

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.1

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИОНООБМЕННЫХ СВОЙСТВ ПОЛИМЕРНОГО МАТРИКСА КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК ГАЛОФИТА И ГЛИКОФИТА ИЗ СЕМЕЙСТВА AMARANTHACEAE-CHENOPODIACEAE

© 2023 г. Н. Р. Мейчик^а, *, Ю. И. Николаева^а, М. А. Кушунина^а

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

*e-mail: meychik@mail.ru

Поступила в редакцию 04.04.2023 г.

После доработки 17.04.2023 г.

Принята к публикации 17.04.2023 г.

Исследованы ионообменные свойства полимерного матрикса клеточных стенок, которые были выделены из листьев 55-дневных растений *Spinacia oleracea* L. сорта Матадор, выращенных на питательном растворе в присутствии 0.5, 150 и 250 мМ NaCl и листьев растений *Suaeda altissima* (L.) Pall того же возраста, которые росли в присутствии 0.5, 250 и 750 мМ NaCl. Ионообменная способность клеточных стенок оценена при разных значениях pH и ионной силы раствора. Получены данные о существовании в структуре клеточной стенки листьев трех типов катионообменных групп: двух карбоксильных, первая из которых принадлежит остатку галактуроновой кислоты, и фенольных ОН-групп. Определено количество групп каждого типа и константы их ионизации и показано, что качественный состав ионообменных групп в клеточных стенках листьев этих растений одинаков и не зависит от условий питания. Однако в зависимости от концентрации соли в среде выращивания в клеточных стенках и гликофита, и галофита изменяется количество карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты. Отмечено, что такое изменение в составе функциональных групп полимеров клеточной стенки у галофита выражено более ярко и, вероятно, является одной из ответных реакций этих растений на засоление. Показано, что резкое повышение концентрации NaCl в среде приводит к снижению pH в экстраклеточном водном пространстве вследствие реакций обмена между ионами натрия, поступающими из внешнего раствора, и протонами карбоксильных групп клеточных стенок. Результаты проанализированы с точки зрения участия клеточных стенок листьев в ответных реакциях на засоление.

Ключевые слова: *Spinacia oleracea*, *Suaeda altissima*, засоление, ионообменные свойства, клеточная стенка, листья, сведа, шпинат

DOI: 10.31857/S0015330323600316, EDN: QXIQUP

ВВЕДЕНИЕ

Преодоление неблагоприятного воздействия засоления почв на растения представляет серьезную проблему, над решением которой работают специалисты разного профиля. В настоящее время известно, что одна из основных стратегий в адаптации растений к высоким концентрациям солей, проявляющаяся на клеточном уровне, состоит в поддержании низких концентраций ионов Na^+ и Cl^- в цитоплазме. Это достигается за счет селективности (ионной избирательности) транспортных систем плазмалеммы, через которые K^+ и Na^+ поступают в клетки, и экспорта натрия из цитоплазмы. Активность этих транспортных систем вносит существенный вклад в определение цитоплазматического отношения K^+/Na^+ ,

являющегося одним из показателей солеустойчивости растений [1, 2]. Кроме того, клетки поддерживают осмотический потенциал, обеспечивающий поглощение воды в условиях засоления за счет синтеза осмолитов в цитоплазме и процессов компартментации Na^+ , K^+ и Cl^- в вакуоли [3].

Солеустойчивость растений зависит от распределения ионов Na^+ и Cl^- по органам и тканям, активности ион-транспортующих систем в разных тканях и, что особенно важно, от путей передвижения ионов Na^+ и Cl^- в целом растении [4]. На уровне целого организма солеустойчивость проявляется в поддержании градиента водного потенциала в системе почва–корень–побег, а также низких концентраций ионов натрия и хлорида в молодых, активно метаболизирующих частях растений, в первую очередь, в меристеме и генеративных органах [5].

Сокращения: ГKK — гидроксикоричные кислоты, КС — клеточная стенка, ПГK — полигалактуроновая кислота.

Высокая солеустойчивость двудольных галофитов, например, из семейства *Amaranthaceae*–*Chenopodiaceae*, основывается на поддержании низких концентраций ионов натрия и хлорида в цитозоле, компартментации этих ионов в вакуоли и использовании Na^+ для поддержания тургора. Накопление ионов в вакуолях позволяет избежать токсического действия больших концентраций Na^+ и Cl^- и обеспечивает поддержание более низкого водного потенциала в этом компартменте по сравнению с почвенным раствором [6, 7]. В условиях засоления у галофитов наблюдается усиление роста, вызванное стимулирующим влиянием натрия на рост клеток растяжением и водный баланс растения. Однодольные галофиты поглощают меньше Na^+ по сравнению с двудольными и способны поддерживать высокую концентрацию K^+ в тканях надземных органов. В этом случае необходимое осмотическое давление и тургор в клетках в большей степени достигается за счет синтеза органических кислот и сахаров, а также накопления ионов калия [8].

У гликофитов большое значение в формировании солерезистентности имеет ограничение входящих потоков натрия и хлорида в корни и их транспорта к надземным органам [9]. На примере большого числа сельскохозяйственных культур было показано, что более устойчивые виды обладают большей способностью исключать Na^+ из клеток тканей листьев и поддерживать высокий уровень K^+ в них [10]. При засолении скорость роста листьев большинства злаковых культур была обратно пропорциональна содержанию Na^+ в клетках листьев. Однако, в отличие от однодольных, для двудольных видов не всегда была характерна подобная корреляция. Например, солеустойчивый дикий вид томата *Lycopersicon peruvianum* накапливал больше Na^+ в тканях надземных органов по сравнению с культурным видом *L. esculentum* [10].

Описанные выше стратегии выживания растений в условиях повышенной солености в той или иной степени свойственны как галофитам, так и гликофитам [4]. Существует мнение, что физиологические функции и биохимические процессы у двух групп растений различаются скорее в количественном отношении, чем в качественном [11]. Вероятно, это отличие заключается в разной степени использования сходных клеточных механизмов, которые у галофитов приводят к более эффективной работе систем поддержания водного и ионного гомеостаза по сравнению с гликофитами (синтеза осмолитов, ионного гомеостатирования и детоксикации).

Исследованию особенностей функционирования клеточных стенок (КС) корней растений как природных ионообменников в условиях засоления посвящены немногочисленные публикации [12–15]. Сравнительные исследования такого плана,

проведенные на листьях галофитов и гликофитов, в литературе отсутствуют, хотя изучение особенностей КС этих органов крайне важно для выявления механизмов солеустойчивости. В настоящей работе определены ионообменные свойства КС листьев галофита и гликофита, которые обсуждаются в связи с возможным вкладом указанных свойств в адаптацию растений к условиям солевого стресса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили 55-дневные растения галофита *Suaeda altissima* (L.) Pall. (сведа) и гликофита *Spinacia oleracea* L. сорта Матадор (шпинат). Семена растений в течение двух недель проращивали во влажном песке (сведа) или вермикулите (шпинат), а затем проростки пересаживали на питательный раствор [16]. Растения росли в оранжерее при дневной температуре воздуха 25°C и ночной 18°C , при естественном освещении с подсветкой лампами ДРЛ-1000, при освещенности 25–30 кЛюкс. Четырехнедельные растения подвергали засолению, внося в питательный раствор NaCl каждые 2–3 дня таким образом, чтобы концентрация NaCl в сосуде увеличивалась не более чем на 50 мМ. Конечная концентрация хлористого натрия в питательной среде для шпината составляла – 0.5, 150, 250 мМ, для сведа – 0.5, 250, 750 мМ (по 5 растений в 10 повторностях на вариант). У 55-дневных растений отделяли листья, определяли их сырую массу, фиксировали в течение 5 мин при 105°C , а затем высушивали при 60°C до постоянного веса и определяли сухую массу. Листья у растений шпината разделяли на две части – нижнюю (первые 4 листа) и верхнюю (остальные листья).

Оводненность листьев растений ($K_{\text{H}_2\text{O}}$) рассчитывали по формуле:

$$K_{\text{H}_2\text{O}} = (m_{\text{сыр}} - m_{\text{сух}}) / m_{\text{сух}}, \quad (1)$$

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

Выделение КС проводили из высушенных листьев по описанному ранее методу [17]. Навески растительного материала (~1.5 г) помещали в колбы и промывали последовательно 90% этанолом (0.1 л на колбу, в течение 48 ч, при постоянном перемешивании), 1% раствором NaOH (~0.6 л, в течение 24 ч, при постоянном перемешивании), H_2O (~2 л), 1% раствором HCl (~0.6 л, в течение 24 ч, при постоянном перемешивании) и дистиллированной водой до исчезновения в промывных водах хлорид-ионов. Затем определяли сырую и сухую (после высушивания при 60°C) массу препарата КС. Данный метод выделения позволяет получить препараты КС, в которых сохранена архитектура тканей, но удалено внутриклеточное со-

держимое, при этом все катионообменные группы полимеров КС присутствуют в H^+ -форме, анионообменные (аминогруппы) – в форме свободного амина [17]. Долю сухой массы КС ($G_{КС}$) в сухой массе листьев (%) определяли по формуле (2):

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

где $m_{Л}$ и $m_{КС}$ – сухие массы листьев растений и выделенных из них КС соответственно (г).

Набухание КС в воде и растворах (K^{cw}) определяли, измеряя сырую и сухую массу препаратов, и рассчитывали коэффициент набухания по формуле:

$$K^{cw} = (G_F^{cw} - G_D^{cw}) / G_D^{cw}, \quad (3)$$

где G_F^{cw} и G_D^{cw} – сырая и сухая масса препаратов КС (г).

Определение качественного и количественного состава ионообменных групп полимерного матрикса КС проводили с использованием потенциометрического титрования, которое осуществляли методом отдельных навесок [18]. Сухие навески образцов КС (40 ± 0.1 мг) помещали в шлифованные конические колбы (50 мл) с притертой пробкой и заливали 12.5 мл раствора КОН или HCl различной концентрации, но с постоянной ионной силой, которую создавали соответствующими растворами NaCl. Диапазон изменения концентраций кислоты и щелочи составлял 0–10 мМ. По истечении 24 ч КС отделяли от раствора, в котором определяли pH (“Jenway” 3320 pH Meter, Великобритания) и концентрацию оставшейся кислоты или щелочи титрованием с индикатором бромтимоловым синим. По изменению концентрации H^+ или OH^- рассчитывали сорбционную способность КС при фиксированном значении pH_i по формуле:

$$S_i = (C^{in} - C^{eq}) \times V / g, \quad (4)$$

где S_i – сорбционная емкость КС по катионам или анионам (мкмоль/г сухой массы) при соответствующем значении pH_i ; C^{in} и C^{eq} – исходная и равновесная концентрации NaOH или HCl в растворе (мМ); V – объем раствора (мл); g – навеска образца (г).

Для КС листьев сведы потенциометрические кривые получены при ионной силе раствора 10, 250 и 750 мМ, а для шпината – 10, 150 и 250 мМ.

Расчет кривых титрования проводили, как описано ранее [17, 18]. Количество функциональных групп каждого типа, а также значения pH, отвечающие началу и концу их ионизации, определяли, анализируя экспериментальные кривые зависимости сорбционной способности КС от pH как описано ранее.

Для определения ионообменной способности КС при разной концентрации хлористого натрия в растворе сухие навески образцов КС (40 ± 0.1 мг) помещали в шлифованные бюксы с притертой пробкой и заливали 12.5 мл раствора NaCl различной концентрации. По истечении 48 ч образцы отделяли от раствора. В растворах определяли pH до и после контакта с образцами. По изменению концентрации H^+ в растворе рассчитывали сорбционную способность КС при pH_i по формуле:

$$S = [(10^{(-pH^f)} - 10^{(-pH^{in})}) \times 1000V] / g, \quad (5)$$

где S – сорбционная емкость образцов КС (мкмоль/г сухой массы); pH^f и pH^{in} – исходная и соответствующая равновесная концентрации HCl в растворе (мМ); V – объем раствора (мл); g – навеска образца (г).

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

Кривые потенциометрического титрования имели сложную полисигмоидную форму, что свидетельствует о наличии в структуре полимерного матрикса КС исследуемых растений нескольких типов функциональных групп [17]. Разделение кривых на моносигмоидные участки проводили согласно дифференциальным кривым $(dS_i/dpH_i) = f(pH_i)$, имеющим ряд минимумов, которые соответствуют началу (степень диссоциации (α) = 0) и концу (α = 1) ионизации функциональной группы j -типа [18]. В соответствии с дифференциальными кривыми, полученными из экспериментальных потенциометрических кривых, определили количество ионогенных групп каждого типа, содержащихся в полимерном матриксе КС (табл. 1, 2, подробно см. в [17, 18]).

Для расчета величин констант ионизации ионогенных групп применено модифицированное Грегором уравнение Хендерсона-Хассельбаха [19]:

$$pH = pK_a + n \log_{10} \left(\frac{\alpha}{1 - \alpha} \right), \quad (6)$$

где pK_a – кажущаяся константа ионизации ионогенной группы полимера, α – степень диссоциации, n – константа, зависящая от строения полимерной матрицы и природы противоиона.

Таблица 1. Влияние концентрации хлористого натрия в среде выращивания (C^{NaCl} , мМ) на содержание карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты (S^1), карбоксильных групп гидроксикоричных кислот (S^2) и фенольных ОН-групп (S^3) в полимерном матриксе клеточных стенок листьев растений сведы

C^{NaCl}	S^1	S^2	S^3	$S_t^{\text{cat}} = S^1 + S^2 + S^3$
0.5	350 ± 30	650 ± 40	920 ± 11	1820 ± 100
250	720 ± 30	380 ± 15	880 ± 100	1980 ± 140
750	400 ± 13	600 ± 70	800 ± 90	1800 ± 150

Примечание: S_t^{cat} — максимальная катионообменная способность полимерного матрикса клеточных стенок, равная ($S^1 + S^2 + S^3$). Все значения выражены в мкмоль/г сухой массы клеточных стенок. Приведены средние значения и их стандартные отклонения.

Таблица 2. Влияние концентрации хлористого натрия в среде выращивания (C^{NaCl} , мМ) на содержание карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты (S^1), карбоксильных групп гидроксикоричных кислот (S^2) и фенольных ОН-групп (S^3) в полимерном матриксе клеточных стенок, изолированных из листьев шпината

C^{NaCl}		S^1	S^2	S^3	$S_t^{\text{cat}} = S^1 + S^2 + S^3$
0.5	Нижние листья	395 ± 34	445 ± 10	630 ± 71	1470 ± 85
	Верхние листья	352 ± 12	387 ± 11	630 ± 71	1369 ± 76
150	Нижние листья	465 ± 16	625 ± 23	465 ± 21	1555 ± 145
	Верхние листья	355 ± 35	465 ± 49	640 ± 14	1460 ± 120
250	Нижние листья	805 ± 50	710 ± 65	390 ± 45	1905 ± 148
	Верхние листья	560 ± 56	720 ± 40	510 ± 49	1790 ± 136

Примечание: S_t^{cat} — максимальная катионообменная способность полимерного матрикса клеточных стенок, равная ($S^1 + S^2 + S^3$). Все значения выражены в мкмоль/г сухой массы клеточных стенок. Приведены средние значения и их стандартные отклонения.

Анализ экспериментальных данных показал, что во всех случаях между соответствующими величинами pH_i и $\log_{10}(\alpha_i/(1 - \alpha_i))$ существует статистически значимая прямолинейная зависимость. С помощью метода регрессионного анализа по уравнению (6) рассчитаны значения pK_a^j для каждой ступени ионизации (табл. 3) ионогенных групп КС, изолированных из листьев исследуемых растений, выращенных при разных концентрациях NaCl в питательном растворе. Анализ рассчитанных значений pK_a показывает, что КС листьев галофита и гликофита имеют одинаковый качественный состав ионообменных групп.

Адекватность примененного подхода к описанию кислотно-основного равновесия оценивали методом регрессионного анализа, определяя параметры уравнения:

$$S_{\text{расч}} = B \times S_{\text{эксп}} + A, \quad (7)$$

где $S_{\text{эксп}}$ и $S_{\text{расч}}$ — экспериментально полученная и рассчитанная ионообменная способность при соответствующем значении pH (мкмоль/г сухой массы КС); А и В — параметры регрессии.

Расчеты показали, что выбранная модель полностью соответствует полученным в настоящей работе экспериментальным данным, о чем свиде-

тельствуют величины коэффициентов корреляции ($r^{\text{ког}}$) зависимостей $S_{\text{расч}} = f(S_{\text{эксп}})$, а также значения коэффициентов А и В уравнения (7). Во всех вариантах $r^{\text{ког}} \rightarrow 1$, значение А не превышает погрешности эксперимента, а В $\rightarrow 1$ (данные не показаны).

Содержание воды в тканях ($K_{\text{H}_2\text{O}}$) и КС (K^{cw}) листьев сведы зависело от концентрации соли в среде выращивания, причем оба эти показателя у растений при 250 мМ NaCl в среде были выше, чем у растений, выращенных при 0.5 и 750 мМ NaCl (табл. 4). У шпината и $K_{\text{H}_2\text{O}}$, и K^{cw} мало зависели от уровня засоления среды выращивания, но для этого растения значения обоих показателей выше у нижних листьев по сравнению с верхними (табл. 5).

Доля КС ($G_{\text{КС}}$) в сухой массе листьев сведы составляла ~38% в вариантах 0.5 и 250 мМ NaCl, но при увеличении уровня засоления среды до 750 мМ $G_{\text{КС}}$ снижалась в 2 раза (табл. 4). У шпината значение $G_{\text{КС}}$ слабо зависело от условий выращивания и у верхних, и у нижних листьев (табл. 5) в интервале уровня засоления среды от 0.5 до 250 мМ NaCl.

Важной характеристикой структуры полимерного матрикса КС является коэффициент набухания КС в воде и растворах. Полученные в работе

Таблица 3. Средние значения pK_a^j ионообменных групп клеточных стенок листьев сведы и шпината, рассчитанные по данным потенциометрического титрования клеточных стенок растений, выращенных при разных концентрациях NaCl в питательном растворе

Растение	Тип группы	I		
		10	250	750
		pK_a^j		
Шпинат н.л.	ПГК	4.38 ± 0.07	3.74 ± 0.10	—
Шпинат в.л.		4.49 ± 0.01	3.81 ± 0.24	
Сведа		4.50 ± 0.13	3.73 ± 0.15	3.34 ± 0.02
Шпинат н.л.	ГКК	7.22 ± 0.11	6.78 ± 0.24	—
Шпинат в.л.		7.18 ± 0.25	6.89 ± 0.17	
Сведа		7.01 ± 0.22	7.32 ± 0.10	7.12 ± 0.28
Шпинат н.л.	Фен-ОН	10.10 ± 0.14	10.17 ± 0.15	
Шпинат в.л.		10.20 ± 0.28	9.70 ± 0.31	
Сведа		10.2 ± 0.13	9.65 ± 0.12	9.60 ± 0.44

Примечание: ПГК — карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты; ГКК — карбоксильные группы гидроксикоричных кислот; Фен-ОН — фенольные ОН-группы; I — ионная сила растворов при потенциометрическом титровании (мМ); н.л. — нижние листья; в.л. — верхние листья. Приведены средние значения и их стандартные отклонения. Средние значения pK_a^j рассчитаны по данным потенциометрического титрования листьев сведы, выращенной при концентрации NaCl в питательном растворе 0.5, 250 и 750 мМ, и шпината, выращенного при концентрации NaCl в питательном растворе 0.5, 150 и 250 мМ.

Таблица 4. Оводненность листьев (K_{H_2O}), коэффициент набухания клеточных стенок листьев в воде (K^{cw}) и их доля в сухой массе листьев ($G_{КС}$, %) у растений сведы в зависимости от концентрации NaCl в среде выращивания (C^{NaCl} , мМ)

C^{NaCl}	Листья	Клеточная стенка	
	K_{H_2O}	K^{cw}	$G_{КС}$
0.5	5.6 ± 0.5	5.2 ± 0.2	39 ± 2
250	7.3 ± 0.4	7.0 ± 0.3	37 ± 2
750	6.6 ± 0.2	6.4 ± 0.4	19 ± 1

Примечание: K_{H_2O} и K^{cw} выражены в г H_2O /г сухой массы листа или клеточных стенок соответственно. Приведены средние значения и их стандартные ошибки.

данные о набухании КС листьев сведы и шпината показали, что во всех вариантах выращивания степень набухания возрастает с увеличением степени диссоциации карбоксильных групп и уменьшается с возрастанием ионной силы раствора (рис. 1, 2).

Определена ионообменная способность КС (S) при изменении концентрации NaCl в растворе и установлено, что независимо от уровня засоления среды выращивания значение этого показателя увеличивалось с ростом концентрации NaCl в среде инкубации КС как для листьев галофита, так и гликофита (рис. 3, 4).

У шпината с увеличением уровня засоления среды от 0.5 до 250 мМ значение S возрастало и в варианте выращивания 250 мМ достигало 200

(верхние листья) и 250 (нижние листья) мкмоль/г сухой массы КС при $pNa = 0$ в среде инкубации. Следует отметить, что при любых условиях ионообменная способность КС нижних листьев была больше, чем аналогичный показатель верхних листьев (рис. 1). У сведы самым высоким значением ионообменной способности, которое составляло 350 мкмоль/г сухой массы при $pNa = 0$, характеризовались КС листьев растений 250 мМ варианта выращивания (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

В структуре полимерного матрикса КС листьев гликофита, как и галофита, присутствуют ионогенные группы четырех типов, способные

Таблица 5. Оводненность листьев (K_{H_2O}), коэффициент набухания клеточных стенок листьев в воде (K^{cw}) и их доля в сухой массе листьев (G_{KC} , %) у растений шпината в зависимости от концентрации NaCl в среде выращивания (C^{NaCl} , mM)

C^{NaCl}	Листья	Клеточная стенка	
	K_{H_2O}	K^{cw}	G_{KC}
0.5 (в.л.)	10.7 ± 0.3	7.9 ± 0.3	38 ± 5
150 (в.л.)	10.6 ± 0.4	7.8 ± 0.5	32 ± 1
250 (в.л.)	9.4 ± 0.7	8.0 ± 0.4	34 ± 3
0.5 (н.л.)	14.7 ± 0.9	9.2 ± 0.6	36 ± 3
150 (н.л.)	12.6 ± 0.3	9.9 ± 0.7	31 ± 1
250 (н.л.)	11.6 ± 0.8	9.5 ± 0.7	31 ± 2

Примечание: K_{H_2O} и K^{cw} выражены в г H_2O /г сухой массы листьев или клеточных стенок соответственно. н.л. — нижние листья; в.л. — верхние листья. Приведены средние значения и их стандартные ошибки.

участвовать в обменных реакциях с ионами внешней среды при соответствующих условиях: три из них — катионообменные (табл. 1, 2), а четвертая обменивает анионы. Во всех вариантах содержание анионообменных групп (S_t^{an}) изменяется от 60 до 150 (данные не приведены), а общее количество катионообменных (S_t^{cat}) — от 1200 до 1800 мкмоль/г сухой массы КС (табл. 1, 2). Эти данные показывают, что КС листьев исследуемых растений, как и стенки их корней [13], являются природными катионообменниками, т.к. значения S_t^{cat} более чем в 10 раз превышают значения S_t^{an} .

На основании рассчитанных значений pK_a^j , данных по химическому составу КС [20] и результатов потенциометрического титрования КС корней растений [17, 18] можно полагать, что ионогенные группы с pK_a 3–5 являются карбоксильными группами полигалактуроновой кислоты (ПГК), группы с $pK_a \sim 7$ — карбоксильными группами гидроксикоричных кислот (ГКК), а группы с $pK_a \sim 9.6$ –10 — фенольными ОН-группами. Анализ рассчитанных значений pK_a показывает, что КС листьев галофита и гликофита имеют одинаковый качественный состав ионообменных групп (табл. 3) независимо от уровня засоления среды.

У сведы и шпината с увеличением концентрации соли (C^{NaCl}) в среде изменяется количество карбоксильных групп ПГК ($S^{ПГК}$), но у галофита и гликофита эти изменения носят разный характер.

У галофита в интервале C^{NaCl} в среде 0.5–750 mM зависимость $S^{ПГК} = f(C^{NaCl})$ имеет экстремальный характер с максимумом в 250 mM варианте выращивания, при этом значение $S^{ПГК}$ достигает 720 мкмоль/г сухой массы КС, тогда как при минимальном (0.5 mM) и максимальном (750 mM) уровнях засоления этот показатель в 2 раза ниже (табл. 1). Следует отметить, что аналогичный экстремальный характер зависимостей был ранее обнаружен при определении других показателей, характеризующих состояние как листьев, так и корней сведы: накопление и распределение ионов Na^+ , Cl^- , K^+ , и NO_3^- , ростовые параметры, биохимические характеристики [21].

У шпината с увеличением C^{NaCl} от 0.5 до 250 mM возрастает содержание карбоксильных групп

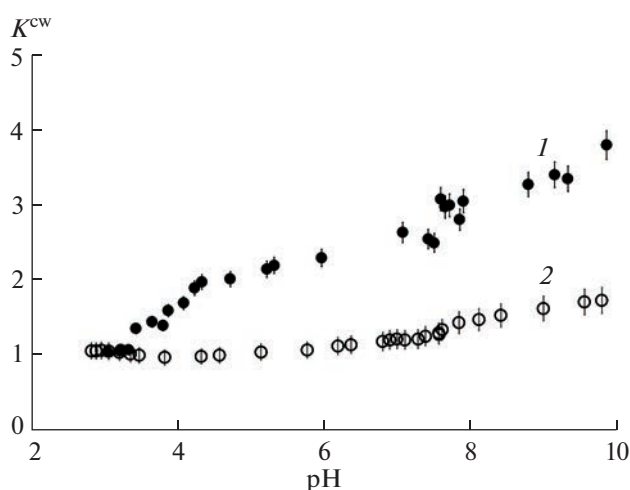


Рис. 1. Влияние pH и ионной силы (I) на коэффициент набухания клеточных стенок (K^{cw}), изолированных из листьев растений сведы, выращенных при 0.5 mM NaCl в питательном растворе. 1 — $I = 10$ mM, 2 — $I = 750$ mM.

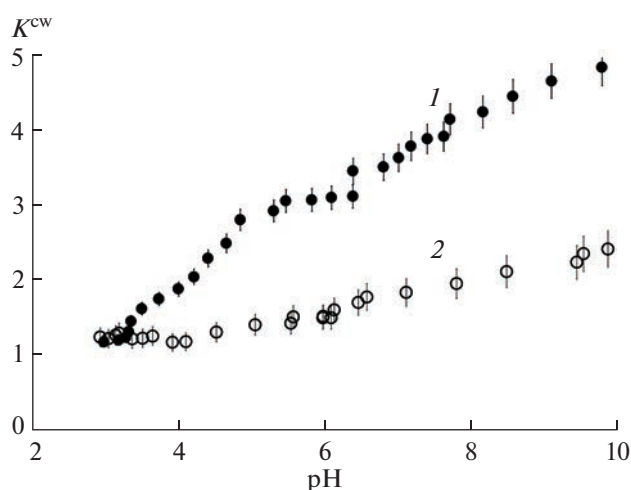


Рис. 2. Влияние pH и ионной силы (I) на коэффициент набухания клеточных стенок (K^{cw}), изолированных из нижних листьев растений шпината, выращенных при 0.5 mM NaCl в питательном растворе. 1 — $I = 10$ mM, 2 — $I = 250$ mM.

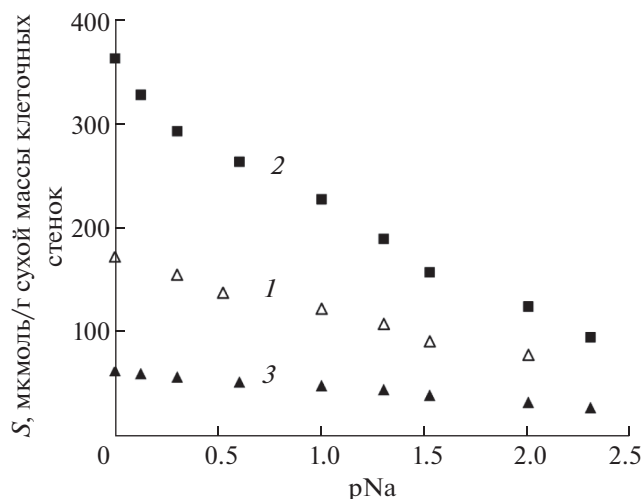


Рис. 3. Влияние концентрации NaCl (pNa) на ионообменную способность клеточных стенок (S), изолированных из листьев растений сведы, выращенных на разных концентрациях NaCl в среде: 1 – 0.5 мМ; 2 – 250 мМ; 3 – 750 мМ.

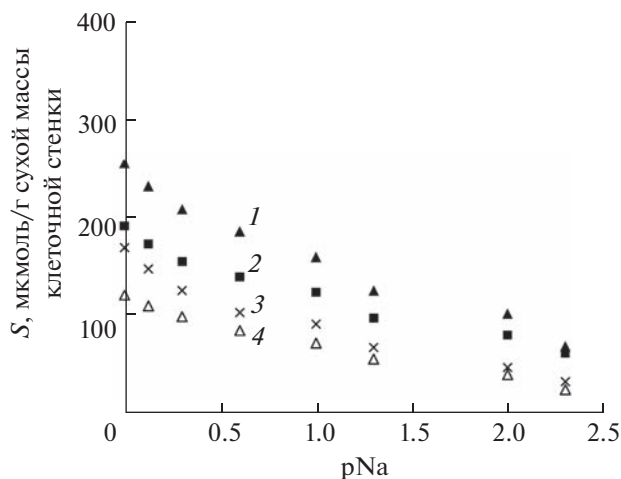


Рис. 4. Влияние концентрации NaCl (pNa) на ионообменную способность клеточных стенок (S), изолированных из листьев растений шпината, выращенных на разных концентрациях NaCl в среде: нижние листья 1 – 250 мМ; 3 – 0.5 мМ; верхние листья 2 – 250 мМ; 4 – 0.5 мМ.

ПГК, как в верхних, так и в нижних листьях, но у первых – в 1.4, а у вторых – в 2 раза (табл. 2) по сравнению с КС листьев растений, выращенных при 0.5 мМ NaCl. Следует отметить, что, в отличие от сведы, в КС листьев обеих частей побега шпината значительно увеличивается и содержание карбоксильных групп ПГК, которые также могут принимать участие в ионообменных реакциях при соответствующих условиях (табл. 2). При любых условиях общее содержание ионообменных групп в КС нижних листьев больше, чем в КС верхних. Эти результаты подтверждают предположение о том, что КС зрелых листьев можно рассматривать как запасной пул катионов. В условиях засоления ограничение поступления ионов натрия и хлорида в молодые листья за счет большего накопления этих ионов в КС зрелых тканей является, вероятно, важным адаптивным свойством растений шпината. Известно, что солеустойчивость определяется способностью поддерживать градиент ионов натрия и хлорида между старыми и молодыми листьями, при этом общее содержание солей в тканях не играет существенной роли [22]. В литературе отсутствуют данные о влиянии солевого стресса на содержание ПГК и пектинов в КС надземных частей растений, однако для корней гликофита *Arabidopsis thaliana* были показаны индукция синтеза β -1,4-галактана [23] и активация пектинметилэстераз [24] при засолении, что является предпосылкой для увеличения содержания свободных карбоксильных групп ПГК в КС.

Изменения в количестве групп ПГК при увеличении концентрации соли в среде, вероятно, являются одной из ответных реакций исследованных растений на засоление, при этом следует

отметить, что у сведы такие изменения более ярко выражены.

И у галофита, и у гликофита с увеличением содержания NaCl в питательном растворе уменьшается значение pK_a карбоксильных групп ПГК (усиливаются их кислотные свойства), в то время как для двух других типов катионообменных групп эти значения варьируют незначительно (табл. 3).

В предыдущих исследованиях [25, 26] константу диссоциации карбоксильных групп ПГК рассчитывали по уравнению Гельфериха [27]:

$$pK_a = pH + \log_{10}(C^{Na^+}) - \log_{10}(X/2), \quad (8)$$

где pK_a – константа ионизации ионогенной группы в слабокислотном ионообменнике (каковым и является КС), величина которой приблизительно равна константе диссоциации для аналогичной группы в растворимой полимерной кислоте; pK_a – величина pH, при которой 50% ионогенных групп диссоциировано (в нашем случае эта величина pH равна $pK_a^{ПГК}$; табл. 3); C^{Na^+} – концентрация натрия в растворе (М); X – концентрация активных групп в ионообменнике (мкмоль/г сухой массы КС).

Таким образом, график зависимости $pH = f[\log_{10}(C^{Na^+})]$ должен иметь вид прямой линии с отрезком, отсекаемым на оси ординат, равным pK_a растворимой полимерной кислоты. Анализ указанной зависимости показывает, что она действительно является прямолинейной ($pK_a^{ПГК} = -0.624 \log_{10} C^{Na^+} + 3.30$, $r_{\text{corr}}^2 = 0.992$) с отрезком,

отсекаемым на оси y , равным 3.30. Эта величина приблизительно соответствует значениям, которые получали ранее другие исследователи [25, 26]. В соответствии с уравнением Гельфериха это означает, что у исследуемых галофита и гликофита группы с pK_a^2 действительно являются карбоксильными группами ПГК в трехмерной полимерной структуре КС листьев, так как значение pK_a растворимой полигалактуроновой кислоты составляет 3.42 [28].

Поскольку с увеличением содержания NaCl в питательном растворе уменьшается pK_a карбоксильных групп ПГК, в этих условиях должно происходить увеличение ионообменной способности полимерного матрикса КС. Доказательством справедливости последнего утверждения могут служить зависимости ионообменной способности КС листьев сведы и шпината от концентрации хлорида натрия (C^{NaCl}) во внешнем растворе (рис. 1, 2). Во всех вариантах выращивания у галофита и гликофита с увеличением C^{NaCl} резко возрастает ионообменная способность КС. В зависимости от условий выращивания в листьях сведы этот показатель изменяется от 50 до 150–350, а в листьях шпината — от 30 до 130–200 мкмоль/г сухой массы КС в интервале изменения ионной силы от 5 до 1000 мМ (рис. 1, 2). При всех C^{NaCl} способность к ионному обмену КС сведы выше по сравнению со шпинатом, что может свидетельствовать о более эффективной компартментации ионов в тканях галофита. Следует отметить, что выявленные закономерности изменения ионообменной способности с увеличением C^{NaCl} имеют аналогичный характер и для корней исследуемых растений [13, 14].

Растительная КС представляет собой природный слабосшитый ионообменник [13, 17]. Одним из важных физико-химических показателей, которые количественно характеризуют свойства полимера как ионообменника, является набухание. Количественной характеристикой этого процесса служит весовой коэффициент набухания. Причиной набухания ионообменных материалов в водном растворе является наличие гидрофильных групп, причиной нерастворимости — существование поперечных связей. Основываясь на знаниях о физико-химических закономерностях набухания синтетических ионообменных материалов [27], можно полагать, что главный фактор, который определяет способность к набуханию — это степень сшивки полимерных цепей, расположенных в структуре КС. Прямых методов, позволяющих определить этот параметр, не существует, но есть возможность его оценки косвенным путем. Известно, что, чем выше степень сшивки полимерных цепей, тем ниже коэффициент набухания полимерного материала в воде [29, 30].

Сравнительный анализ коэффициентов набухания КС сведы (табл. 4) и шпината (табл. 5) в воде показывает, что сведа характеризуется более высокой степенью сшивки полимеров в матриксе КС листьев, так как для нее значения этого показателя ниже, чем у гликофита. На основании этих результатов можно предположить, что в условиях засоления КС галофита является более эффективным барьером для ионов натрия по сравнению с КС гликофита. Вероятно, данный эффект играет важную роль в механизме солеустойчивости галофита, особенно при резких колебаниях концентрации соли в окружающей среде.

Таким образом, результаты исследования показывают, что существуют отличия в строении полимерного матрикса КС листьев сведы и шпината, которые обусловлены разной степенью сшивки полимерных цепей. Более жесткая структура полимерного матрикса галофита обеспечивает более высокую механическую и химическую устойчивость КС в условиях засоления по сравнению с гликофитом.

На основании результатов работы возможно оценить концентрацию протонов в водном пространстве апопласта, образующихся в результате реакций обмена между катионами внешней среды и протонами ионизированных карбоксильных групп КС при изменении уровня засоления внешней среды. Иллюстрацией этого явления служит полученная экспериментальная зависимость $pH = f(-\log_{10} C^{Na})$ (рис. 5, 6). Расчеты показывают, что увеличение концентрации NaCl во внешнем растворе от 0.5 до 1000 мМ приведет к снижению pH в водной фазе КС на 2–3 единицы, причем чем больше количество групп ПГК в КС, тем большее количество протонов выделяется из полимерного матрикса КС в водное пространство апопласта.

Анализ данных литературы свидетельствует о том, что снижение pH в апопласте за счет работы H^+ -АТФазы приводит к стимулированию различных транспортных процессов, в том числе выкачиванию натрия из цитоплазмы с помощью Na^+/H^+ -антипортера [31] и входу калия через K^+ -селективные входные каналы (KIRCs) плазматической мембраны [32]. С другой стороны, результаты исследования ионообменных свойств КС показывают, что в условиях солевого стресса за счет реакций обмена между катионами Na^+ внешнего раствора и протонами карбоксильных групп КС достигается высокая концентрация протонов около плазмалеммы, которая, вероятно, влияет на процессы транспорта ионов. При исследовании адаптации корней кукурузы к низким значениям pH питательного раствора в экспериментах *in vivo* [33] установлено, что при pH 5.6 выделение протонов корнями кукурузы, которая росла при pH питательной смеси 3.4, было почти в 3 раза выше по сравнению с контролем (выращивание при pH

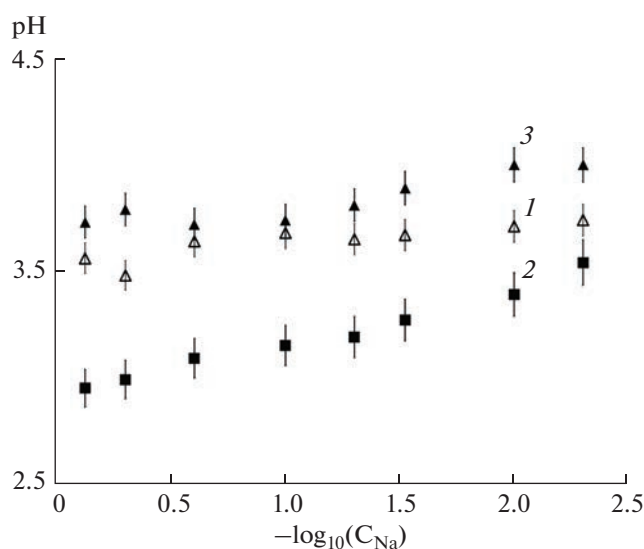


Рис. 5. Влияние концентрации NaCl (C_{Na} , M) на pH растворов после контакта с клеточными стенками, выделенными из листьев растений сведы. pH исходных растворов 6.3 ± 0.3 . Растения были выращены при разной концентрации NaCl в питательном растворе: 1 – 0.5 мМ; 2 – 250 мМ; 3 – 750 мМ.

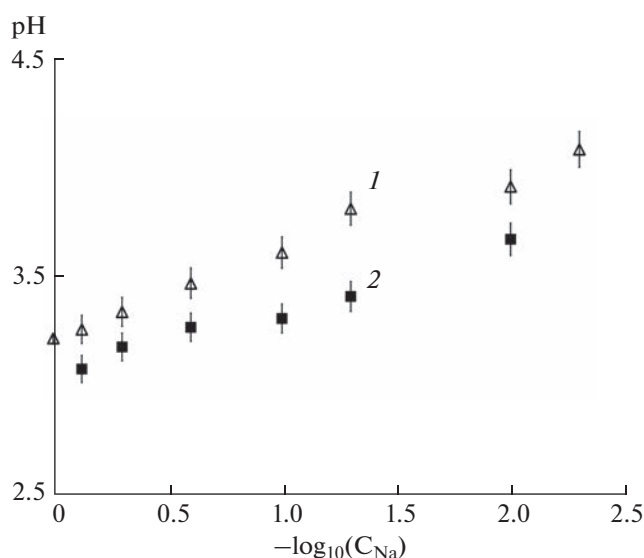


Рис. 6. Влияние концентрации NaCl (C_{Na} , M) на pH растворов после контакта с клеточными стенками, выделенными из нижних листьев шпината. pH исходных растворов 6.3 ± 0.3 . Растения были выращены при разной концентрации NaCl в питательном растворе: 1 – 0.5 мМ; 2 – 150 мМ.

6.5). В опытах *in vitro* на выделенной из этих корней кукурузы фракции плазмалеммы показано увеличение гидролитической активности АТФазы, активности выкачивания протонов, протонной проницаемости плазмалеммы и градиента pH через мембраны везикул плазмалеммы. Авторы заключили, что H^+ -АТФаза плазмалеммы вносит значительный вклад в адаптацию корней к низким значениям pH среды. Кроме того, сравнительное исследование регуляции экспрессии гена H^+ -АТФазы плазмалеммы хлористым натрием у галофита (*Atriplex nummularia* L.) и гликофита (*Nicotiana tabacum* L.) показывает, что более высокая способность галофитов индуцировать экспрессию гена H^+ -АТФазы Р-типа в ответ на воздействие NaCl может вносить вклад в их солеустойчивость [34]. Возрастание активности протонных АТФаз плазмалеммы в ответ на засоление было показано как для галофитов, так и гликофитов [35]. На основании этих данных и результатов настоящей работы (рис. 3) можно предположить, что более высокая активность H^+ -АТФазы у галофитов по сравнению с гликофитами может быть обусловлена адаптивными процессами, связанными с возникновением высокой концентрации протонов в экстраклеточном пространстве в условиях солевого стресса, в том числе, за счет реакций обмена между катионами внешней среды и протонами карбоксильных групп КС.

Сравнительный анализ данных об ионообменных свойствах КС корней галофита и гликофита, полученных ранее [13, 14], и КС листьев, установ-

ленных в настоящей работе, показывает, что КС и листьев, и корней сведы и шпината одинаковым образом реагируют на увеличение концентрации NaCl в окружающей среде: происходит увеличение содержания карбоксильных групп ПГК в КС, увеличение количества активных сайтов связывания ионов натрия за счет снижения значений pK_a карбоксильных групп ПГК и увеличение концентрации протонов вследствие ионообменных реакций. Однако в листьях и гликофита, и галофита указанные ответы на повышение концентрации NaCl в окружающей среде выражены более ярко по сравнению с корнями, т.к. первые имеют значительно более высокое содержание карбоксильных групп ПГК.

Таким образом, полученные в настоящей работе данные об ионообменных свойствах КС листьев галофита и гликофита подтверждают существующее мнение о том, что физиологические функции и биохимические процессы у этих двух групп растений различаются скорее в количественном отношении, чем в качественном.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации на кафедре физиологии растений МГУ имени М.В. Ломоносова (тема № 121032300068-8).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aleman F., Nieves-Cordones M., Martinez V., Rubio F. Potassium/sodium steady-state homeostasis in *Thellungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana* under long-term salinity conditions // Plant Sci. 2009. V. 176. P. 768.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.02.020>
2. Ghars M.A., Parre E., Debez A., Bordenave M., Richard L., Lepout L., Bouchereau A., Savouret A., Abdelly C. Comparative salt tolerance analysis between *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*, with special emphasis on K^+/Na^+ selectivity and proline accumulation // J. Plant Physiol. 2008. V. 165. P. 588.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.05.014>
3. Möller I.S., Tester M. Salinity tolerance of *Arabidopsis*: a good model for cereals? // Trends Plant Sci. 2007. V. 12. P. 534.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.09.009>
4. Tester M., Danenport R. Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants // Ann. Bot. 2003. V. 91. P. 503.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcg058>
5. White P.J., Broadley M.R. Chloride in soils and its uptake and movement within the plant // Ann. Bot. 2001. V. 88. P. 967.
<https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1540>
6. Balnokin Y.V., Kotov A.A., Myasoedov N.A., Khailova G.F., Kurkova E.B., Lun'kov R.V., Kotova L.M. Involvement of long-distance Na^+ transport in maintaining water potential gradient in the medium-root-leaf system of a halophyte *Suaeda altissima* // Russ. J. Plant Physiol. 2005. V. 52. P. 489.
<https://doi.org/10.1007/s11183-005-0072-z>
7. Balnokin Y.V., Myasoedov N.A., Shamsutdinov Z.Sh., Shamsutdinov N.Z. Significance of Na^+ and K^+ for sustained hydration of organ tissues in ecologically distinct halophytes of the family Chenopodiaceae // Russ. J. Plant Physiol. 2005. V. 52. P. 779.
<https://doi.org/10.1007/s11183-005-0115-5>
8. Liang W., Ma X., Wan P., Liu L. Plant salt-tolerance mechanism: A review // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2018. V. 495. P. 286.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.043>
9. Blumwald E. Sodium transport and salt tolerance in plants // Cur. Opin. Cell Biol. 2000. V. 12. P. 431.
[https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(00\)00112-5](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(00)00112-5)
10. Zhu J.-K. Plant salt tolerance // Trends Plant Sci. 2001. V. 6. P. 66.
[https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(00\)01838-0](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(00)01838-0)
11. Yeo A.R. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology // J. Exp. Bot. 1998. V. 49. P. 915.
<https://doi.org/10.1093/jxb/49.323.915>
12. Bigot J., Binet P. Exchange capacity and parietal cation selectivity isolated from the roots of *Cochleria anglica* and *Phaseolus vulgaris* grown in media of different salinities // Can. J. Bot. 1986. V. 64. P. 955.
13. 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 Soil. 2005. V. 277. P. 163.
<https://doi.org/10.1023/A:1017936318435>
14. Meychik N.R., Nikolaeva Yu.I., Yermakov I.P. Ion-exchange properties of cell walls of *Spinacia oleracea* L. roots under different environmental salt conditions // Biochem. (Moscow). 2006. V. 71. P. 781.
<https://doi.org/10.1134/s000629790607011x>
15. Meychik N., Nikolaeva Yu., Kushunina M. The significance of ion exchange properties of plant root cell walls for nutrient and water uptake by plants // Plant Physiol. Biochem. 2021. V. 166. P. 140.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.05.048>
16. Robinson S.P., Dountov S.D. Potassium, sodium and chloride concentrations in leaves and isolated chloroplasts of the halophyte *Suaeda australis* R. // Aust. J. Plant Physiol. 1985. V. 12. P. 471.
17. Meychik N.R., Yermakov I.P. Ion exchange properties of plant root cell walls // Plant Soil. 2001. V. 234. P. 181.
<https://doi.org/10.1023/A:1017936318435>
18. Meychik N.R., Yermakov I.P. A new approach to the investigation on the ionogenic groups of root cell walls // Plant Soil. 1999. V. 217. P. 257.
<https://doi.org/10.1023/A:1004675309128>
19. Gregor H.P., Luttinger L.D., Loeble E.M. Titration polyacrylic acid with quaternary ammonium bases // J. Amer. Chem. Soc. 1954. V. 76. P. 5879.
20. Houston K., Tucker M.R., Chowdhury J., Shirley N., Little A. The plant cell wall: a complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 984.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00984>
21. Meychik N.R., Nikolaeva Yu.I., Yermakov I.P. Physiological response of halophyte (*Suaeda altissima* (L.) Pall.) and glycophyte (*Spinacia oleracea* L.) to salinity // Am. J. Plant Sci. 2013. V. 4. P. 427.
<https://doi.org/10.4236/ajps.2013.42A055>
22. Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. San Diego: Academic Press, 1995. P. 862.
23. Yan J., Liu Y., Yang L., He H., Huang Y., Fang L., Vibe Scheller H., Jiang M., Zhang A. Cell wall β -1,4-galactan regulated by the BPC1/BPC2-GALS1 module aggravates salt sensitivity in *Arabidopsis thaliana* // Mol. Plant. 2021. V. 14. P. 411.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.11.023>
24. Gigli-Bisceglia N., van Zelm E., Huo W., Lamers J., Testerink C. *Arabidopsis* root responses to salinity depend on pectin modification and cell wall sensing // Development. 2022. V. 149. dev200363.
<https://doi.org/10.1242/dev.200363>
25. Freundling C., Starrach N., Flach D., Gradmann D., Mayer W.-E. Cell walls as reservoirs of potassium ions for reversible volume changes of pulvinar motor cells during rhythmic leaf movements // Planta. 1988. V. 175. P. 193.
26. Starrach N., Flach D., Mayer W.-E. Activity of fixed negative charges of isolated extensor cell walls of the laminar pulvinus of primary leaves of *Phaseolus* // J. Plant Physiol. 1985. V. 120. P. 441.

27. Гельферих Ф. Иониты. Москва: Издательство Иностранной Литературы, 1962. 490 с.
28. Richter C., Dainty J. Ion behavior in plant cell walls. Characterization of the *Sphagnum russowii* cell wall ion exchanger // Can. J. Bot. 1989. V. 67. P. 451.
29. Либинсон Г.С. Физико-химические свойства карбоксильных катионитов. Москва: Наука, 1968. 182 с.
30. Шатаева Л.А., Кузнецова Н.Н., Елькин Г.Е. Карбоксильные иониты в биологии. Ленинград: Наука, 1979. 286 с.
31. Qiu Q.S., Barkla B.J., Vera-Estrella R., Zhu J.K., Schumaker K.S. Na^+/H^+ exchange activity in the plasma membrane of *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2003. V. 132. P. 1041.
<https://doi.org/10.1104/pp.102.010421>
32. Amtmann A., Jelitto T.C., Sanders D. K^+ -selective inward-rectifying channel and apoplastic pH in barley roots // J. Plant Physiol. 1999. V. 119. P. 331.
33. Yan F., Feuerle R., Schäffer S., Fortmeier H., Schubert S. Adaptation of active proton pumping and plasmalemma ATPase activity of corn roots to low root medium pH // J. Plant Physiol. 1998. V. 117. P. 311.
34. Niu X., Narasimhan M.L., Salzman R.A., Bressan R.A., Hasegawa P.M. NaCl regulation of plasma membrane H^+ -ATPase gene expression in a glycophyte and a halophyte // J. Plant Physiol. 1993. V. 103. P. 713.
35. Janicka-Russak M., Kabala K. The role of plasma membrane H^+ -ATPase in salinity stress of plants // Progress in Botany. Vol. 76 / Eds. U. Lüttge, W. Bey-schlag. Springer. 2015. P. 77.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-08807-5_3