 мкМ Cu и доля КС в сухой массе корней (Таблица 7), и S_{Cu} КС в расчете на сухую массу корней (Таблица 9) была выше, чем в контроле. Однако в расчете на сухую массу стенки Cu-связывающая способность КС опытных и контрольных растений достоверно не отличалась, что свидетельствует об отсутствии изменений в степени метилирования карбоксильных групп ПГК. Следовательно, различия в Cu-связывающей способности в расчете на сухую массу корней обусловлены исключительно возрастанием доли КС в сухой массе корней. Эти результаты показывают, что кроме упомянутых выше стратегий устойчивости к Cu-стрессу через модификацию состава полимеров КС, направленную на ограничение накопления Cu в корнях, у маша реализуется еще одна неизвестная ранее стратегия, заключающаяся в усилении в равной мере биосинтеза всех компонентов КС, в том числе и пектинов с той же степенью метилирования, как и у контрольных растений. Увеличение доли КС в сухой массе корней, возможно, наряду с выявленной ранее в ответ на избыток Cu усиленной вакуолизацией клеток корня (Ouzounidou et al., 1995), может являться причиной высокой оводненности корней маша при S_{Cu} 100 мкМ (Таблица 7).

Увеличение содержания пектинов с низкой степенью метилирования в КС корней ранее было установлено как для устойчивых (Konno et al., 2005; Liu et al., 2014), так и для чувствительных (Colzi et al., 2012) к Cu-стрессу растений. В то же время известно, что родственной машу коровий горох (*Vigna unguiculata*) не проявляет устойчивости к Cu (Kopittke, Menzies, 2006). Поэтому мы предполагаем, что увеличение доли КС и ее S_{Cu} при S_{Cu} 50 и 100 мкМ являются симптомами токсического действия этого ТМ, и могут приводить к снижению массы корней маша, так как было показано, что связывание Cu с КС повышает ее жесткость и снижает способность к растяжению (Kopittke et al., 2008). Несмотря на значительное снижение массы корней маша, и, вероятно, их разрушение при S_{Cu} 100 мкМ, накопление меди в корне предотвращает развитие токсических симптомов в побегах, о чем свидетельствует значимый прирост массы надземной части при всех исследованных концентрациях меди (Таблица 6).

Сравнение S_{Cu} КС корней опытных и контрольных растений пшеницы показывает, что у первых не изменяется $S_{ПК}$ в ответ на воздействие 50 и 100 мкМ Cu (Таблица 10). Также у этого вида не возрастает доля КС от сухой массы корней по сравнению с контролем (Таблица 7).

3.2.3. Вклад клеточных стенок в поглощение Cu корнями мasha и пшеницы

У обоих видов количество адсорбированной клеточными стенками меди было примерно равным общему количеству меди, накопленной в корнях растений, за исключением пшеницы при S_{Cu} 100 мкМ, когда в КС было связано 60% от общего количества меди, накопленного в корнях (Рисунок 10). При 10 мкМ Cu в среде КС корней и мasha, и пшеницы способны связать всю медь, поступившую в ткани корня, так как отсутствуют достоверные отличия между количеством Cu, связанной корнями и изолированными КС (в расчете на сухую массу корней, Рисунок 10). Эти результаты дают нам основание заключить, что в данных условиях эксперимента (при определенном соотношении объема раствора с S_{Cu} 10 мкМ и количестве растений) основным механизмом защиты от Cu-стресса у исследуемых растений является депонирование Cu^{2+} в КС клеток корня. Эти выводы следуют также из данных о накоплении меди в надземных частях растений. Содержание меди в надземной части пшеницы не отличается от контроля ($p < 0,05$), а у мasha всего лишь в 1,5 раза больше, чем в контроле (Рисунок 8). При этом следует помнить, что ионы могут поступать в стель корня по апопласту, минуя симпласт, через три сайта: в месте отхождения боковых корней, где происходит разрыв эндодермы, через пропускные клетки, и через кончик корня, где пояски Каспари недостаточно развиты (Marschner, 1995). Вполне вероятно, что с этим обстоятельством и может быть связано незначительное увеличение содержания меди в надземной части растений мasha.

Во всех обработках в изолированных КС корней мasha связывается примерно столько же Cu, сколько и в корнях интактных растений (Рисунок 10). У пшеницы при 50 мкМ Cu в среде также не обнаруживалось достоверных отличий в количестве этого металла, связавшегося с корнями интактных растений и с

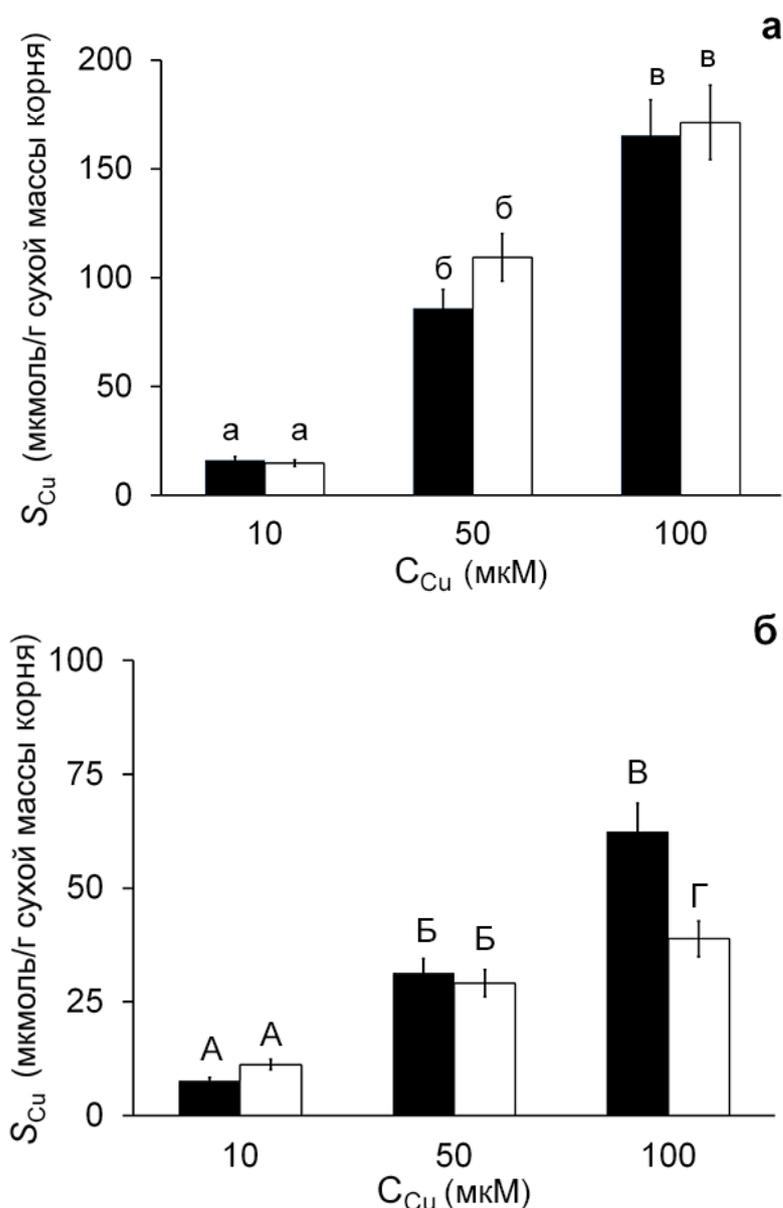


Рисунок 10. Содержание меди в корнях (черные прямоугольники, мкмоль/г сухой массы корней) и изолированных из них КС (белые прямоугольники, мкмоль/г сухой массы корней) для растений маша (а) и пшеницы (б) после 24 ч обработки растворами с разной концентрацией Cu . КС были выделены из корней растений, подвергавшихся воздействию 10, 50 или 100 μM $CuCl_2$ в течение 24 ч. Приведены средние значения и их стандартные ошибки ($n=5-9$). Средние значения с одинаковыми буквенными индексами достоверно не отличаются (при $p < 0,05$).

изолированной КС (Рисунок 10). Следовательно, при C_{Cu} в среде 10 и 50 мкМ КС вносит основной вклад в накопление меди в корнях и маша, и пшеницы.

Однако, у пшеницы при C_{Cu} 100 мкМ содержание меди в корнях в 1,6 раза выше, чем в КС, то есть последняя может принять на себя только 60% меди, поступившей в корни. Следует также отметить, что при C_{Cu} 100 мкМ в надземных частях растений пшеницы содержание меди составляет менее 4% от общего содержания Cu в целом растении (корни+надземная часть). Таким образом, более 96% поглощенной растениями Cu остается в клетках корня, при этом до 60% Cu в корне связано клеточными стенками. Полученные результаты отчетливо свидетельствуют об одновременном функционировании в корнях пшеницы как внеклеточного, так и внутриклеточного механизмов накопления Cu. Так как при C_{Cu} 100 мкМ наблюдалось снижение массы корней по сравнению с контролем (Таблица 6), можно заключить, что накопление меди в симпласте токсично для растений пшеницы, в отличие от иммобилизации меди в апопласте корней при 10 и 50 мкМ Cu в среде, которая не приводила к снижению массы корней. Согласно данным литературы, накопление Cu в КС ранее не считалось механизмом устойчивости для пшеницы, однако показано, что у твердой пшеницы (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) в КС связывается от 50 до 80% Cu, накапливающейся в корнях (Bravin et al., 2010).

Внутриклеточные защитные механизмы, реализующиеся у растений в ответ на металл-стресс, широко изучаются и обсуждаются научным сообществом, и освещены в достаточном количестве обзоров (например, Burkhead et al., 2009; Klaumann et al., 2011; Pilon, 2011). Среди этих механизмов ведущую роль играют те, что нацелены на снижение концентрации свободных ионов ТМ в цитоплазме: а) регуляция активности белков-транспортеров на плазматической мембране, направленная на ингибирование поглощения ионов ТМ и их выход из клетки; б) транспорт ионов ТМ в вакуоль; в) связывание ионов ТМ в цитоплазме и вакуоли с фитохелатинами, металлотионеинами, органическими кислотами, аминокислотами, металл-связывающими белками (Hall, 2002). Наш подход к исследованию не позволяет определить, какой из вышеназванных

внутриклеточных механизмов защиты реализуется в корнях пшеницы в ответ на высокие концентрации Cu^{2+} в среде, но впервые позволил экспериментально оценить вклад симпласта и апопласта в поглощение этого металла при кратковременной экспозиции растений на растворах, содержащих медь в различной концентрации. Следует также подчеркнуть, что в известных работах по исследованию ответных реакций растений на воздействие ТМ нет информации о количественной оценке вклада механизма защиты, связанного с функционированием КС как компартмента для иммобилизации и накопления ТМ, а также отсутствуют данные о том, какая часть от поступившего в корень токсичного металла может выводиться из метаболизма при работе каждого из упомянутых выше внутриклеточных механизмов защиты.

Наши результаты подтверждают выводы других исследователей о важной роли КС в поглощении и накоплении меди как у устойчивых, так и у чувствительных видов. Так, было обнаружено, что в КС накапливается 60% от общего содержания Cu в корнях плевела (*Lolium multiflorum*) и клевера (*Trifolium pratense*; Iwasaki et al., 1990), и устойчивой к Cu *Elsholtzia haichowensis* (Lou et al., 2004), а у твердой пшеницы КС связывает до 80% Cu в корне (Bravin et al., 2010). Однако, в некоторых работах основная роль в связывании и накоплении меди отводится внутриклеточным компонентам (Kinraide, 2004; Liu, Kottke, 2003). Например, было показано, что Cu -связывающая способность корней пшеницы и томатов выше, чем у изолированных из них КС (в расчете на сухую массу корней, Guigues et al., 2014). В данном случае Cu -связывающая способность КС корней могла быть недооценена, так как десорбция Cu из них проводилась в течение слишком короткого промежутка времени (30 минут). Различия в результатах также могут объясняться различным возрастом растения, средой выращивания, количеством металла в растворе в расчете на одно растение и продолжительностью воздействия ТМ.

Принято полагать, что апопластный транспорт ионов в корне ограничивается пространством кортекса (коры), поскольку пояски Каспари клеток эндодермы непроницаемы для ионов (Marschner, 1995). В таком случае медь, связанная с КС

клеток ризодермы и кортекса не может перемещаться в побеги, полностью минуя симпласт. В нашей работе возрастание содержания Cu в надземной части по сравнению с контролем наблюдалось и у мasha, и у пшеницы при концентрации меди в среде 50 и 100 мкМ (Рисунок 8). В тоже время, однозначное накопление Cu в симпласте отмечено только у пшеницы при 100 мкМ Cu в среде. Поэтому закономерным является вопрос о том, может ли Cu транспортироваться исключительно по апопластному пути к ксилеме в корне и далее в побеги. В некоторых исследованиях показана такая возможность для ионов кальция и цинка (White, 2001; White et al., 2002), но для Cu данные в литературе отсутствуют. Однако эндодерма не является полностью непроницаемым барьером для ионов – ее целостность нарушена в местах отхождения боковых корней, а в кончике корня пояски Каспари недоразвиты. Кроме того, в эндодерме существуют и пропускные клетки, не имеющие этих утолщений КС (Marschner, 1995). Поэтому апопластный транспорт до ксилемы в целом может происходить, и этим объясняется положительная корреляция между Cu-связывающей способностью КС корней и накоплением Cu в побегах, обнаруженная нами. Однако также возможно, что ионообменная способность КС в интактных корнях снижена по сравнению с изолированными КС, и накопление меди в симпласте происходит и при концентрациях ниже 100 мкМ.

Таким образом, исследованные растения по-разному отвечают на повышение концентрации Cu в среде и этот ответ прямо связан с содержанием карбоксильных групп ПГК в КС их корней. Cu-связывающая способность как КС, так и корней при всех S_{Cu} в среде выше для мasha, чем для пшеницы. У мasha вся накопленная в корне Cu связана в КС, а доля КС возрастает при избытке меди в среде, что вероятно вызывает ингибирование роста корней. В то же время, накопление Cu в корнях замедляет ее перемещение в побеги и препятствует проявлению в них токсических симптомов.

Следует отметить, что наш метод не позволяет заключить, является ли снижение массы корней мasha следствием увеличения жесткости КС из-за связывания меди с пектинами (как указывалось Kopittke et al., 2008) или других

комплексных негативных эффектов Cu, таких как нарушение баланса минеральных элементов, гормонального статуса, митотической активности (Lequeux et al., 2010). У пшеницы массовая доля КС в корне не зависит от количества Cu в среде, однако КС является основным местом связывания этого ТМ, за исключением обработки 100 мкМ Cu. Значительное поглощение Cu симпластом и снижение массы корней также наблюдаются у пшеницы при данной концентрации, что позволяет предположить, что накопление меди в КС клеток корня может являться механизмом ее детоксикации у данного вида. Таким образом, нами установлено, что связывание Cu полимерами КС клеток корня является важным процессом, определяющим распределение этого металла в растениях мasha и пшеницы.

3.3. Поглощение никеля растениями мasha и пшеницы и изолированными из их корней клеточными стенками

3.3.1. Влияние повышенных концентраций Ni в среде на некоторые показатели роста растений

У мasha при повышении концентрации Ni в среде сухая масса корней 10-дневных растений не отличалась от контроля ($p < 0,05$, Таблица 11), тогда как у пшеницы наблюдалось некоторое увеличение (на 6%) сухой массы корня при достижении концентрации 50 мкМ Ni. Измерений прироста корней за 24 ч (как в п. 3.2.1) не проводили. У обоих видов сухая масса надземной части не изменялась при обработке никелем (Таблица 11), а также не наблюдалось ни хлороза листьев, ни некроза корней.

Как у мasha, так и у пшеницы происходило снижение оводненности тканей, причем оно было более ярко выражено в корнях, чем в надземных частях растений (Таблица 12). При C_{Ni} 100 мкМ оводненность тканей корня мasha и пшеницы была ниже, чем в контроле на 9,9% и 8,2%, соответственно, а тканей побегов – на 6,7% и 2,5%, соответственно. Доля сухой массы КС от сухой массы корня достоверно не изменялась у обоих растений при воздействии на растения Ni (Таблица 12) во всем дискретном диапазоне изменения концентрации Ni в среде.

Таблица 11. Сухая масса корней (m_k) и побега (m_p) одного растения маша и пшеницы после 24 ч поглощения Ni из растворов NiCl₂ с различной концентрацией (C_{Ni}). Приведены средние значения и их стандартные ошибки (n=8–12). Внутри одного столбца средние значения с одинаковыми буквенными индексами достоверно не отличаются (при $p < 0,05$).

C_{Ni} (мкМ)	Маш		Пшеница	
	m_k (мг)	m_p (мг)	m_k (мг)	m_p (мг)
0,5	6,3±0,2 ^a	22,6±0,7 ^a	9,0±0,2 ^a	15,2±0,3 ^a
10	6,2±0,2 ^a	23,0±0,7 ^a	9,4±0,2 ^{ab}	15,2±0,2 ^a
50	5,8±0,2 ^a	22,3±0,6 ^a	9,6±0,2 ^b	14,9±0,2 ^a
100	6,1±0,2 ^a	22,4±0,5 ^a	9,5±0,2 ^{ab}	15,0±0,2 ^a

Таблица 12. Оводненность корней (K_k) и побегов (K_p) и доля КС от сухой массы корней (G) растений маша и пшеницы после 24 ч поглощения Ni из растворов NiCl₂ с различной концентрацией (C_{Ni}). Приведены средние значения и их стандартные ошибки (n=7–12). Внутри одного столбца средние значения с одинаковыми буквенными индексами достоверно не отличаются (при $p < 0,05$).

C_{Ni} (мкМ)	Маш			Пшеница		
	K_k (г H ₂ O/г сухой массы корней)	G (%)	K_p (г H ₂ O/г сухой массы побегов)	K_k (г H ₂ O/г сухой массы корней)	G (%)	K_p (г H ₂ O/г сухой массы побегов)
0,5	18,7±0,4 ^a	41,1±2,3 ^a	12,9±0,3 ^a	13,3±0,2 ^a	60,0±1,0 ^a	7,2±0,1 ^a
10	17,6±0,6 ^{ab}	42,0±2,1 ^a	11,8±0,3 ^b	13,0±0,3 ^{ab}	58,5±0,7 ^a	7,1±0,1 ^{ab}
50	17,4±0,4 ^b	41,2±1,7 ^a	11,9±0,2 ^b	12,5±0,4 ^b	58,5±1,2 ^a	7,1±0,1 ^{ab}
100	16,8±0,6 ^b	41,6±2,3 ^a	12,0±0,2 ^b	12,2±0,3 ^b	57,7±0,7 ^a	7,0±0,1 ^b

Поскольку сухая масса корней достоверно не отличалась у контрольных и обработанных растений, можно заключить, что в наших условиях эксперимента (время воздействия, соотношение между массой корней растений и объемом раствора) никель в концентрации 100 мкМ и ниже не оказывает значительного токсического действия на растения маша и пшеницы, т.е. не вызывает некроза корней и торможения их роста. Более того, при C_{Ni} 10 мкМ сухая масса корней пшеницы даже выше чем, в контроле (Таблица 11). Некоторые авторы отмечают, что концентрация 10 мкМ может являться верхней границей оптимального

содержания Ni в среде для развития растений (Rahman et al., 2005). Так, ранее для гороха было показано, что 10 и 100 мкМ Ni в среде не вызывают угнетения роста при продолжительности обработки менее трех суток (Gajewska, Sklodowska, 2005). И у маша, и у пшеницы токсическое действие Ni выражалось только в снижении оводненности корней и, в меньшей степени, надземной части (Таблица 12). Нарушение водного обмена в ответ на избыток никеля в среде рассматривается как один из основных симптомов Ni-стресса у растений (Pandey, Sharma, 2002; Bashmakov et al., 2005; Gajewska et al., 2006), причем некоторые авторы отмечают, что оводненность тканей корней снижается сильнее, чем оводненность побегов (Gabbrielli et al., 1999), и наши результаты соответствуют этому заключению. Следует также отметить, что снижение оводненности тканей корней и побегов было более резким у маша по сравнению с пшеницей, что может указывать на сравнительно более низкую устойчивость маша к действию повышенных концентраций Ni в среде.

С увеличением концентрации никеля Ni в растворе у обоих исследуемых растений содержание этого металла увеличивалось как в корнях, так и в надземной части растений. При C_{Ni} 100 мкМ содержание Ni в корнях пшеницы и маша было соответственно в 46 и 40 раз выше по сравнению с корнями контрольных растений (Рисунок 11(а)). В побегах содержание никеля также увеличивалось с концентрацией, но различия в содержании Ni между контрольными и опытными растениями были значительно меньше, чем наблюдалось для корней (Рисунок 11(б)).

При всех C_{Ni} в растворе исследуемые растения значительно различались по количеству никеля, накопленного в тканях корней. Содержание Ni в корнях маша было приблизительно в 2 раза больше, чем у пшеницы (Рисунок 11), однако в надземных частях растений содержание никеля достоверно не отличалось (при $p < 0,05$).

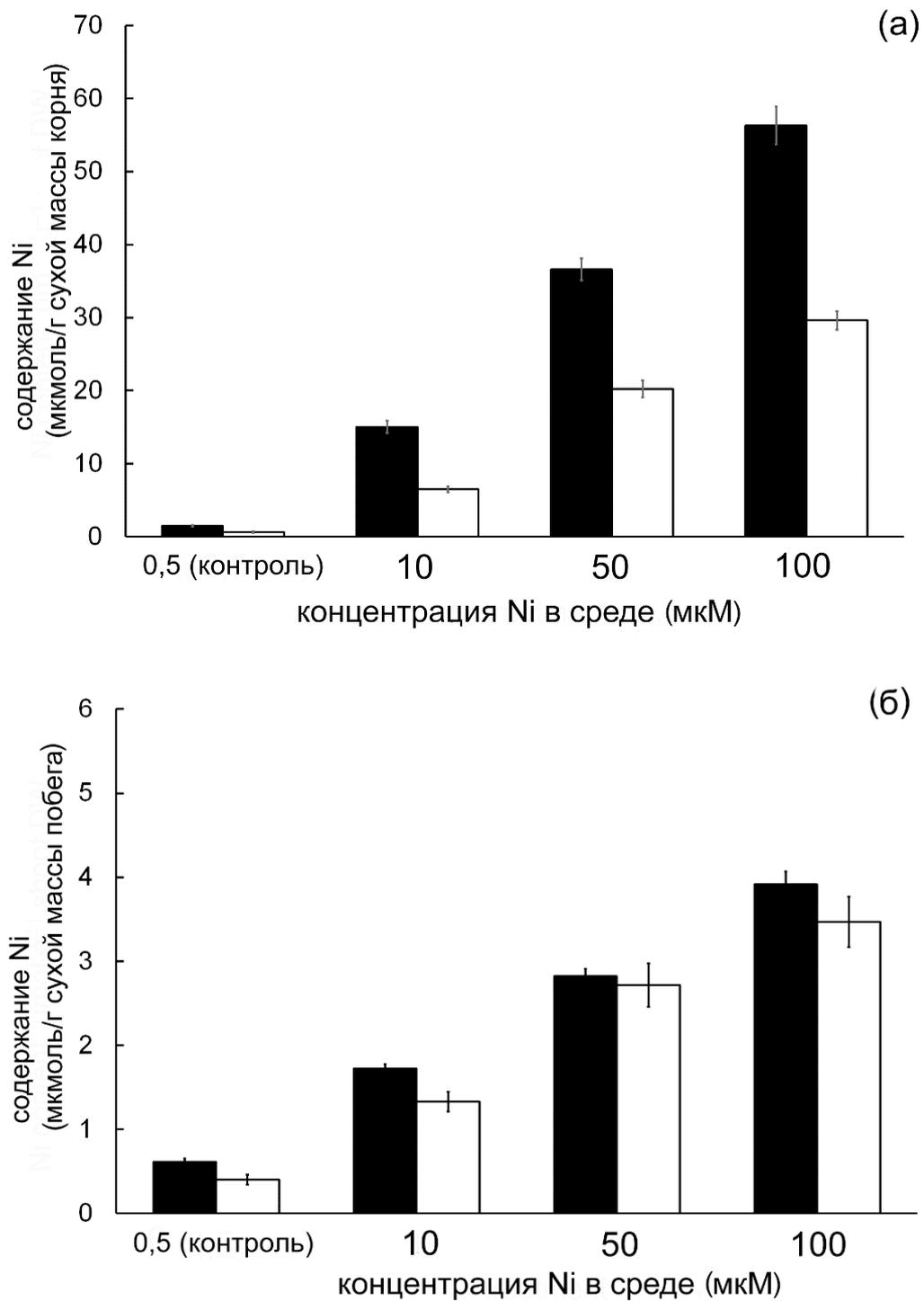


Рисунок 11. Содержание никеля (μмоль Ni/г сухой массы) в корнях (а) и побегах (б) растений маша (черные прямоугольники) и пшеницы (белые прямоугольники) при разных концентрациях никеля в среде. Приведены средние значения и их стандартные ошибки (n=8–12).

Полученные нами данные о значительно большем накоплении Ni в корнях по сравнению с надземными частями обоих видов растений согласуются с представлениями о том, что у большинства растений Ni накапливается преимущественно в корнях и почти не перемещается в побеги (Yang et al., 1997; Palacios et al., 1998; Gabbrielli et al., 1999; Kopittke et al., 2007; Mihailovic, Drazic, 2011).

Отсутствие снижения сухой массы побегов по сравнению с контролем, значительного снижения их оводненности, а также хлороза листьев у маша и пшеницы свидетельствует о том, что 24-часовая обработка никелем не приводит к развитию серьезного Ni-стресса в надземной части, несмотря на то, что после всех обработок содержание металла было достоверно выше ($p < 0,05$, в расчете на сухую массу побегов), чем в контроле (Рисунок 11б). И действительно, во всех исследованиях, где отмечалось развитие хлороза листьев в ответ на воздействие никеля, растения выдерживали на растворах с большей концентрацией Ni и/или в течение более длительного промежутка времени (Piccini, Malavolta, 1992; Palacios et al., 1998; Pandey, Sharma, 2002; Rahman et al., 2005; Kopittke et al., 2007).

Ранее было показано, что при концентрации Ni в растворе ~ 2 мкМ рост корней и побегов коровьего гороха (*Vigna unguiculata*) был снижен на 10% относительно контроля, а при C_{Ni} более 2,5 мкМ наблюдался межжилковый хлороз листьев (Kopittke et al., 2007, длительность обработки – 14 суток). Наши результаты показывают, что не только концентрацию металла и длительность эксперимента, но и соотношение между количеством растений и объемом среды необходимо принимать во внимание при сравнении результатов разных экспериментов. Кроме того, мы полагаем, что значения количества Ni в растворе в расчете на 1 растение (мкмоль Ni/растение) дают более адекватное представление о влиянии металла на рост, чем просто значения концентрации в растворе (мкмоль/л). Например, в работе Копиттке с соавторами на одно растение приходилось 10,5 мкмоль Ni (объем раствора $\times C_{Ni}$ / количество растений = 21 л \times 2 мкМ / 4 шт.; Kopittke et al., 2007). Аналогично, симптомы Ni-стресса наблюдались у растений кукурузы после 8 дней обработки с количеством Ni в среде 8,33 мкмоль/растение (5 л \times 20 мкМ / 12 шт.;

L'Huillier et al., 1996). В наших экспериментах содержание Ni на одно растение в растворах с C_{Ni} 10, 50 и 100 мкМ было соответственно в 55, 11 и 5,6 раз ниже, чем в указанных работах. Также была меньше и продолжительность эксперимента. Эти обстоятельства объясняют отсутствие выраженных признаков Ni-стресса (снижение сухой массы, хлороз листьев) у растений маша, и пшеницы при всех C_{Ni} в наших экспериментах.

Взаимосвязь между содержанием Ni в растворе в расчете на одно растение и количеством Ni, накопленного корнями, подтверждена нами в экспериментах по поглощению Ni разным количеством растений маша из одинакового объема раствора $NiCl_2$ в течение 24 ч. Как показано на Рисунке 12, количество накопленного в корнях Ni линейно уменьшалось с увеличением числа растений на

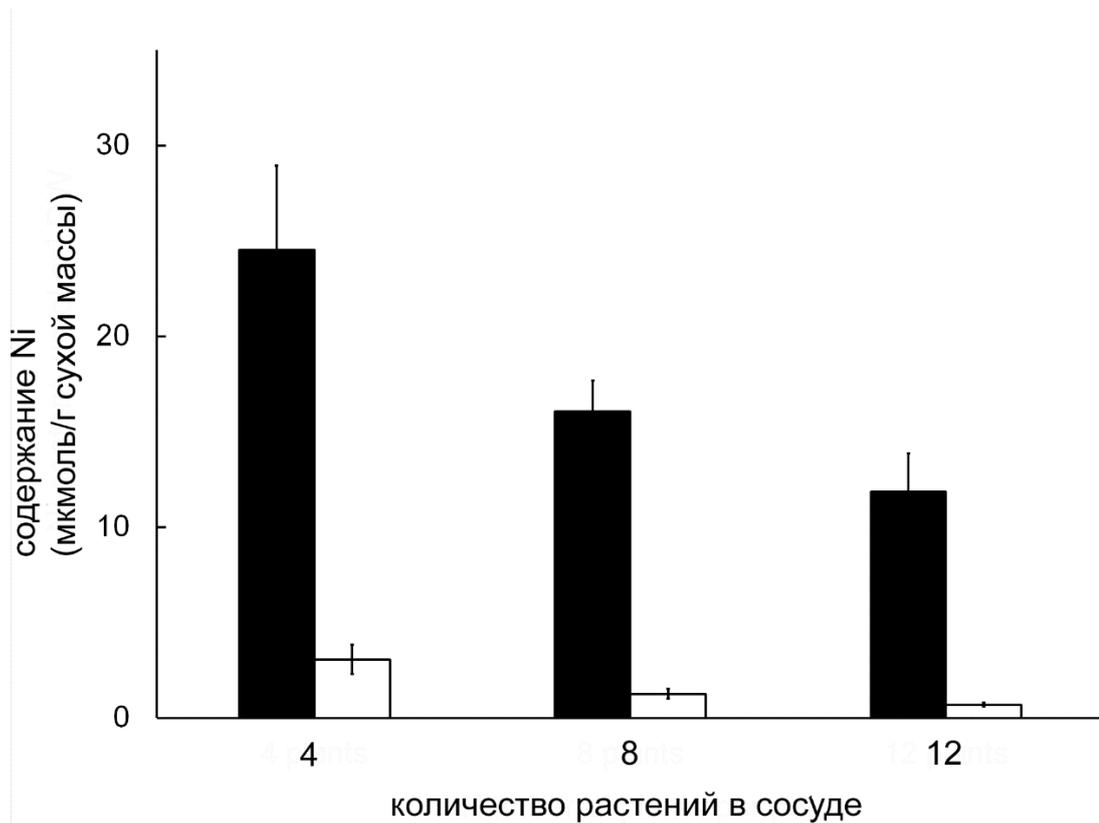


Рисунок 12. Содержание никеля (мкмоль Ni/г сухой массы) в корнях (черные прямоугольники) и побегах (белые прямоугольники) растений маша после 24 ч поглощения Ni при разном количестве растений в сосуде (4, 8 или 12 растений на сосуд с 150 мл 10 мкМ раствора $NiCl_2$). Приведены средние значения и их стандартные ошибки (n=3).

одинаковый объем раствора с C_{Ni} 10 мкМ. Количество Ni , накопленного в корнях восьми и двенадцати растений было в 1,5 и 2,1 раза меньше, чем в корнях четырех растений, соответственно (Рисунок 12, в расчете на сухую массу тканей). В надземной части восьми растений накапливалось в 2,4 раза меньше Ni , чем четырех, двенадцати – в 4,5 раза. Таким образом, наши результаты ясно показывают, что накопление и, следовательно, токсическое действие никеля на растения при его заданной концентрации в растворе снижается при инкубации большего числа растений в заданном объеме или того же числа растений в меньшем объеме раствора.

3.3.2. Адсорбция Ni изолированными КС корней маша и пшеницы при разных концентрациях Ni в растворе

И у маша, и у пшеницы Ni -связывающая способность клеточных стенок корней (S_{Ni}) возрастала параллельно с концентрацией ионов никеля в среде инкубации КС и была выше или равна Ni -связывающей способности корней интактных растений (Рисунок 13). Исключением были растения пшеницы – за 24 ч обработки 100 мкМ Ni в КС было связано на 24% меньше никеля, чем в корнях.

При всех концентрациях Ni в среде КС корней маша накапливали больше металла, чем КС корней пшеницы, как в расчете на сухую массу КС, так и на сухую массу корней. S_{Ni} клеточных стенок, выделенных из контрольных растений маша была в 2,6, 4,4 и 5,7 раз выше, чем S_{Ni} КС пшеницы при 10, 50 и 100 мкМ Ni в среде, соответственно (Рисунок 13, в расчете на сухую массу КС).

Очевидно, что данные различия в Ni -связывающей способности КС между машем и пшеницей определяются разным содержанием карбоксильных групп ПГК у этих растений. Известно, что КС бобовых растений содержат в 2–7 раз больше данных групп, чем злаки (Meuchik, Yermakov, 1999; Vogel, 2008), что соответствует порядку отличий в S_{Ni} между машем и пшеницей. В то же время, в условиях нашего эксперимента (количество Ni на массу КС, pH раствора) только 75% карбоксильных групп ПГК связаны с ионами Ni^{2+} даже при C_{Ni} 100 мкМ (Таблица 13). Поэтому мы предполагаем, что карбоксильные группы ГКК, которые имеют

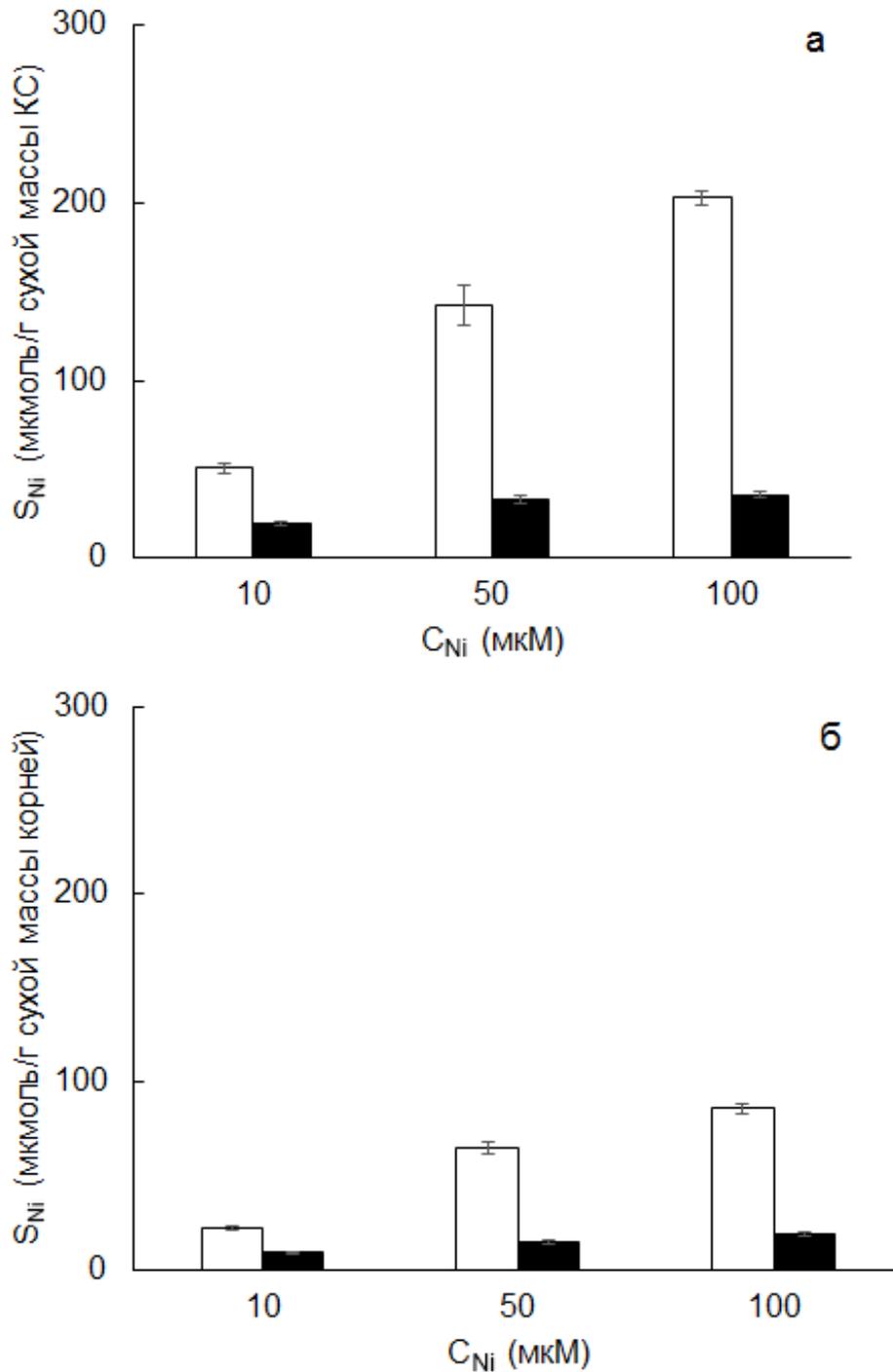


Рисунок 13. Содержание никеля, выраженное в расчете на 1 г сухой массы клеточных стенок (а) и на 1 г сухой массы корней (б), в изолированных клеточных стенках корней маша (белые прямоугольники) и пшеницы (черные прямоугольники) после 24 ч сорбции из растворов с разной начальной концентрацией Ni. КС были выделены из контрольных растений (не подвергавшихся воздействию Ni). Приведены средние значения и их стандартные ошибки (n=6–10).

более низкую константу ионизации, не принимают участия в связывании Ni, несмотря на то, что в КС корней пшеницы их содержание выше, чем карбоксильных групп ПГК.

На основании данных о содержании карбоксильных групп ПГК можно рассчитать вклад этих групп в связывание Ni клеточной стенкой. Расчеты показывают, что при C_{Ni} 10 мкМ с ионами Ni^{2+} связано 18 и 48% данных групп в КС маша и пшеницы, соответственно (Таблица 13). При 100 мкМ Ni в среде этот показатель достигает 74 и 89%, соответственно.

Таблица 13. Содержание карбоксильных групп ПГК ($S_{ПГК}$) и ГКК ($S_{ГКК}$), Ni-связывающая способность КС корней (S_{Ni}) маша и пшеницы, и соотношение содержания Ni и карбоксильных групп ПГК в КС ($Q_{Ni} = 2 \times S_{Ni} / S_{ПГК}$). Приведены средние значения и их стандартные ошибки (n=5–10). КС были выделены из контрольных растений (не подвергавшихся воздействию Ni).

	$S_{ПГК}$ (мкмоль/г сухой массы КС)	$S_{ГКК}$ (мкмоль/г сухой массы КС)	C_{Ni} (мкМ)	S_{Ni} (мкмоль/г сухой массы КС)	Q_{Ni}
Маш	550±45	220±45	10	50,2±3,1	0,18
			50	142,3±10,9	0,52
			100	202,8±4,3	0,74
Пшеница	80±20	350±25	10	19,0±1,0	0,48
			50	32,7±2,2	0,82
			100	35,7±2,0	0,89

К сожалению, в литературе за единственным исключением отсутствуют данные о значениях Ni-связывающей способности КС растений: данный показатель у КС ксилемы дуба (*Quercus ilex*) составлял 49 мкмоль Ni/г сухой массы КС при 30 мкМ Ni в среде (Araújo et al., 2009), что сравнимо с полученными нами данными.

Поскольку нами было показано, что S_{Ni} изолированных клеточных стенок прямо пропорциональна содержанию в них карбоксильных групп ПГК ($S_{ПГК}$, см. раздел 3.1 и Рисунок 7), можно предположить, что изменения S_{Ni} отражают изменения содержания данных групп в КС и/или степени их метилирования.

Исходя из этого предположения, можно сделать вывод об изменении состава КС обработанных Ni растений без прямого измерения $S_{\text{ПК}}$.

Клеточные стенки, выделенные из корней растений маша, подвергшихся 24-часовой обработке 10 и 50 мкМ Ni, характеризовались значениями S_{Ni} , близкими к таковым для контрольных растений (Таблица 14). Однако, после экспозиции растений на 100 мкМ Ni КС поглощали значительно меньше ионов Ni^{2+} из 100 мкМ раствора, чем КС контрольных растений, что является следствием либо более низкого содержания карбоксильных групп ПК в КС обработанных растений по сравнению с контрольными, либо более высокой степени метилирования этих групп. Мы предполагаем, что в КС маша реализуется вторая стратегия, так как не наблюдается изменения доли КС от сухой массы корня (Таблица 12). Однако, возможно и снижение доли пектиновых веществ по сравнению с другими полимерами КС. Так, например, ранее было показано увеличение доли лигнина в КС корней гороха в ответ на повышенное содержание Ni в питательном растворе (Gabbrielli et al., 1999).

Таблица 14. Ni-связывающая способность клеточных стенок (S_{Ni}), выделенных из корней контрольных и обработанных Ni растений маша, в расчете на сухую массу корней и клеточных стенок. Приведены средние значения и их стандартные ошибки ($n=6-12$). Средние значения, отмеченные звездочкой достоверно ($p<0,05$) отличаются от контроля при той же концентрации Ni в среде.

C_{Ni} (мкМ)	КС выделены из	S_{Ni} (мкмоль Ni/г сухой массы корней)	S_{Ni} (мкмоль Ni/г сухой массы КС)
10	контрольных растений	22,1±0,9	50,4±3,1
	растений после обработки 10 мкМ Ni	19,5±0,7	51,6±3,6
50	контрольных растений	64,9±3,1	142,3±11,0
	растений после обработки 50 мкМ Ni	55,8±2,9	134,2±2,9
100	контрольных растений	86,1±2,9	202,8±4,3
	растений после обработки 100 мкМ Ni	61,9±2,1*	161,4±7,0*

Таким образом, нами впервые было показано снижение Ni-связывающей способности КС корней маша в ответ на избыток никеля в среде. Подобный ответ наблюдался другими исследователями у Cu- и Al-устойчивых растений (Eticha et al., 2005; Konno et al., 2010; Colzi et al., 2012) при повышенных концентрациях этих металлов в среде, а также был показан нами для растений маша при воздействии на них меди в повышенных концентрациях (см. п 3.2.2).

Инкубация растений пшеницы на среде с Ni не оказала влияния на Ni-связывающую способность КС (Таблица 15). Поэтому можно сделать вывод о том, что у пшеницы в ответ на действие Ni в КС корней не изменяется содержание карбоксильных групп ПГК, степень их метилирования и, как следствие, Ni-связывающая способность клеточных стенок.

Таблица 15. Ni-связывающая способность клеточных стенок (S_{Ni}), выделенных из корней контрольных и обработанных Ni растений пшеницы, в расчете на сухую массу корней и клеточных стенок. Приведены средние значения и их стандартные ошибки (n=3–9).

C_{Ni} (мкМ)	КС выделены из	S_{Ni} (мкмоль Ni/г сухой массы корней)	S_{Ni} (мкмоль Ni/г сухой массы КС)
10	контрольных растений	9,3±0,3	19,0±1,0
	растений после обработки 10 мкМ Ni	10,0±0,3	17,1±0,6
50	контрольных растений	15,0±1,5	32,7±2,2
	растений после обработки 50 мкМ Ni	17,1±1,0	29,4±2,0
100	контрольных растений	19,3±1,2	35,7±2,0
	растений после обработки 100 мкМ Ni	22,5±1,9	39,03±3,3

3.3.3. Вклад клеточных стенок в поглощение никеля корнями маша и пшеницы

Сравнение значений Ni-связывающей способности корней и КС показывает, что накопление этого металла в КС является важным механизмом его метаболической инактивации при относительно высоком содержании во внешней среде, так как

количество никеля, накопленного в корнях растений и в изолированных КС (в пересчете на сухую массу корня) достоверно не отличалось у маша при C_{Ni} 100 мкМ, у пшеницы – при 50 мкМ (Рисунок 14). Более того, у обоих видов при 10 мкМ Ni, а также у маша при 50 мкМ Ni клеточные стенки корней адсорбировали больше металла, чем корни интактных растений. Бóльшая способность КС к связыванию Ni по сравнению с корнями может быть обусловлена несколькими причинами: а) в интактном корне часть сайтов связывания Ni (карбоксильные группы ПГК) занята другими катионами (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ и др.; Marschner, 1995), которые присутствуют в среде, но отсутствуют в изолированной КС (в нашем эксперименте в среде присутствуют только ионы Ni^{2+} , Cl^- и H^+); б) в ответ на избыток Ni корни растений выделяют в среду аминокислоты и органические кислоты (Callahan et al., 2006; Bravin et al., 2009; Chen et al., 2017), которые связывают катионы Ni^{2+} в растворе и таким образом препятствуют их адсорбции на КС (Araújo et al., 2009); в) несмотря на то, что используемая нами методика выделения КС позволяет сохранить архитектуру полимерного каркаса (Meuschik, Yermakov, 2001), благодаря удалению протопластов облегчается диффузия ионов в КС по сравнению с интактным корнем; г) некоторая часть Ni^{2+} проходит в надземную часть растений. Таким образом, мы полагаем, что в условиях нашего эксперимента при C_{Ni} 100 мкМ и ниже у маша основным механизмом, предотвращающим поступление Ni в симпласт корня, является депонирование Ni в КС. Этот вывод также справедлив и для пшеницы при 10 и 50 мкМ Ni в среде (Рисунок 14б).

Однако, у пшеницы при 100 мкМ Ni в растворе наблюдается другая картина: Ni-связывающая способность корней на 24% выше, чем аналогичный показатель для КС (Рисунок 14(б)). Эти результаты однозначно свидетельствуют о том, что у пшеницы при данной C_{Ni} в среде Ni-связывающая способность КС исчерпана и поэтому имеет место накопление Ni в симпласте корня.

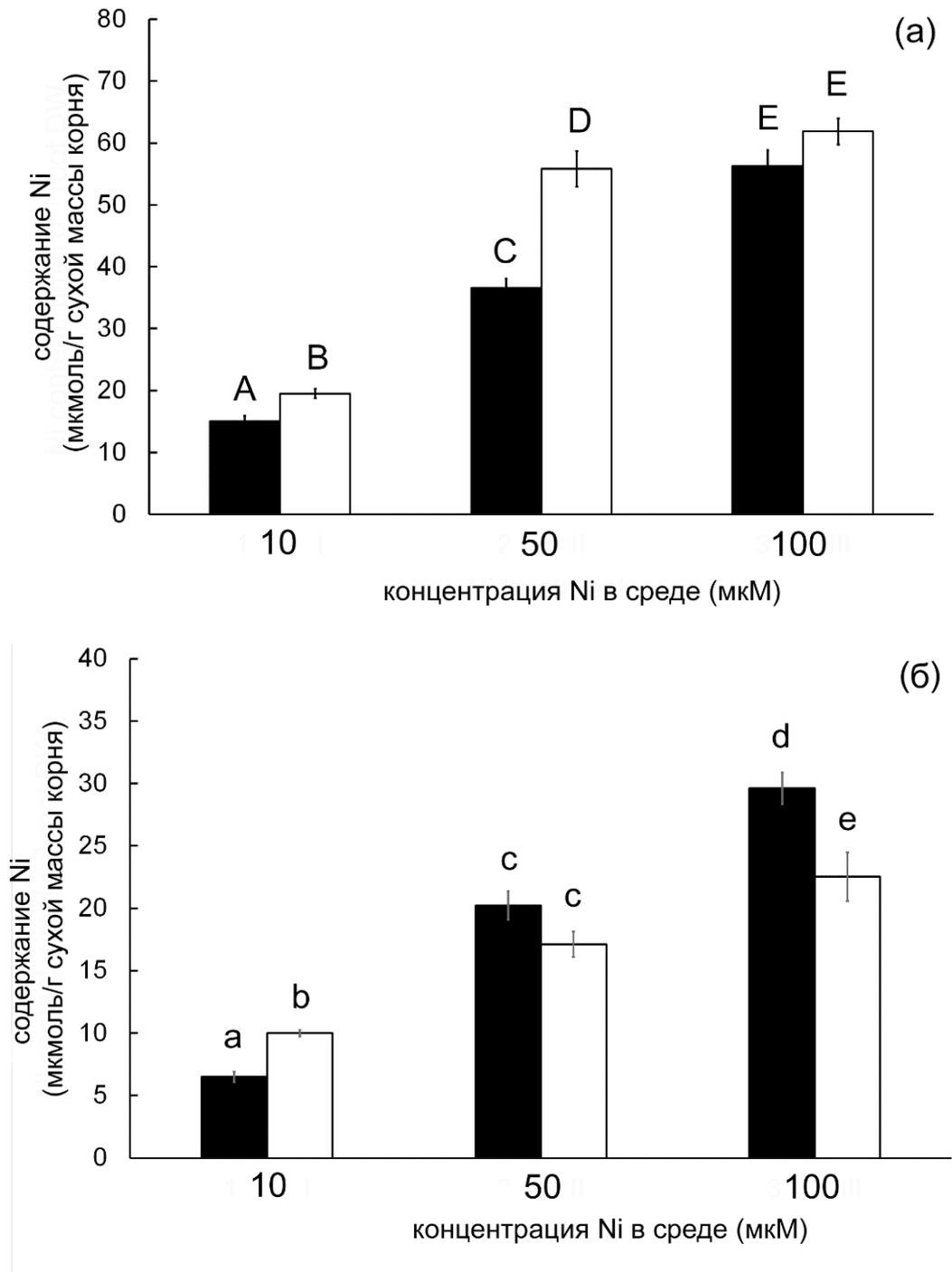


Рисунок 14. Содержание никеля (мкмоль Ni/г сухой массы) в корнях (черные прямоугольники) и изолированных клеточных стенках (белые прямоугольники) в расчете на сухую массу корней растений маша (а) и пшеницы (б). Адсорбцию Ni измеряли на клеточных стенках, выделенных из корней растений после 24-часовой обработки растворами NiCl₂ соответствующих концентраций. Приведены средние значения и их стандартные ошибки (n=8–12). Средние значения, обозначенные разными буквами (заглавные для маша, строчные для пшеницы) достоверно различаются (p<0,05).

Мы также предприняли попытку оценить вклад апопласта в поглощение Ni корнями растений маша другим методом, используя ортованадат натрия как ингибитор H⁺-АТФаз плазматической мембраны, в соответствии с подходом, предложенным в работе Dalir, Khoshgoftarmanesh (2015). Поскольку известно, что активный транспорт ионов в клетку обеспечивается протонным градиентом на плазмалемме, данные авторы предполагают, что при ингибировании H⁺-АТФаз наблюдаемое поглощение металла корнем будет представлять собой почти исключительно пассивное поглощение, за которое отвечает КС. Нами показано, что после 24 ч обработки растений раствором, содержащим 10 мкМ NiCl₂ и 100 мкМ Na₃VO₄ в корнях накапливается на 35% меньше Ni по сравнению с обработкой 10 мкМ NiCl₂ (9,75±0,36 мкмоль Ni/г сухой массы корней в присутствии Na₃VO₄ против 15,05±0,87 мкмоль Ni/г сухой массы корней на NiCl₂). При этом сухая масса корней и надземной части не отличалась между обработками (данные не представлены). Однако, в отличие от цитируемых авторов, мы также изучили влияние присутствия ортованадата в растворе на сорбцию ионов никеля изолированными КС корней маша. При этом мы обнаружили, что после 24 ч инкубации КС в растворе 10 мкМ NiCl₂ + 100 мкМ Na₃VO₄ в КС связывается на 49,5% меньше Ni, чем при инкубации КС в 10 мкМ NiCl₂ (11,17±0,8 против 22,1±0,9 мкмоль Ni/г сухой массы корней). Данный эффект обусловлен высокой концентрацией катионов Na⁺ в растворе ортованадата, которые составляют сильную конкуренцию катионам Ni²⁺ за связывание с карбоксильными группами ПГК в составе пектинов КС. На основании полученных нами данных можно заключить, что снижение Ni-связывающей способности КС является основным эффектом ортованадата, поэтому использование этого реагента для оценки вклада активного поглощения Ni корнями растений не является оправданным.

Наши результаты согласуются с полученными с помощью других методов данными о том, что КС корня играют важную роль в поглощении и накоплении никеля как у устойчивых, так и у чувствительных к Ni-стрессу видов (Redjala et al., 2010; Dalir, Khoshgoftarmanesh, 2014, 2015). Так, например, с помощью физико-химического фракционирования Ni было показано, что у кукурузы и

сверхнакопителя Ni *Leptoplax emarginata* апопласт поглощает соответственно до 88% и 95% от общего количества Ni, поступающего в корень (Redjala et al., 2010). Методом гистологического окрашивания корней диметилглиоксимом было обнаружено, что Ni накапливается в клеточных стенках клеток корня у другого сверхнакопителя никеля, *Berkheya coddii* (Moradi et al., 2010). В отличие от известных работ, наш подход к исследованию впервые позволил визуализировать на примере растений пшеницы одновременное функционирование и вне- и внутриклеточных механизмов защиты растений от избыточных концентраций никеля в среде и определить соотношение между вне- и внутриклеточным накоплением никеля в корне.

С другой стороны, некоторые исследователи полагают, что при низком содержании Ni в среде преобладает симпластное поглощение данного металла корнем, тогда как вклад апопласта возрастает с увеличением концентрации Ni и преобладает только при избытке Ni в среде (см., к примеру, Liu, Kottke, 2003; Серегин, Кожевникова, 2006). Наши результаты не поддерживают такого заключения, так как, во всяком случае для пшеницы, при малых концентрациях никеля происходит его депонирование исключительно в КС, а внутриклеточное накопление наблюдается только после того, как клеточные стенки клеток корня на 90% заполнены ионами Ni. Согласно нашим результатам, апопласт отвечает за поглощение Ni у маша при C_{Ni} до 100 мкМ включительно (т.е. при $\leq 1,7$ мкмоль Ni/растение), тогда как у пшеницы при C_{Ni} 100 мкМ (1,5 мкмоль Ni/растение) КС может принять на себя не более 76% металла и происходит накопление Ni в симпласте корня. Последнее заключение поддерживается данными других исследователей, которые показали, что у пшеницы 80% Ni в корне связано с КС после обработки растворами с 6 мкмоль Ni/растение (Dalir, Khoshgoftarmanesh, 2014).

Более того, мы предполагаем, что обнаруженная нами положительная корреляция между количеством никеля, связанного клеточными стенками в корне и его накоплением в надземной части растений, а также тот факт, что весь никель в корне связан с КС (кроме пшеницы при C_{Ni} 100 мкМ), могут свидетельствовать в

пользу апопластного транспорта Ni от поверхности корня к ксилеме. Нами были проведены эксперименты по поглощению Ni растениями маша, у которых отсечены эпикотиль и листья, при C_{Ni} в растворе 10 мкМ. Было обнаружено, что у «безлистных» растений содержание Ni в оставшейся части стебля (гипокотиле) составляло $1,56 \pm 0,17$ мкмоль Ni/г сухой массы и достоверно не отличалось от контроля ($1,41 \pm 0,10$ мкмоль Ni/г сухой массы). Также не отличалось и содержание Ni в корнях интактных транспирирующих растений ($15,7 \pm 0,88$ мкмоль Ni/г сухой массы) и в корнях «безлистных» растений ($15,9 \pm 0,85$ мкмоль Ni/г сухой массы). Эти результаты свидетельствуют о том, что увеличение содержания Ni в надземных органах маша обусловлено транспирационным током.

Однако, многие исследователи полагают, что перемещение ионов по апопласту может происходить только в кортексе корня (напр., Moradi et al., 2010), так как пояски Каспари препятствуют проникновению ионов через эндодерму в центральный цилиндр (Marschner, 1995). В таком случае, никель, связанный с клеточными стенками в кортексе, не способен перемещаться в надземную часть, минуя симпласт. В то же время, эндодерма на является полностью непроницаемым барьером для апопластного тока ионов: он возможен в местах разрыва эндодермы боковыми корнями, в апикальной части корня (где клетки эндодермы не имеют поясков Каспари) и через пропускные клетки эндодермы (Marschner, 1995). Насколько нам известно, в настоящее время отсутствуют данные, прямо подтверждающие или опровергающие возможность апопластного перемещения никеля (и других ТМ) в ксилему. Для некоторых видов, включая пшеницу, показано преобладание симпластного пути (Aschmann, Zasoski, 1987; Dalir, Khoshgoftarmanesh, 2015). Следовательно, вопрос о возможности поступления никеля в ксилему по апопласту требует дальнейшего изучения.

Таким образом, исследованные растения по-разному отвечают на повышенное содержание Ni в среде, что определяется разным содержанием карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты в КС клеток корня. Для КС корней пшеницы характерно более низкое содержание данных групп и, как следствие, более низкая Ni-связывающая способность и корней, и КС. Мы полагаем, что у мasha подавляющая часть никеля, поглощенного корнем, связана в КС корня при всех концентрациях Ni в растворе (10, 50, 100 мкМ), что является механизмом детоксикации Ni и предотвращает угнетение роста корня и надземной части. В то же время, в ответ на избыток Ni (100 мкМ) в среде Ni-связывающая способность КС снижается. У пшеницы КС является основным местом накопления Ni при C_{Ni} 10 и 50 мкМ, а при 100 мкМ может связать только 76% металла, поступающего в корень. В некоторых работах предполагается, что селективное, симпластное поглощение тяжелых металлов в корне преобладает при низких концентрациях в среде (см. например, Moradi et al., 2010), однако наши результаты свидетельствуют об обратном – внутрь клеток корня никель поступает только при его самой высокой концентрации в среде, когда КС клеток корня на ~90% заполнены ионами Ni²⁺. Также наши результаты позволяют предположить, что апопластный транспорт может являться основным способом перемещения Ni²⁺ в корнях мasha и пшеницы.

3.4. Сравнение поглощения ионов меди и никеля растениями маша и пшеницы и изолированными из их корней клеточными стенками

3.4.1. Влияние повышенных концентраций Cu и Ni в среде на некоторые показатели роста растений. Накопление Cu и Ni растениями маша и пшеницы при разных концентрациях этих металлов в растворе

Результаты наших экспериментов свидетельствуют о том, что медь более токсична для растений, чем никель. При воздействии 100 мкМ Cu мы наблюдали достоверное снижение сухой массы корней у обоих видов растений, а у маша оно было зафиксировано и при C_{Cu} 50 мкМ (Таблица 6). В то же время присутствие никеля в среде даже в самой высокой концентрации не оказывало негативного эффекта на массу корней (Таблица 11). Сухая масса надземной части растений не отличалась от контроля как при воздействии Cu, так и Ni (Таблицы 6 и 11).

Противоположным было действие этих металлов на оводненность тканей: при C_{Cu} 50 и 100 мкМ наблюдалось возрастание оводненности корней у маша (предположительно из-за усиленной вакуолизации клеток и/или увеличения доли КС), тогда как присутствие никеля в среде вызывало снижение этого показателя как для корней, так и для надземной части обоих видов (Таблицы 7 и 12), что, как известно, является одним из основных симптомов Ni-стресса у растений (Pandey, Sharma, 2002; Bashmakov et al., 2005; Gajewska et al., 2006).

Полученные нами данные согласуются с представлениями о том, что рост корней нарушается при более низких C_{Cu} , чем C_{Ni} в среде, что положительно коррелирует с сорбционной способностью КС в отношении этих металлов и в целом с их сродством к O-, S- и N-содержащим лигандам (Kinraide, 2009; Kopittke et al., 2008, 2011). Больше накопление Cu по сравнению с Ni в корне (Рисунок 15), но меньшее – в побегах (Рисунок 16) также являются следствием более прочного связывания меди с КС клеток корня и ее относительно низкой подвижности в растениях: в корнях накапливается до 3,5 раз больше Cu, чем Ni (при $C_{Cu(Ni)}$ 100 мкМ), тогда как в надземной части содержание Ni превосходит содержание Cu (максимум в 3,8 раз, при $C_{Cu(Ni)}$ 10 мкМ). Кроме того, более высокое содержание карбоксильных групп ПГК в КС корней маша является предпосылкой для

накопления в 2,5–3 раза большего количества обоих металлов в корнях этого растения по сравнению с пшеницей.

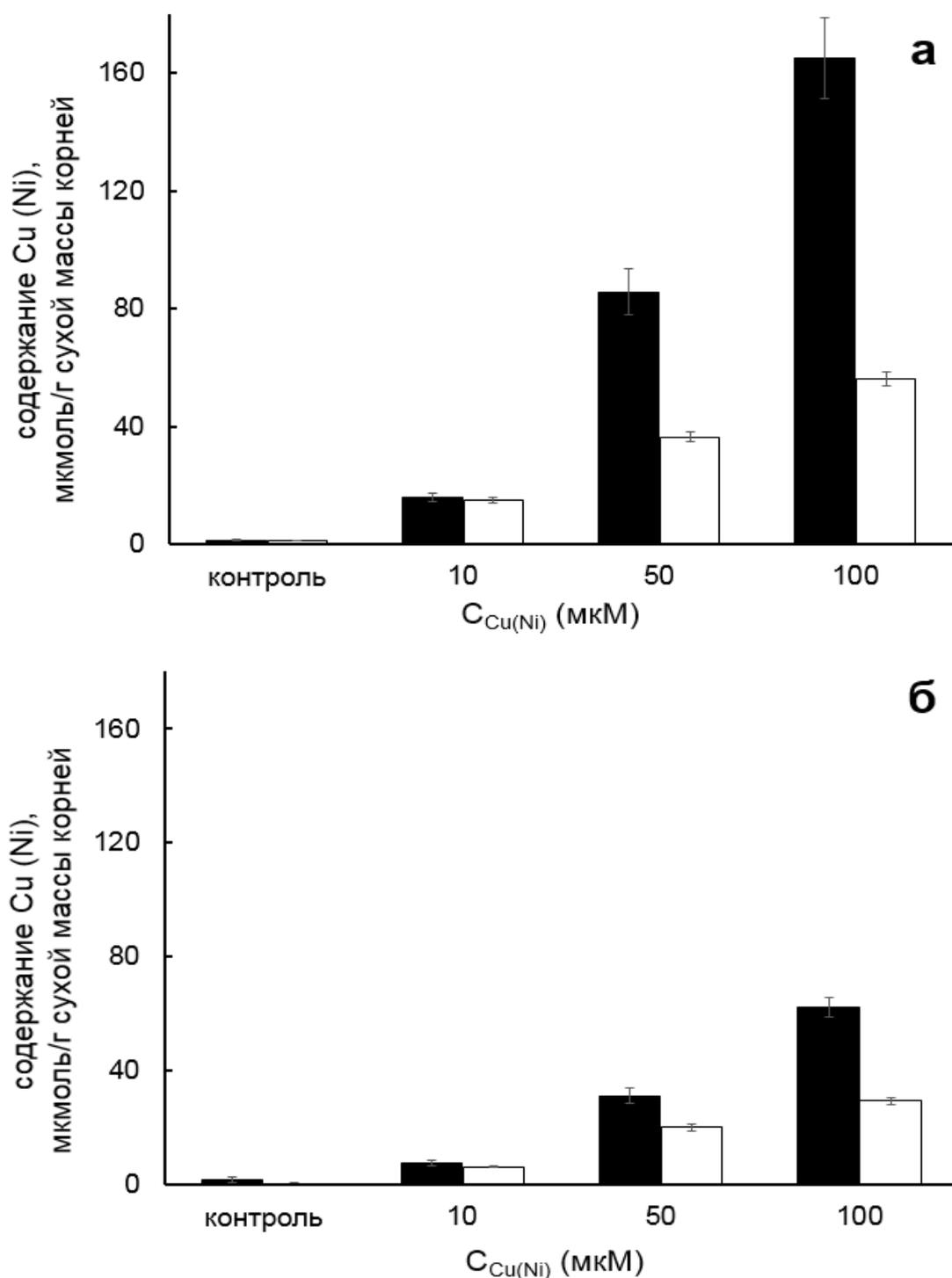


Рисунок 15. Содержание меди (черные прямоугольники) и никеля (белые прямоугольники) в корнях растений маша (а) и пшеницы (б) в расчете на сухую массу при разных концентрациях металлов в среде. Приведены средние значения и их стандартные ошибки ($n=6-12$).

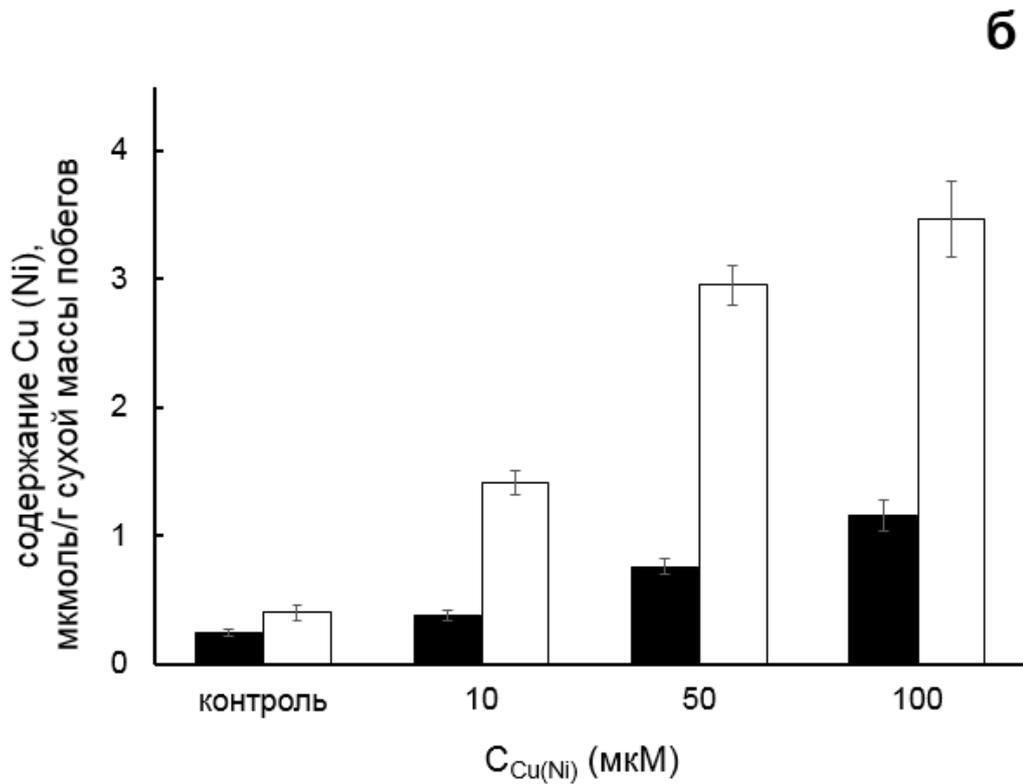
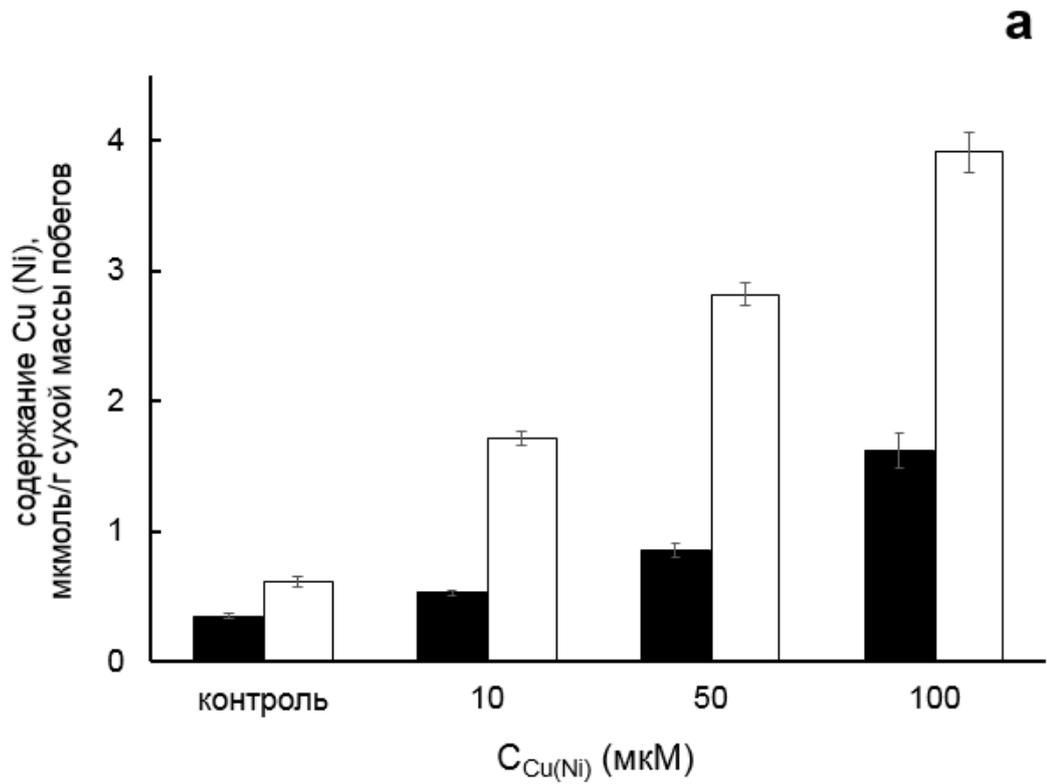


Рисунок 16. Содержание меди (черные прямоугольники) и никеля (белые прямоугольники) в побегах растений маша (а) и пшеницы (б) в расчете на сухую массу при разных концентрациях металлов в среде. Приведены средние значения и их стандартные ошибки ($n=6-12$).

3.4.2. Адсорбция Cu и Ni изолированными КС корней и вклад КС в поглощение этих металлов корнями маша и пшеницы при их разных концентрациях в растворе

И у маша, и у пшеницы Cu- и Ni-связывающая способность клеточных стенок корней возрастала параллельно с концентрацией ионов металлов в среде. Как и в случае корней интактных растений, изолированные КС адсорбировали до 1,7 или 2,8 раз больше Cu, чем Ni из растворов с $C_{Cu(Ni)}$ 50–100 мкМ в расчете соответственно на сухую массу КС или корней (Рисунки 9 и 13). При всех концентрациях Cu- и Ni-связывающая способность изолированных КС корней маша выше по сравнению с КС пшеницы. В связывании никеля у обоих растений участвуют только карбоксильные группы ПГК, тогда как у пшеницы в связывание меди при C_{Cu} 50 и 100 мкМ вовлекаются и карбоксильные группы ГКК, имеющие более низкую константу ионизации (Таблица 8).

У растений маша при определенных $C_{Cu(Ni)}$ в среде происходит модификация КС клеток корня, заключающаяся в снижении содержания карбоксильных групп ПГК и/или возрастании степени их метилирования, и приводящая к уменьшению металл-связывающей способности КС. Интересно, что в случае меди подобная модификация наблюдается при нетоксичной для растений маша концентрации Cu 10 мкМ в среде (Таблица 9), тогда как в случае никеля – при C_{Ni} 100 мкМ (Таблица 14), когда начинают проявляться симптомы Ni-стресса (снижение оводненности корней). При C_{Cu} 50 и 100 мкМ у маша происходит увеличение доли КС в сухой массе корней (Таблица 7), что предположительно является симптомом токсического действия меди и может приводить к снижению массы корней маша, так как было показано, что связывание Cu с КС повышает ее жесткость и снижает способность к растяжению (Korittke et al., 2008). У пшеницы в ответ на действие как Cu, так и Ni в КС корней не изменяется содержание карбоксильных групп ПГК, степень их метилирования и, как следствие, Cu- и Ni-связывающая способность клеточных стенок (Таблицы 10 и 15).

У пшеницы при $C_{Cu(Ni)}$ 10 и 50 мкМ, а у маша при всех концентрациях металлов, количество адсорбированного клеточными стенками Cu или Ni было выше или примерно равно общему количеству металла, накопленного в корнях растений (Рисунок 17), что свидетельствует о том, что при этих концентрациях металла в среде КС вносит основной вклад в накопление меди в корнях. Однако, в случае пшеницы при $C_{Cu(Ni)}$ 100 мкМ в КС связано на 24% меньше никеля и на 40% меньше меди, чем в корнях, что указывает на поступление значительного количества металла в симпласт корня.

Таким образом, исследованные растения по-разному отвечают на повышение концентрации Cu и Ni в среде и этот ответ прямо связан с содержанием карбоксильных групп ПГК в КС клеток корня. Cu- и Ni-связывающая способность как КС, так и корней при всех $C_{Cu(Ni)}$ в среде выше для маша, чем для пшеницы. Мы полагаем, что в условиях нашего эксперимента при $C_{Cu(Ni)}$ 100 мкМ и ниже у маша основным механизмом, предотвращающим поступление меди и никеля в симпласт корня, является их депонирование в КС. Этот вывод также справедлив и для пшеницы при 10 и 50 мкМ Cu и Ni в среде. Накопление данных тяжелых металлов в КС клеток корня замедляет их перемещение в побеги и предотвращает угнетение роста надземной части (а также и корня в случае воздействия никеля) при кратковременном воздействии.

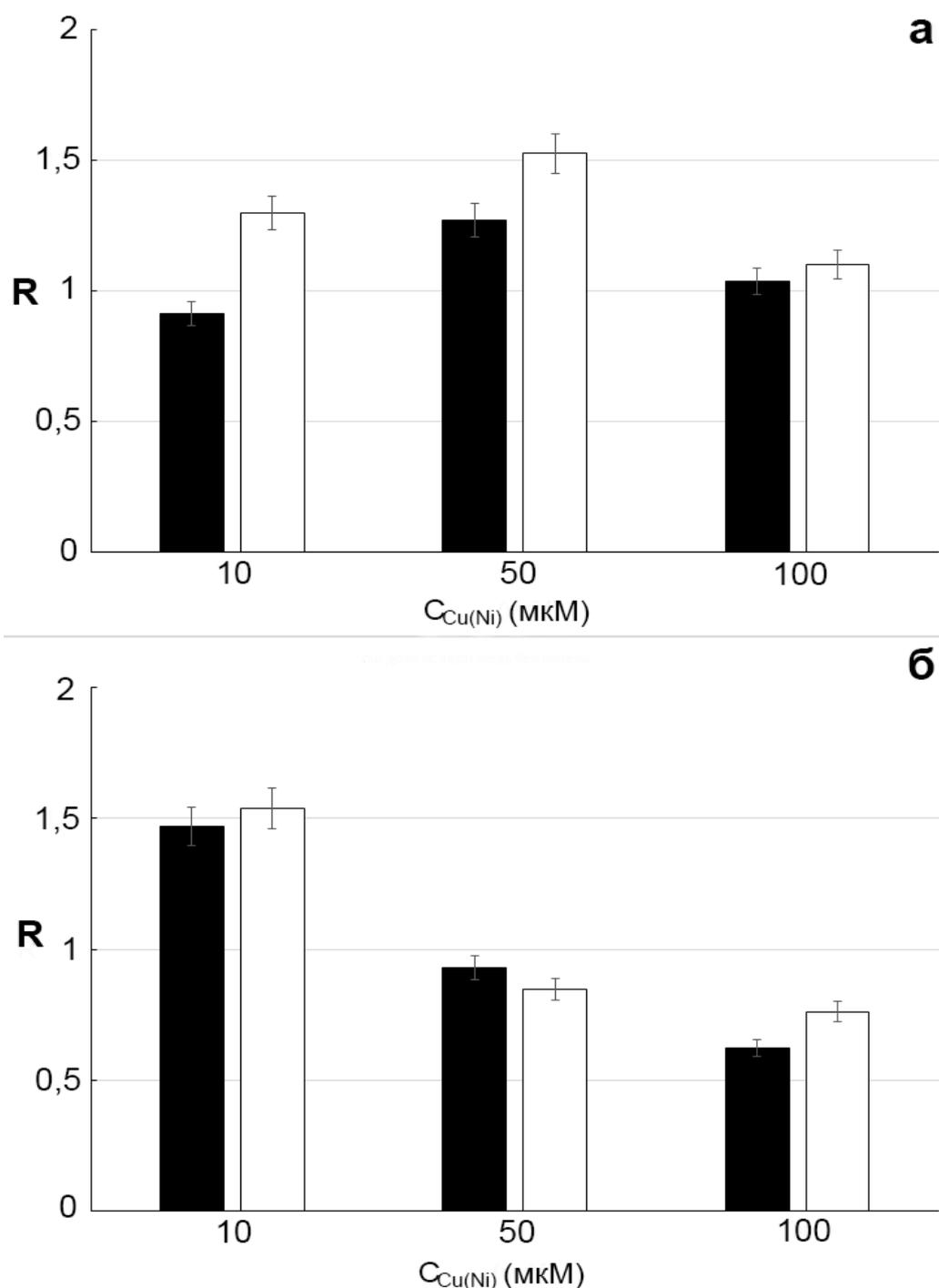


Рисунок 17. Отношение (R) содержания меди (черные прямоугольники) и никеля (белые прямоугольники) в клеточных стенках к содержанию этих металлов в корнях маша (а) и пшеницы (б) в расчете на сухую массу корней при разных концентрациях Cu и Ni в среде. КС были выделены из опытных растений (после 24 ч экспозиции на растворах $CuCl_2$ или $NiCl_2$). Значения $R < 1$ указывают на участие симпласта в накоплении Cu (Ni) в корне, $R > 1$ – на бóльшую Cu(Ni)-связывающую способность КС по сравнению с корнями растений. Приведены средние значения и их стандартные ошибки ($n=5-10$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании показано, что катионообменная способность клеточных стенок корней растений в физиологических условиях определяется наличием в них карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты (ПГК) и гидроксикоричных кислот (ГКК). У изученных видов содержание и карбоксильных групп ПГК ($S_{\text{ПГК}}$), и карбоксильных групп ГКК ($S_{\text{ГКК}}$) значительно различается: $S_{\text{ПГК}}$ возрастает в ряду кукуруза < пшеница < шпинат < сведа \approx нут < маш < вика (злаки < маревые < бобовые), а $S_{\text{ГКК}}$ – в ряду вика < нут < маш < пшеница < шпинат < кукуруза < сведа (бобовые < злаки \approx маревые). В интервале рН от 3 до 4 единиц в связывание и Cu^{2+} , и Ni^{2+} включаются только карбоксильные группы ПГК, при этом существует прямая корреляция между содержанием данных групп и содержанием металлов в КС корней различных видов растений. Было обнаружено, что у всех видов способность изолированных КС связывать ионы Cu^{2+} и Ni^{2+} возрастает с увеличением значений рН раствора, что обусловлено увеличением количества диссоциированных карбоксильных групп, способных участвовать в реакциях ионного обмена. Нами впервые показано, что при $\text{pH} \geq 5$ наряду с карбоксильными группами ПГК в связывании ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} принимают участие карбоксильные группы ГКК. Самые низкие значения $S_{\text{Cu(Ni)}}$ обнаружены у пшеницы и кукурузы, самые высокие – у бобовых (маш, вика, нут), при этом во всех случаях и во всем исследованном дискретном диапазоне рН S_{Cu} значительно выше, чем S_{Ni} .

Результаты наших экспериментов свидетельствуют о том, что медь более токсична для растений, чем никель. При воздействии 100 мкМ Cu мы наблюдали достоверное снижение сухой массы корней у обоих видов растений, а у маша оно было зафиксировано и при S_{Cu} 50 мкМ. В то же время присутствие никеля в среде даже в самой высокой концентрации не оказывало негативного эффекта на массу корней. Сухая масса надземной части растений не отличалась от контроля как при воздействии Cu , так и Ni . Противоположным было действие этих металлов на оводненность тканей: при S_{Cu} 50 и 100 мкМ наблюдалось возрастание оводненности корней у маша (предположительно из-за усиленной вакуолизации клеток и/или увеличения доли КС), тогда как присутствие никеля в среде вызывало

снижение этого показателя как для корней, так и для надземной части обоих видов, что, как известно, является одним из основных симптомов Ni-стресса у растений (Pandey, Sharma, 2002; Bashmakov et al., 2005; Gajewska et al., 2006).

Оба вида накапливали медь и никель главным образом в корнях, а в побегах обнаруживалось не более 10% от общего содержания металла в растении. Больше накопление Cu по сравнению с Ni в корне, но меньшее – в побегах также является следствием более прочного связывания меди с КС клеток корня и ее относительно низкой подвижности в растениях. Нами впервые было показано, что содержание Cu и Ni в тканях корня зависит не только от концентрации металла в среде выращивания, но и от количества растений, используемых в экспериментах, из чего следует, что при оценке токсического действия металла на растительный организм важно принимать во внимание соотношение объема среды к количеству растений. Cu- и Ni-связывающая способность корней и изолированных из них клеточных стенок возрастала параллельно с концентрацией ионов металлов в среде. При этом у маша значения обоих параметров выше, чем у пшеницы вследствие более высокого содержания карбоксильных групп ПГК в КС корней. В связывании никеля в КС у обоих растений участвуют только карбоксильные группы ПГК, тогда как у пшеницы в связывание меди при C_{Cu} 50 и 100 мкМ вовлекаются и карбоксильные группы ГКК. У растений маша при 10 мкМ меди и 100 мкМ никеля в среде происходило снижение металл-связывающей способности КС корней, что может быть обусловлено или снижением содержания карбоксильных групп ПГК или возрастанием степени их метилирования. Следует подчеркнуть, что в случае меди модификация КС наблюдается при нетоксичной для растений маша концентрации, тогда как в случае никеля – когда начинают проявляться симптомы Ni-стресса (снижение оводненности корней).

Сравнение металл-связывающей способности КС и корней растений показывает, что у маша при всех концентрациях КС вносит основной вклад в накопление этих металлов в корне в первые 24 ч поглощения. И можно предположить, что при 10 мкМ Cu и Ni в среде депонирование этих металлов в

апопласте корня является основным механизмом защиты от металл-стресса у мasha, так как не наблюдается ингибирования роста корня и надземной части.

У пшеницы при 100 мкМ металлов в среде КС может связать только 62% меди или 76% никеля от общего количества, накопленного в корнях, т.е. происходит накопление металлов не только в апопласте, но и в симпласте корней. Так как при 100 мкМ Cu наблюдалось снижение массы корней по сравнению с контролем, можно заключить, что накопление меди в симпласте токсично для растений пшеницы, в отличие от иммобилизации меди в апопласте корней при 10 и 50 мкМ Cu в среде, а также никеля при всех концентрациях, когда наблюдалось только снижение оводненности корней и надземной части.

Таким образом, основным механизмом, предотвращающим накопление меди и никеля в симпласте корня у растений мasha и пшеницы является депонирование этих ионов в апопласт корня. Некоторые исследователи полагают, что в поглощении металлов корнем при низких концентрациях основную роль играют внутриклеточные механизмы. Наши результаты не поддерживают такого заключения и показывают, что у пшеницы внутрь клеток корня медь и никель поступают только тогда, когда $\geq 90\%$ карбоксильных групп ПГК связаны с катионами Cu^{2+} или Ni^{2+} .

ВЫВОДЫ

1. Наряду с карбоксильными группами полигалактуроновой кислоты в составе пектинов, в связывании Cu^{2+} и Ni^{2+} клеточными стенками корней могут принимать участие карбоксильные группы гидроксикоричных кислот при рН среды выше 5,0.
2. Cu- и Ni-связывающая способность как корней всех изученных видов растений, так и изолированных из них клеточных стенок прямо пропорциональна содержанию карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты в клеточной стенке и возрастает при увеличении концентрации меди и никеля в растворе.
3. Основным механизмом, предотвращающим накопление меди и никеля в симпласте корня у растений маша и пшеницы, является депонирование этих ионов в апопласт корня, причем эффективность этого механизма прямо пропорциональна содержанию карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты в клеточных стенках.
4. У растений маша при определенных концентрациях Cu^{2+} и Ni^{2+} в среде происходит модификация стенок клеток корня, направленная на уменьшение количества сайтов связывания катионов металлов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андриянова Д.А., Мейчик Н.Р., Николаева Ю.И., Галанина Л.А., Теофилова Е.П. Изучение состава функциональных групп клеточной стенки мицелиальных грибов // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2010. Т. 1. С. 17.
2. Воробьев Д.В., Мейчик Н.Р., Лобакова Е.С., Ермаков И.П., Матвеева Н.П. Ионообменные свойства клеточных стенок, изолированных из таллома лишайника *Peltigera aphthosa* (L.) Willd. // Микробиология. Т. 78, № 5. С. 702–708.
3. Ермаков Д.В., Свиридов А.В., Ибатулина Ю.Р. Извлечение катионов меди (II) с помощью коллоидных сорбентов // Известия Челябинского научного центра. 2004. № 1 (22). С. 164–168.
4. Либинсон Г.С. Физико-химические свойства карбоксильных катионитов. М.: Наука, 1969.
5. Марченко З. Фотометрическое определение элементов. М.: Мир, 1971.
6. Мейчик Н.Р., Ермаков И.П., Савватеева М.В. Ионогенные группы клеточной стенки корней пшеницы // Физиология растений. 1999. Т. 46, № 4. С. 742–747.
7. Мейчик Н.Р., Ермаков И.П. Ионообменные свойства выделенных клеточных оболочек из корней люпина // Биохимия. 2001. Т. 66, № 5. С. 688–697.
8. Мейчик Н.Р., Ермаков И.П., Прокопцева О.С. Диффузия органического катиона в клеточных стенках корня // Биохимия. 2003. Т. 68, № 7. С. 926–940.
9. Мейчик Н.Р., Николаева Ю.И., Ермаков И.П. Ионообменные свойства клеточных стенок корней *Spinacia oleracea* L. при разных условиях засоления внешней среды // Биохимия. 2006а. Т. 71, № 7. С. 961–971.
10. Мейчик Н.Р., Матвеева Н.П., Николаева Ю.И., Чайкова А.В., Ермаков И.П. Особенности состава ионогенных групп полимерного матрикса оболочки пыльцевого зерна лилии // Биохимия. 2006б. Т. 71, № 8. С. 1103–1111.
11. Мейчик Н.Р., Николаева Ю.И., Ермаков И.П. Неводное титрование аминокрупп в составе структурных полимеров клеточных стенок растений // Биохимия. 2009а. Т. 74, № 8. С. 1145–1151.

12. Мейчик Н.Р., Смирнова А.В., Матвеева Н.П., Николаева Ю.И., Ермаков И.П. Изменение состава ионогенных групп оболочки пыльцевого зерна лилии при активации прорастания // Физиология растений. 2009б. Т. 56, № 2. С. 232–240.
13. Мейчик Н.Р., Попова Н.И., Николаева Ю.И., Ермаков И.П., Камнев А.Н. Ионообменные свойства клеточных стенок красной водоросли *Phyllophora crispa* // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47, № 2. С. 194–201.
14. Мейчик Н.Р., Воробьев Д.В. Хитин-глюкановый комплекс в клеточных стенках лишайника *Peltigera aphthosa* // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. Т. 48, № 3. С. 340–345.
15. Мейчик Н.Р., Николаева Ю.И., Кушунина М.А. Влияние дефицита азота на ионообменные свойства полимеров клеточных стенок корней пшеницы // Вестник Московского Университета. Серия 16. Биология. 2017. Т. 72, № 2. С. 87–91.
16. Серегин И.В., Кожевникова А.Д., Казюмина Е.М., Иванов В.Б. Токсическое действие и распределение никеля в корнях кукурузы // Физиология растений. 2003. Т. 50, № 5. С. 793–800.
17. Серегин И.В., Кожевникова А.Д. Физиологическая роль никеля и его токсическое действие на высшие растения // Физиология растений. 2006. Т. 53, № 2. С. 285–308.
18. Abdel-Ghany S.E., Müller-Moulé P., Niyogi K.K., Pilon M., Shikanai T. Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts // Plant Cell. 2005. Vol. 17. P. 1233–1251.
19. Alejandro S., Lee Y., Tohge T., et al. AtABCG29 is a monolignol transporter involved in lignin biosynthesis // Current Biology. 2012. Vol. 22. P. 1207–1212.
20. Allan D.L., Jarrel W.M. Proton and copper adsorption to maize and soybean root cell walls // Plant Physiology. 1989. Vol. 89. P. 823–832.
21. Ando Y., Nagata S., Yanagisawa S., Yoneyama T. Copper in xylem and phloem saps from rice (*Oryza sativa*): the effect of moderate copper concentrations in the growth medium on the accumulation of five essential metals and a speciation analysis of copper-containing compounds // Functional Plant Biology. 2012. Vol. 40. P. 89–100.

22. Araújo G.C.L., Lemos S.G., Nabais C. Nickel sorption capacity of ground xylem of *Quercus ilex* trees and effects of selected ligands present in the xylem sap // *Journal of Plant Physiology*. 2009. Vol. 166. P. 270–277.
23. Aschmann S.G., Zasoski R.J. Nickel and rubidium uptake by whole oat plants in solution culture // *Physiologia Plantarum*. 1987. Vol. 71. P. 191–196.
24. Bashmakov D.I., Lukatkin A.S., Revin V.V., Duchovskis P., Brazaitytė A., Baranauskis K. Growth of maize seedlings affected by different concentrations of heavy metals // *Ekologija*. 2005. Vol. 3. P. 22–27.
25. Benatti M.R., Yookongkaew N., Meenam M., Guo W.-J., Punyasuk N., Abu Qamar S., et al. Metallothionein deficiency impacts copper accumulation and redistribution in leaves and seeds of *Arabidopsis* // *New Phytologist*. 2014. Vol. 202. P. 940–951.
26. Bernal M., Casero D., Singh V., Wilson G.T., Grande A., Yang H., et al. Transcriptome sequencing identifies SPL7-regulated copper acquisition genes FRO4/FRO5 and the copper dependence of iron homeostasis in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2012. Vol. 24. P. 738–761.
27. Boija E., Johansson G. Interactions between model membranes and lignin-related compounds studied by immobilized liposome chromatography // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006. Vol. 1758. P. 620–626.
28. Bonawitz N.D., Chapple C. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype // *Annual Review of Genetics*. 2010. Vol. 44. P. 337–363.
29. Brady J., Sadler I., Fry S. Pulcherosine, an oxidatively coupled trimer of tyrosine in plant cell walls: Its role in cross-link formation // *Phytochemistry*. 1998. Vol. 47. P. 349–353.
30. Bravin M.N., Marti A.L., Clairotte M., Hinsinger P. Rhizosphere alkalization – a major driver of copper bioavailability over a broad pH range in an acidic, copper contaminated soil // *Plant Soil*. 2009. Vol. 318. P. 257–268.
31. Bravin M., Le Merrer B., Denaix L., Schneider A., Hinsinger P. Copper uptake kinetics in hydroponically-grown durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) as compared with soil's ability to supply copper // *Plant and Soil*. 2010. Vol. 331. P. 91–104.

32. Brown P.H., Welch R.M., Cary E.E., Checkai R.T. Beneficial effects of nickel on plant growth // *Journal of Plant Nutrition*. 1987. Vol. 10. P. 2125–2135.
33. Brynhildsen L., Rosswall T. Effects of metals on the microbial mineralization of organic acids // *Water Air Soil Pollution*. 1995. Vol. 94. P. 45–57.
34. Burkhead J.L., Reynolds K.A., Abdel-Ghany S.E., Cohu C.M., Pilon M. Copper homeostasis // *New Phytologist*. 2009. Vol. 182. P. 799–816.
35. Caffall K.H., Mohnen D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides // *Carbohydrate Research*. 2009. Vol. 344. P. 1879–1900.
36. Callahan D.L., Baker A.J.M., Kolev S.D., Wedd A.G. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants // *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2006. Vol. 11. P. 2–12.
37. Carpita N.C. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1996. Vol. 47. P. 445–476.
38. Carpita N.C., Gibeaut D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth // *Plant Journal*. 1993. Vol. 3. P. 1-30.
39. Cassab G.I. Plant cell wall proteins // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1988. Vol. 39. P. 321–353.
40. Cataldo D.A., Garland T.R., Wildung R.E. Nickel in plants. II. Distribution and chemical form in soybean plants // *Plant Physiology*. 1978. Vol. 62. P. 566–570.
41. Cataldo S., Gianguzza A., Pettignano A., Piazzese D., Sammartano S. Complex formation of copper(II) and cadmium(II) with pectin and polygalacturonic acid in aqueous solution. An ISE-H⁺ and ISE-Me²⁺ electrochemical study // *International Journal of Electrochemical Science*. 2012. Vol. 7. P. 6722-6737.
42. Chen Y.-T., Wang Y., Yeh K.-C. Role of root exudates in metal acquisition and tolerance // *Current Opinion in Plant Biology*. 2017. Vol. 39. P. 66–72.
43. Clemens S., Palmgren M.G., Krämer U. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation // *Trends in Plant Science*. 2002. Vol. 7, №7. P. 309–315.

44. Cohu C.M., Pilon M. Cell biology of copper // Cell Biology of Metals and Nutrients / eds.: H. Rüdiger, R.-R. Mendel. Heidelberg: Springer, 2010. P. 55–74.
45. Colzi I., Arnetoli M., Gallo A., Doumett S., Bubba M.D., Pignattelli S., Gabbrielli R., Gonnelli C. Copper tolerance strategies involving the root cell wall pectins in *Silene paradoxa* L. // Environmental and Experimental Botany. 2012. Vol. 78. P. 91–98.
46. Cosgrove D.J., Jarvis M.C. Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls // Frontiers in Plant Science. 2012. Vol. 22, № 3. P. 204.
47. Dalir N., Khoshgoftarmanesh A.H. Symplastic and apoplastic uptake and root to shoot translocation of nickel in wheat as affected by exogenous amino acids // Journal of Plant Physiology. 2014. Vol. 171. P. 531–536.
48. Dalir N., Khoshgoftarmanesh A.H. Root uptake and translocation of nickel in wheat as affected by histidine // Journal of Plant Physiology. 2015. Vol. 184. P. 8–14.
49. Darvill J.E., McNeil M., Darvill A.G., Albersheim P. Structure of plant cell walls. XI. Glucuronoarabinoxylan, a second hemicellulose in the primary cell walls of suspension-cultured sycamore cells // Plant Physiology. 1980. Vol. 66. P. 1135–1139.
50. Davarski K.A., Manolov S.N., Petrova I.N., Mavrov V.D. Complex equilibria in the system M^{2+} -polygalacturonic acid (pectin) - H_2O ($M = Co, Ni, Cu, Zn, Cd$ and Pb) // Journal of Coordination Chemistry. 1994. Vol. 33. P. 75-81.
51. Davis R.D., Beckett P.H.T. Upper critical levels of toxic elements in plants. II. Critical levels of copper in young barley, wheat, rape, lettuce and ryegrass, and of nickel and zinc in young barley and ryegrass // New Phytologist. 1978. Vol. 80. P. 23–32.
52. Del Pozo T., Cambiazo V., González M. Gene expression profiling analysis of copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana* // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2010. Vol. 393. P. 248–252.
53. Deng F., Yamaji N., Xia J., Ma J.F. A member of the heavy metal P-Type ATPase OsHMA5 is involved in xylem loading of copper in rice // Plant Physiology. 2013. Vol. 163. P. 1353–1362.
54. DiDonato R.J., Roberts L.A., Sanderson T., Eisley R.B., Walker E.L. Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane

- transporter of nicotianamine–metal complexes // *Plant Journal*. 2004. Vol. 39. P. 403–414.
55. Doblin M.S., Pettolino F., Bacic A. Plant cell walls, the skeleton of the plant world // *Functional Plant Biology*. 2010. Vol. 37. P. 357–381.
56. Ebringerova A., Hromadkova Z., Heinze T. Hemicellulose // *Advances in Polymer Science*. 2005. Vol. 186. P. 1–67.
57. Eticha D., Stass A., Horst W.J. Cell-wall pectin and its degree of methylation in the maize root-apex: significance for genotypic differences in aluminium resistance // *Plant Cell and Environment*. 2005. Vol. 28. P. 1410–1420.
58. Fageria N.K., Stone L.F. Physical, chemical and biological changes in the rhizosphere and nutrient availability // *Journal of Plant Nutrition*. 2006. Vol. 29. P. 1327–1356.
59. Feiz L., Irshad M., Pont-Lezica R.F., Canut H., Jamet E. Evaluation of cell wall preparations for proteomics: a new procedure for purifying cell walls from *Arabidopsis* hypocotyls // *Plant Methods*. 2006. Vol. 2. P. 10.
60. Field T.B., McCourt J.L., McBryde W.A.E. Composition and stability of iron and copper citrate complexes in aqueous solution // *Canadian Journal of Chemistry*. 1974. Vol. 52, № 17. P. 3119–3124.
61. Fry S.C., York W.S., Albersheim P., Darvill A., Hayashi T., et al. An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides // *Physiologia Plantarum*. 1993. Vol. 89, № 1. P. 1–3.
62. Fry S.C., Miller J.G., Dumville J.C. A proposed role for copper ions in cell wall loosening // *Plant and Soil*. 2002. Vol. 247. P. 57–67.
63. Gabbrielli R., Pandolfini T., Espen L., Palandri M.R. Growth, peroxidase activity and cytological modifications in *Pisum sativum* seedlings exposed to Ni²⁺ toxicity // *Journal of Plant Physiology*. 1999. Vol. 155. P. 639–645.
64. Gajewska E., Sklodowska M. Antioxidative responses and proline level in leaves and roots of pea plants subjected to nickel stress // *Acta Physiologiae Plantarum*. 2005. Vol. 27. P. 329–339.

65. Gajewska E., Sklodowska M., Slaba M., Mazur J. Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots // *Biologia Plantarum*. 2006. Vol. 50. P. 653–659.
66. Grabber J.H. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies // *Crop Science*. 2005. Vol. 45. P. 820–831.
67. Grignon C., Sentenac H. pH and ionic conditions in the apoplast // *Annual Review of Plant Physiology*. 1991. Vol. 42. P. 103–128.
68. Guigues S., Bravin M., Garnier C., Masion A., Doelsch E. Isolated cell walls exhibit cation binding properties distinct from those of plant roots // *Plant and Soil*. 2014. Vol. 381. P. 367–379.
69. Guo W.-J., Bundithya W., Goldsbrough P.B. Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper // *New Phytologist*. 2003. Vol. 159. P. 369–381.
70. Hall J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance // *Journal of Experimental Botany*. 2002. Vol. 53. P. 1–11.
71. Haynes R.J. Ion exchange properties of roots and ionic interactions within the root apoplast: their role in ion accumulation by plants // *Botanical Review*. 1980. Vol. 46. P. 75–99.
72. Helfferich F. Ion exchange. New York: Mc Graw-Hill Publ, 1962.
73. Ingle R.A., Fricker M.D., Smith J.A. Evidence for nickel/proton antiport activity at the tonoplast of the hyperaccumulator plant *Alyssum lesbiacum* // *Plant Biology*. 2008. Vol. 10, № 6. P. 746–753.
74. Iwasaki K., Sakurai K., Takahashi E. Copper binding by the root cell walls of Italian ryegrass and red clover // *Soil Science and Plant Nutrition*. 1990. Vol. 36. P. 431–439.
75. Jarvis M.C., Briggs S.P.H., Knox J.P. Intercellular adhesion and cell separation in plants // *Plant Cell and Environment*. 2003. Vol. 26. P. 977–989.
76. Jose-Estanyol M., Puigdomenech P. Plant cell wall glycoproteins and their genes // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2000. Vol. 38. P. 97–108.

77. Kang X., Kirui A., Widanage M.C.D., Mentink-Vigier F., Cosgrove D.J., Wang T. Lignin-polysaccharide interactions in plant secondary cell walls revealed by solid-state NMR // *Nature Communications*. 2019. Vol. 10. P. 347.
78. Kartel M.T., Kupchik L.A., Veisov B.K. Evaluation of pectin binding of heavy metal ions in aqueous solutions // *Chemosphere*. 1999. Vol. 38, №11. P. 2591–2596.
79. Keegstra K., Talmadge K.W., Bauer W.D., Albersheim, P. The structure of plant cell walls: III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components // *Plant Physiology*. 1973. Vol. 51. P. 188–197.
80. Kerkeb L., Krämer U. The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea* // *Plant Physiology*. 2003. Vol. 131, №2. P. 716–724.
81. Kholodova V.P., Ivanova E.M., Kuznetsov V.I. Initial steps of copper detoxification: outside and inside of plant cell // *Detoxification of Heavy Metals* / eds.: I. Sherameti, A. Varma. Berlin–Heidelberg: Springer, 2011. P. 143–167.
82. Kim S.H., Lee C.M., Kafle K. Characterization of crystalline cellulose in biomass: basic principles, applications, and limitations of XRD, NMR, IR, Raman, and SFG // *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2013. Vol. 30. P. 2127–2141.
83. Kinraide T.B. Possible influence of cell walls upon ion concentrations at plasma membrane surfaces. Toward a comprehensive view of cell-surface electrical effects upon ion uptake, intoxication, and amelioration // *Plant Physiology*. 2004. Vol. 136. P. 3804–3813.
84. Kinraide T.B. Improved scales for metal ion softness and toxicity // *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2009. Vol. 28. P. 525–533.
85. Kinraide T.B., Yermiyahu U. A scale of metal ion binding strengths correlating with ionic charge, Pauling electronegativity, toxicity, and other physiological effects // *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2007. Vol. 101, № 9. P. 1201–1213.
86. Klaumann S., Nickolaus S.D., Fürst S.H., Starck S., Schneider S., Neuhaus H.E., Trentmann O. The tonoplast copper transporter COPT5 acts as an exporter and is required

- for interorgan allocation of copper in *Arabidopsis thaliana* // *New Phytologist*. 2011. Vol. 192. P. 393–404.
87. Klavons J.A., Bennett R.D. Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1986. Vol. 34. P. 597–599.
88. Konno H., Nakato T., Nakashima S., Katoh K. *Lygodium japonicum* fern accumulates copper in the cell wall pectin // *Journal of Experimental Botany*. 2005. Vol. 56. P. 1923–1931.
89. Konno H., Nakashima S., Katoh K. Metal-tolerant moss *Scopelophila cataractae* accumulates copper in the cell wall pectin of the protonema // *Journal of Plant Physiology*. 2010. Vol. 167. P. 358–364.
90. Kopittke P.M., Menzies N.W. Effect of Cu toxicity on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*) // *Plant and Soil*. 2006. Vol. 279. P. 287–296.
91. Kopittke P.M., Asher C.J., Kopittke R.A., Menzies N.W. Toxic effects of Ni²⁺ on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*) // *Plant and Soil*. 2007. Vol. 292. P. 283–289.
92. Kopittke P.M., Blamey F.P.C., Menzies N.W. Toxicities of soluble Al, Cu, and La include ruptures to rhizodermal and root cortical cells of cowpea // *Plant and Soil*. 2008. Vol. 303. P. 217–227.
93. Kopittke P.M., Menzies N.W., de Jonge M.D., McKenna B.A., Donner E., et al. In situ distribution and speciation of toxic copper, nickel, and zinc in hydrated roots of cowpea // *Plant Physiology*. 2011. Vol. 156. P. 663–673.
94. Krämer U., Pickering I.J., Prince R.C., Raskin I., Salt D.E. Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species // *Plant Physiology*. 2000. Vol. 122. P. 1343–1353.
95. Krämer U. Metal hyperaccumulation in plants // *Annual Review of Plant Biology*. 2010. Vol. 61, № 1. P. 517–534.
96. Krzesłowska M. The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy // *Acta Physiologiae Plantarum*. 2011. Vol. 33. P. 35–51.

97. Lamport D., Kieliszewski M., Chen Y., Cannon M. Role of the extensin superfamily in primary cell wall architecture // *Plant Physiology*. 2011. Vol. 156. P. 11–19.
98. Lee W.M., An Y.J., Yoon H., Kweon H.S. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles // *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2008. Vol. 27. P. 1915–1921.
99. Lequeux H., Hermans C., Lutts S., Verbruggen N. Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010. Vol. 48. P. 673–682.
100. L’Huillier L., D’Auzac J., Durand M., Michaud-Ferriere N. Nickel effects on two maize (*Zea mays*) cultivars: growth, structure, Ni concentration, and location // *Canadian Journal Botany*. 1996. Vol. 74. P. 1547–1554.
101. Li Z., Wu L., Hu P., Luo Y., Christie P. Copper changes the yield and cadmium/zinc accumulation and cellular distribution in the cadmium/zinc hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola* // *Journal of Hazardous Materials*. 2013. Vol. 261. P. 332–341.
102. Liao M.T., Hedley M.J., Woolley D.J., Brooks R.R., Nichols M.A. Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv Grasslands Puna) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Rondy) plants grown in NFT system. II. The role of nicotianamine and histidine in xylem sap copper transport // *Plant and Soil*. 2000. Vol. 223. P. 243–252.
103. Lin C.-C., Chen L.-M., Liu Z.-H. Rapid effect of copper on lignin biosynthesis in soybean roots // *Plant Science*. 2005. Vol. 168. P. 855–861.
104. Liu D., Kottke I. Subcellular localization of chromium and nickel in root cells of *Allium cepa* by EELS and ESI // *Cell Biology and Toxicology*. 2003. Vol. 19. P. 299–311.

105. 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. Vol. 9. e109573.
106. Lou L., Shen Z., Li X. The copper tolerance mechanisms of *Elsholtzia haichowensis*, a plant from copper-enriched soils // Environmental and Experimental Botany. 2004. Vol. 51. P. 111-120.
107. Mangeon A., Junqueira R., Sabetto-Martins G. Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily // Plant Signaling & Behavior. 2010. Vol. 5. P. 99–104.
108. Marschner H. Mineral nutrition of higher plants, 2nd ed. London: Academic Press, 1995.
109. McNeil M., Darvill A.G., Fry S.C., Albersheim P. Structure and function of the primary cell walls of plants // Annual Review of Biochemistry. 1984. Vol. 53. P. 625–663.
110. Merlot S., Hannibal L., Martins S., Martinelli L., Amir H., Lebrun M., Thomine S. The metal transporter PgIREG1 from the hyperaccumulator *Psychotria gabriellae* is a candidate gene for nickel tolerance and accumulation // Journal of Experimental Botany. 2014. Vol. 65, №6. P. 1551-1564.
111. Meychik N.R., Yermakov I.P. A new approach to the investigation on the ionogenic groups of root cell walls // Plant and Soil. 1999. Vol. 217. P. 257–264.
112. Meychik N.R., Yermakov I.P. Ion exchange properties of plant root cell walls // Plant and Soil. 2001. Vol. 234, № 2. P. 181–193.
113. Meychik N.R., Nikolaeva J.I., Yermakov I.P. Ion exchange properties of the root cell walls isolated from halophyte plants (*Suaeda altissima* L.) grown under conditions of different salinity // Plant and Soil. 2005. Vol. 277. P. 163–174.
114. Michaud A.M., Chappellaz C., Hinsinger P. Copper phytotoxicity affects root elongation and iron nutrition in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) // Plant and Soil. 2008. Vol. 310. P. 151-165.
115. Migocka M., Posyniak E., Maciaszczyk-Dziubińska E., Papierniak A., Kosieradzka A. Functional and biochemical characterization of cucumber genes encoding

- two copper ATPases CsHMA5.1 and CsHMA5.2 // *Journal of Biological Chemistry*. 2015. Vol. 290. P. 15717–15729.
116. Mihailovic N., Drazic G. Incomplete alleviation of nickel toxicity in bean by nitric oxide supplementation // *Plant Soil and Environment*. 2011. Vol. 57. P. 396–401.
117. Milner M. J., Seamon J., Craft E., Kochian L. V. Transport properties of members of the ZIP family in plants and their role in Zn and Mn homeostasis // *Journal of Experimental Botany*. 2013. Vol. 64. P. 369–381.
118. Miras R., Morin I., Jacquin O., Cuillel M., Guillain F., Mintz E. Interplay between glutathione, Atx1 and copper. 1. Copper(I) glutathionate induced dimerization of Atx1 // *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2008. Vol. 13, № 2. P. 195–205.
119. Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis // *Current Opinion in Plant Biology*. 2008. Vol. 11. P. 266–277
120. Moradi A.B, Swoboda S., Robinson B., Prohaska T., Kaestner A., Oswald S.E., Wenzel W.W., Schulin R. Mapping of nickel in root cross-sections of the hyperaccumulator plant *Berkheya coddii* using laser ablation ICP-MS // *Environmental and Experimental Botany*. 2010. Vol. 69. P. 24–31.
121. Morrissey J., Baxter I.R., Lee J., Li L., Lahner B., et al. The Ferroportin metal efflux proteins function in iron and cobalt homeostasis in *Arabidopsis* // *The Plant Cell*. 2009. Vol. 21. P. 3326–3338.
122. Morvan C., Demarty M., Thellier M. Titration of isolated cell walls of *Lemna minor* L. // *Plant Physiology*. 1979. Vol. 63. P. 1117–1122.
123. Nishida S., Tsuzuki C., Kato A, Aisu A, Yoshida J, Mizuno T. AtIRT1, the primary iron uptake transporter in the root, mediates excess nickel accumulation in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Physiology*. 2011. Vol. 52, № 8. P. 1433–1442.
124. Nishizono H., Ichikawa H., Suziki S., Ishii F. The role of the root cell wall in the heavy metal tolerance of *Athyrium yokoscense* // *Plant and Soil*. 1987. Vol. 101. P. 15–20.
125. Oehme D.P., Downton M.T., Doblin M.S., Wagner J., Gidley M.J., Bacic A. Unique aspects of the structure and dynamics of elementary I β cellulose microfibrils revealed by computational simulations // *Plant Physiology*. 2015. Vol. 168. P. 3–17.

126. Ouzounidou G., Ciamporova M., Moustakas M., Karataglis S. Responses of maize (*Zea mays* L.) plants to copper stress. I. Growth, mineral content and ultrastructure of roots // *Environmental and Experimental Botany*. 1995. Vol. 35. P. 167-176.
127. Palacios G., Gómez I., Carbonell-Barrachina A., Navarro Pedreño J., Mataix J., Effect of nickel concentration on tomato plant nutrition and dry matter yield // *Journal of Plant Nutrition*. 1998. Vol. 21. P. 2179–2191.
128. Pandey N., Sharma C.P. Effect of heavy metals Co^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} on growth and metabolism of cabbage // *Plant Science*. 2002. Vol. 163. P. 753–758.
129. Pandolfini T., Gabrielli R., Comparini C. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. // *Plant Cell and Environment*. 1992. Vol. 15. P. 719–725.
130. Peña M.J., Kulkarni A.R., Backe J., Boyd M., O'Neill M.A., York W.S. Structural diversity of xylans in the cell walls of monocots // *Planta*. 2016. Vol. 244. P. 589–606.
131. Peng H., Yang X., Tian S. Accumulation and ultrastructural distribution of copper in *Elsholtzia splendens* // *Journal of Zhejiang University Science B*. 2005. Vol. 6. P. 311-318.
132. Persans M.W., Nieman K., Salt D.E. Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001. Vol. 98. P. 9995–10000.
133. Piccini D.F., Malavolta E. Effect of nickel on two common bean cultivars // *Journal of Plant Nutrition*. 1992. Vol. 15. P. 2343–2350.
134. Pich A., Scholz G. Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): nicotianamine–stimulated copper transport in the xylem // *Journal of Experimental Botany*. 1996. Vol. 47. P. 41–47.
135. Pilon M. Moving copper in plants // *New Phytologist*. 2011. Vol. 192. P. 305–307.
136. Popper Z.A., Fry S.C. Xyloglucan–pectin linkages are formed intraprotoplasmically, contribute to wall-assembly, and remain stable in the cell wall // *Planta*. 2008. Vol. 227. P. 781-794.

137. Rahman H., Sabreen S., Alam S., Kawai S. Effects of nickel on growth and composition of metal micronutrients in barley plants grown in nutrient solution // *Journal of Plant Nutrition*. 2005. Vol. 28. P. 393–404.
138. Ralet M.C., Andre-Leroux G., Quemener B., Thibault J.F. Sugar beet (*Beta vulgaris*) pectins are covalently cross-linked through diferulic bridges in the cell wall // *Phytochemistry*. 2005. Vol. 66. P. 2800–2814.
139. Redjala T., Sterckeman T., Skiker S., Echevarria G. Contribution of apoplast and symplast to short term nickel uptake by maize and *Leptoplax emarginata* roots // *Environmental and Experimental Botany*. 2010. Vol. 68. P. 99–106.
140. Renard C.M., Jarvis M.C. A cross-polarization, magic-angle spinning, ¹³C-nuclear-magnetic-resonance study of polysaccharides in sugar beet cell walls // *Plant Physiology*. 1999. Vol. 119. P. 1315–1322.
141. Rennie E.A., Scheller H.V. Xylan biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014. Vol. 26. P. 100-107.
142. Rhodes D.I., Sadek M., Stone B.A. Hydroxycinnamic acids in walls of wheat aleurone cells // *Journal of Cereal Science*. 2002. Vol. 36. P. 67–81.
143. Richau K.H., Kozhevnikova A.D., Seregin I.V., Vooijs R., Koevoets P.L.M., Smith J.A.C., Ivanov V.B., Schat H. Chelation by histidine inhibits the vacuolar sequestration of nickel in roots of the hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens* // *New Phytologist*. 2009. Vol. 183. P. 106–116.
144. Richter C., Dainty L. Ion behavior in plant cell walls. I. Characterization of the *Sphagnum russowii* cell wall ion exchanger // *Canadian Journal of Botany*. 1989. Vol. 67. P. 451–459.
145. Ridley B.L., O'Neill M.A., Mohnen D. Pectins: structure, biosynthesis and oligogalaturonide-related signaling // *Phytochemistry*. 2001. Vol. 57. P. 929–967.
146. Riesen O., Feller U. Redistribution of nickel, cobalt, manganese, zinc and cadmium via the phloem in young and in maturing wheat // *Journal of Plant Nutrition*. 2005. Vol. 28. P. 421–430.

147. Robinson S.P., Downton W.J.S. Potassium, sodium, and chloride content of isolated intact chloroplasts in relation to ionic compartmentation in leaves // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1984. Vol. 228. P. 197–206.
148. Ryan B.M., Kirby J.K., Degryse F., Harris H., McLaughlin M.J., Scheiderich K. Copper speciation and isotopic fractionation in plants: uptake and translocation mechanisms // *New Phytologist*. 2013. Vol. 199. P. 367–378.
149. Sattelmacher B. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition // *New Phytologist*. 2001. Vol. 149. P. 167–192.
150. Saulnier L., Thibault J.-F. Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1999. Vol. 79. P. 396–402.
151. Schaaf G., Ludewig U., Erenoglu B.E., Mori S., Kitahara T., von Wirén N. ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals // *Journal of Biological Chemistry*. 2004. Vol. 279, №10. P. 9091–9096.
152. Scheller H.V., Ulvskov P. Hemicelluloses // *Annual Review of Plant Biology*. 2010. Vol. 61. P. 263–289.
153. Schultink A., Liu L., Zhu L., Pauly M. Structural diversity and function of xyloglucan sidechain substituents // *Plants*. 2014. Vol. 3, №4. P. 526–542.
154. Senden M.H.M.N., Van der Meer A.J.G.M., Verburg T.G., Wolterbeek H.T. Citric acid in tomato plant roots and its effect on cadmium uptake and distribution // *Plant and Soil*. 1995. Vol. 171. P. 333–339.
155. Shi J., Wu B., Yuan X., Cao Y.Y., Chen X., Chen Y., Hu T. An x-ray absorption spectroscopy investigation of speciation and biotransformation of copper in *Elsholtzia splendens* // *Plant and Soil*. 2008. Vol. 302. P. 163–174.
156. Showalter A.M., Keppler B., Lichtenberg J., Gu D., Welch L.R. A bioinformatics approach to the identification, classification, and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins // *Plant Physiology*. 2010. Vol. 153. P. 485–513.
157. Straczek A., Sarret G., Manceau A., Hinsinger P., Geoffroy N., Jaillard B. Zinc distribution and speciation in roots of various genotypes of tobacco exposed to Zn // *Environmental and Experimental Botany*. 2008. Vol. 63. P. 80–90.

158. Talbot L.D., Ray P.M. Molecular size and separability features of pea cell wall polysaccharides // *Plant Physiology*. 1992. Vol. 98. P. 357–368.
159. Tan L., Showalter A., Egelund J., Hernandez-Sanchez A., Doblin M., Bacic A. Arabinogalactan-proteins and the research challenges for these enigmatic plant cell surface proteoglycans // *Frontiers in Plant Science*. 2012. Vol. 3. e140.
160. Taylor G.J., Foy C.D. Differential uptake and toxicity of ionic and chelated copper in *Triticum aestivum* // *Canadian Journal of Botany*. 1985. Vol. 63. P. 1271–1275.
161. Thompson J.E., Fry S.C. Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells // *Planta*. 2000. Vol. 211. P. 275–286.
162. Torres-Mancera M.T., Cordova-López J., Rodríguez-Serrano G., Roussos S., Ramírez-Coronel A., Favela-Torres E., Saucedo-Castañeda G. Enzymatic extraction of HAs from coffee pulp // *Food Technology and Biotechnology*. 2011. Vol. 49. P. 369–373.
163. Vacchina V., Mari S., Czernic P., Marquès L., Pianelli K., Schaumlöffel D., Lebrun M., Łobiński R. Speciation of nickel in a hyperaccumulating plant by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectroscopy and electrospray MS/MS assisted by cloning using yeast complementation // *Analytical Chemistry*. 2003. Vol. 75. P. 2740–2745.
164. Vogel J. Unique aspects of the grass cell wall // *Current Opinion in Plant Biology*. 2008. Vol. 11. P. 301–307.
165. Vuletić M., Hadži-Tašković S.V., Marković K., Kravić N., Vučinić Ž., Maksimović V. Differential response of antioxidative systems of maize (*Zea mays* L.) roots cell walls to osmotic and heavy metal stress // *Plant Biology*. 2014. Vol. 16. P. 88–96.
166. Walker C.D., Graham R.D., Madison J.T., Cary E.E., Welch R.M. Effects of Ni deficiency on some nitrogen metabolites in cowpeas (*Vigna unguiculata* L. Walp) // *Plant Physiology*. 1985. Vol. 79. P. 474–479.
167. Wang W., Zhao X.Q., Chen R.F., Dong X.Y., Lan P., Ma J.F., Shen R.F. Altered cell wall properties are responsible for ammonium-reduced aluminum accumulation in rice roots // *Plant Cell and Environment*. 2015. Vol. 38, № 7. P. 1382–1390.

168. Wei L., Luo Ch., Li X., Shen Zh. Copper accumulation and tolerance in *Chrysanthemum coronarium* L. and *Sorghum sudanense* L. // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 2008. Vol. 55. P. 238–246.
169. White P.J. The pathways of calcium movement to the xylem // Journal of Experimental Botany. 2001. Vol. 52. P. 891-899.
170. White P.J., Whiting S.N., Baker A.J.M., Broadley M.R. Does zinc move apoplastically to the xylem in roots of *Thlaspi caerulescens*? // New Phytologist. 2002. Vol. 153. P. 199-211.
171. Willats W.G.T., McCartney L., Mackie W., Knox P. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis // Plant Molecular Biology. 2001. Vol. 47. P. 9–27.
172. Xiong J., Yang Y., Fu G., Tao L. Novel roles of hydrogen peroxide (H₂O₂) in regulating pectin synthesis and demethylesterification in the cell wall of rice (*Oryza sativa*) root tips // New Phytologist. 2015. Vol. 206. P. 118-126.
173. Yadava P.C., Ghose A.K., Yadava K.L., Dey A.K. Stability constants of oxalate complexes of copper (II) and nickel (II) by paper electrophoresis // Chromatographia. 1976. Vol. 9. P. 410.
174. Yang J.L., Zhu X.F., Peng Y.X., Zheng C., Li G.X., Liu Y., Shi Y.Z., Zheng S.J. Cell wall hemicellulose contributes significantly to Al adsorption and root growth in *Arabidopsis* // Plant Physiology. 2011. Vol. 155. P. 1885–1892.
175. Yang X., Baligar V.C., Martens D.C., Clark R.B. Plant tolerance to nickel toxicity: II. Nickel effects on influx and transport of mineral nutrients in four plant species // Journal of Plant Nutrition. 1996. Vol. 19. P. 265–279.
176. Yang X.E., Baligar V.C., Foster J.C., Martens D.C. Accumulation and transport of nickel in relation to organic acids in ryegrass and maize grown with different nickel levels // Plant and Soil. 1997. Vol. 196. P. 271–276.
177. Yuan M., Li X., Xiao J., Wang S. Molecular and functional analyses of COPT/Ctr-type copper transporter-like gene family in rice // BMC Plant Biology. 2011. Vol. 11. 69.
178. Zhang Q., Cheetamun R., Dhugga K.S., Rafalski J.A., Tingey S.V., et al. Spatial gradients in cell wall composition and transcriptional profiles along elongating maize internodes // BMC Plant Biology. 2014. Vol. 14. 27.

179. Zhao F.J., Hamon R.E., Lombi E., McLaughlin M.J., McGrath S.P. Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* // Journal of Experimental Botany. 2002. Vol. 53. P. 535–543.
180. Zykwinska A., Thibault J.F., Ralet M.C. Competitive binding of pectin and xyloglucan with primary cell wall cellulose // Carbohydrate Polymers. 2008. Vol. 74. P. 957–961.