

## Генотипический скрининг устойчивости зернобобовых культур к воздействию тяжелых металлов на основании нейронного профилирования экссудации их аминокислот

Я. В. Пухальский<sup>1</sup>✉, Н. И. Воробьев<sup>1</sup>, С. И. Лоскутов<sup>2</sup>, Ю. В. Лактионов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

<sup>2</sup> ВНИИПД – филиал ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

✉ E-mail: puhalskyan@gmail.com

**Аннотация.** Целью статьи являлась оценка изменения уровня структурной организации аминокислотного профиля корневых экзометаболитов различных по устойчивости генотипов гороха посевного под влиянием металл-индуцированного стресса. **Методология и методы исследования.** Растения выращивали в стерильных регулируемых условиях (климатической камере) при добавлении в питательную среду токсичных концентраций, кадмия, кобальта, цинка или ртути. Объектами для исследования послужили Cd-чувствительный генотип гороха посевного SGE, а также созданный на его основе уникальный Cd-устойчивый мутант SGECdt. **Результаты.** Установлено, что все солевые растворы металлов оказывают ингибирующее влияние на показатели роста растений. При этом, как и ожидалось, добавление в среду кадмия и кобальта в большей мере отразилось на снижении показателей биомассы дикой линии, чем мутантного генотипа. Последний больше реагировал на интродукцию в среду токсичной ртути. Что касается цинка, то здесь ингибирование биомассы обоих органов у двух генотипов было равноценным. Добавление в среду всех токсикантов привело к увеличению выхода суммарного всех аминокислот. У мутанта SGECdt это проявилось в большей степени, что связано с отдельными аспектами детоксикации металлов у данного генотипа в растительных тканях. Кластерный анализ позволил выделить соотношения аминокислотного профиля, полученного на цинке и ртути у обоих генотипов, в отдельную независимую группу. Результаты расчета с применением нейронной сети подтвердили устойчивость мутанта к ионам Cd и Co и чувствительность к Zn и Hg. У дикой линии обнаружена устойчивость к выбранной концентрации кобальта. **Научная новизна.** Математическая модель, спроектированная на основе собранного массива данных экссудации аминокислот, позволяет на основе матрицы корреляционных соотношений прогнозировать выход абсолютно сухой белковой биомассы растений и проводить первичный скрининг адаптационной лабильности различных сортов в условиях металл-индуцированного стресса.

**Ключевые слова:** горох посевной, SGECdt, тяжелые металлы, корневые выделения, аминокислоты, нейронная сеть, фракталы, индексы биокомпозиции.

**Для цитирования:** Пухальский Я. В., Воробьев Н. И., Лоскутов С. И., Лактионов Ю. В. Генотипический скрининг устойчивости зернобобовых растений к воздействию тяжелых металлов, на основании нейронного профилирования экссудации их аминокислот // Аграрный вестник Урала. 2023. № 05 (234). С. 83–96. DOI: 10.32417/1997-4868-2023-234-05-83-96.

**Дата поступления статьи:** 12.01.2023, **дата рецензирования:** 02.02.2023, **дата принятия:** 13.02.2023.

### Постановка проблемы (Introduction)

В последние годы все большее значение приобретает информационный анализ аминокислотных последовательностей у различных белков. Делается это для предсказания структуры, понимания функциональной роли и оценки устойчивости дан-

ных макромолекул *de novo* [1]. Благодаря развитию методов машинного обучения разрабатываются специальные программы на основе рекуррентных нейронных сетей, способных по числу повторяющихся системных единиц (кластерных фракталов) делать прогнозы локальной конформации пептид-

ного остова в цепочке мембранных протеинов. Количественные соотношения уровней внутренней упорядоченности числовых рядов протеиногенных аминокислот в составе таких белков, убывающие по значениям их концентраций в соответствии с фрактальным степенным законом [2], составляют основу в подобных вычислениях. Фрактальные степенные закономерности присутствуют здесь не случайно, поскольку они запрограммированы на первичном генетическом уровне структуры белков. Поэтому любое отклонение в расчетах от заданной пропорциональной нормы стабильности в меньшую сторону вызывает аминокислотный дисбаланс, что влечет за собой негативные последствия и нарушения в белковом обмене веществ (анаболизме). Соответственно, это влияет и на ингибирование роста в индивидуальном развитии целого организма. Напротив, увеличение показателя внутренней организации повышает степень устойчивости в онтогенезе и делает организм более приспособленным (адаптивным) к воздействию различного рода стрессов. В наших исследованиях мы рассмотрим эти утверждения на примере толерантности растительного организма бобовой культуры к токсичному воздействию разных тяжелых металлов (ТМ). Бобовые растения (*Fabaceae*) были выбраны исходя из их широкого ареала распространения и адаптационной лабильности, благодаря способности к формированию эффективных симбиосистем

двойного или тройного типа, состоящих из грибов арбускулярной микоризы, клубеньковых бактерий различных филогенетических таксонов, а также ассоциативных ростстимулирующих ризобактерий (Plant growth promoting rhizobacteria – PGPR). Кроме того, бобовые являются отличным источником растительного белка, сбалансированного по составу аминокислот, которые используются в качестве пластического материала, способного расходоваться на синтез ферментов, гормонов и других биологически активных соединений, необходимых для поддержания гомеостаза у растений. Исследования показывают, что отсутствие или недостаток отдельных незаменимых аминокислот приводит к нарушению в реакциях метаболизма.

Уровни биосистемной консолидации будем определять на основании расчета индексов фрактальной ( $I_F$ ) когерентности корневой экссудации культур, среди выделений (экзометаболитов) которой также выделяют свободные аминокислоты (рис. 1). Несмотря на то что результаты подобных исследований и будут различаться с показателями эндогенного содержания аминокислот, данная методика косвенного расчета считается пригодной для первичного скрининга общих метаболических реакций устойчивости растений к различным поллютантам на начальной стадии роста – методика биотестирования.

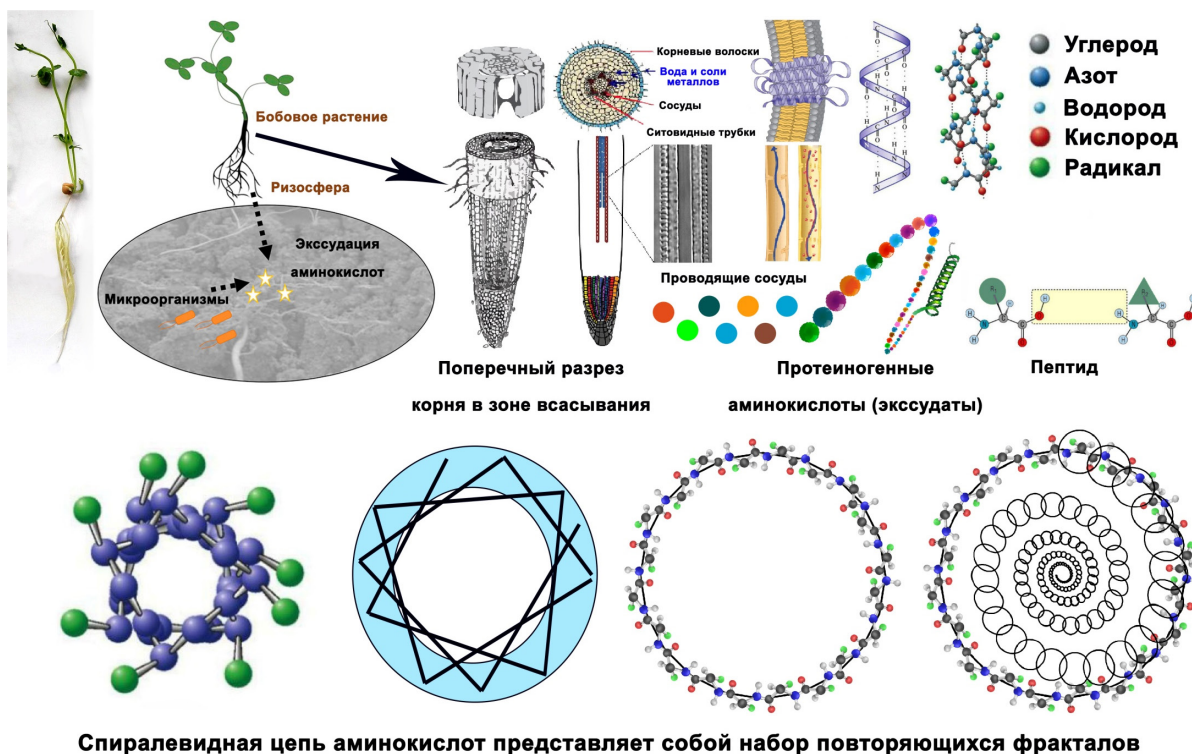
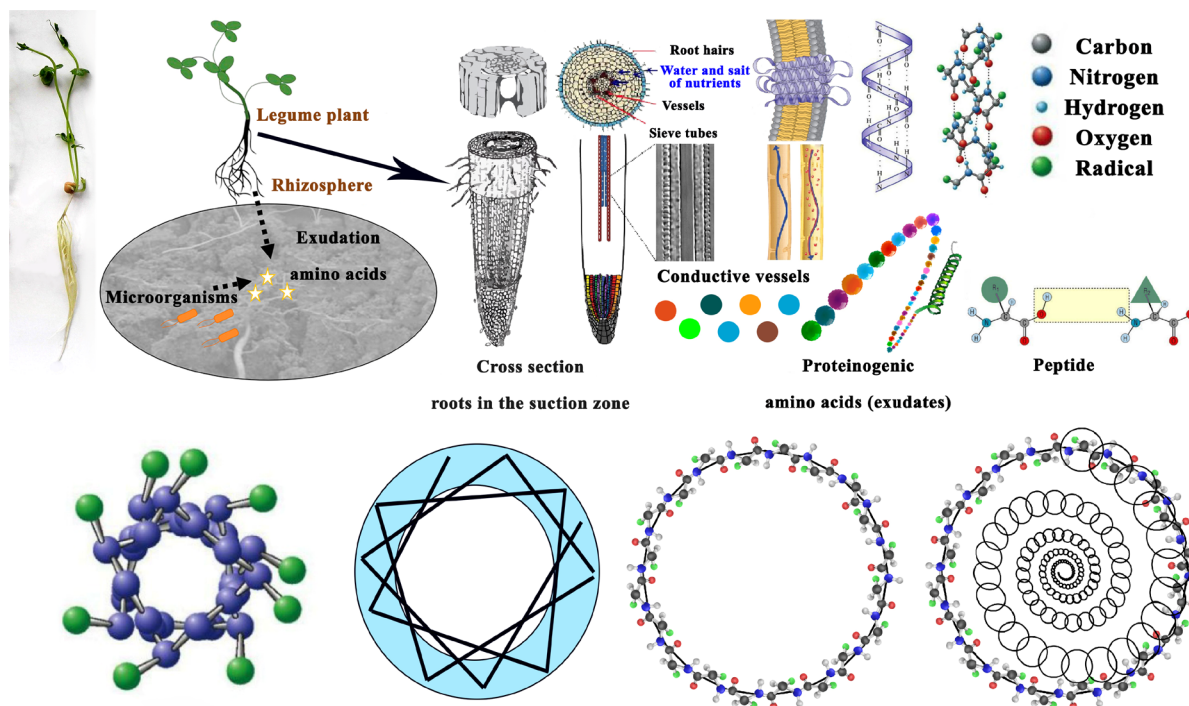


Рис. 1. Визуальное отображение концептуального подхода в оценки фрактальной организации корневой экссудации протеиногенных аминокислот, косвенно отражающих степень внутренней упорядоченности мембранных протеинов



### A spiral chain of amino acids is a set of repeating fractals

Fig. 1. Visual representation of the conceptual approach in assessing the fractal organization of the root exudation of proteinogenic amino acids, indirectly reflecting the degree of internal ordering of membrane proteins

Изменения в содержании выхода первичных мономеров в виде свободных аминокислот под воздействием ТМ свидетельствуют об их участии в синтезе и структуре стрессовых белков. При соблюдении ряда правил и наличия нужного оборудования расчет по данному методу можно проводить не только на ювенильной фазе роста, но и на протяжении всего жизненного цикла – периода вегетации культуры. Это позволяет не прибегать к извлечению объектов из среды обитания и использовать биохимический анализ без разрушения живых тканей. Важно еще отметить, что, хотя экссудаты аминокислот и имеют менее сильное сродство с ТМ, чем органические кислоты или сахара, в естественных природных условиях они утилизируются почвенной микрофлорой не так быстро, что также делает их более детерминантной основой при расчетах.

Математическая модель, спроектированная на основе собранного массива данных экссудации аминокислот, позволяет прогнозировать выход как абсолютно сухой белковой биомассы, так и урожайности зерна или другой сельскохозяйственной продукции при стандартной влажности. Чаще всего подобные исследования с использованием высших растений проводят в упрощенных гидропонных модельных системах [3]. Это дает возможность исключить из опытов фактор сорбционного воздействия, осуществляемого коллоидными частицами и агрегатами почвы. Прочие вводные переменные внешних условий среды можно регулировать при

постановке экспериментов в климатических камерах (фитотронах или синерготронах) [4–6].

Итак, цель настоящей работы – оценить изменения уровня структурной организации аминокислотного профиля корневых экзометаболитов зернобобовых растений под влиянием металл-индуцированного стресса.

#### Методология и методы исследования (Methods)

Растительными объектами для исследования послужили кадмий-чувствительный генотип гороха посевного: сорт SGE, а также уникальный кадмий-устойчивый мутант SGECdt, созданный в результате мутагенеза этилметансульфонатом лабораторной линии SGE. Механизм устойчивости мутанта к ионам кадмия ( $Cd^{2+}$ ) не связан с биосинтезом глутатиона и фитохелатинов. Мутант также показывал повышенную толерантность к накоплению токсических концентраций кобальта ( $Co^{2+}$ ), но чувствительность к воздействию ртути ( $Hg^{+}$ ). Ключевая роль в толерантности здесь принадлежала корням, поставляющим питательные вещества в надземные органы для поддержания гомеостаза и адаптации растений к токсическому действию ионов [7].

Опыт с растениями проводили в фитотроне ADAPTIS-A1000 REAICH-IN (Conviron, Canada) при температуре 21 °C, влажности воздуха 80 % и освещенности 10 000 Лк (фотопериодизм: 16 ч – день, 8 ч – ночь). Для инсоляции использовали светильники полного (Full) спектра (фотопериодизм: 16/8 ч; Ra = 90; PPFD (ФАР) =

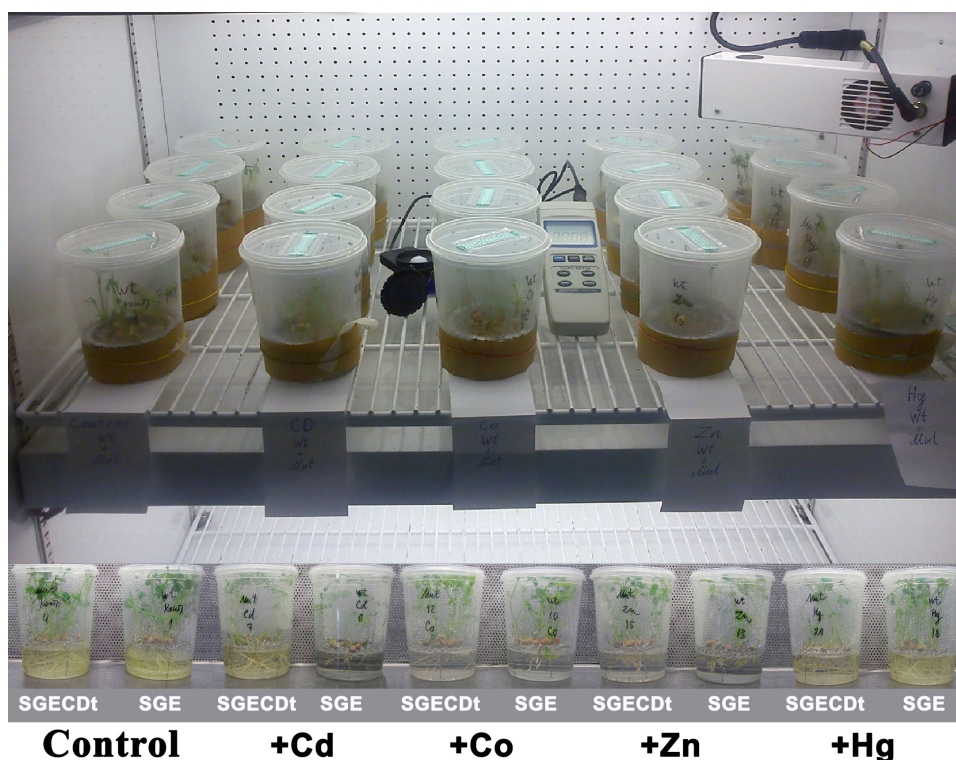
153,0/мкмоль·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>). Световые показатели измеряли люксметром (Voltcraft LX-1108, Германия) и спектрофотометром (OceanOptics STS-VIS, США). Перевод люксов в микромоли осуществляли по формуле для белого света [8].

Семенной материал перед посадкой стерилизовали в 0,5-процентном растворе гипохлорита натрия в течение 10 минут, затем тщательно промывали дистиллированной водой и проращивали в темноте при комнатной температуре в течение трех суток на стерильных чашках Петри. Пророщенные семена высаживали на металлические сетки из нержавеющей стали, помещенные в пластиковые гнотобиотические системы OS140BOX (рис. 2).

Состав питательного раствора был следующим (мл/л дистиллированной воды): Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> × 4H<sub>2</sub>O (100 mM) – 0,6; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 3H<sub>2</sub>O (600 mM) – 0,6; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O (400 mM) – 0,6; CaCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O (100 mM) – 0,6; KCl (400 mM) – 0,6; KNO<sub>3</sub> (1 M) – 0,6; FeC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> × 2,5H<sub>2</sub>O (2 mM) – 6,0; микроэлементы. На сосуд приходилось по 10 семян. Ионы ТМ вносили в среду в виде растворов солей: CdCl<sub>2</sub> в концентрации 4 мкМ, CoSO<sub>4</sub> в концентрации 40 мкМ, ZnCl<sub>2</sub> в концентрации 200 мкМ и HgNO<sub>3</sub> в концентрации 1 мкМ. Эксперименты ставились в четырехкратной аналитической повторности на каждый вариант. Продолжительность эксперимента до срока сбора экссудатов составила 14 суток. Дальнейший срок проведения эксперимента был ограничен объемом и высотой данных сосудов. В

конце опыта все сосуды проверялись на стерильность. Растения извлекали, сушили при комнатной температуре и взвешивали. Питательный раствор, содержащий корневые экссудаты, упаривали на роторном вакуумном испарителе BUCHI R-200 (BUCHI, Швейцария) до объема 5–10 мл.

Анализ экссудации протеиногенных аминокислот (кроме L-триптофана) проводили с использованием сверхпроизводительной жидкостной хроматографии высокого давления Acquity UPLC H-class (Waters, США) по рабочему протоколу с использованием флуоресцентного детектора. Количество L-триптофана определяли без дериватизации, путем разделения аминокислот на колонке Waters ACQUITY UPLC VEN RP18 Shield (1,7 мкм, 2,1 × 50 мм) (Waters, США) в смеси 0,1-процентной муравьиной кислоты (буфер А) и 75-процентного ацетонитрила с 0,1 процентной добавкой муравьиной кислоты (буфер Б). Градиент значений разбавления буфера Б при подаче в колонку варьировал от 1 до 18 % в течение первых 5 минут, затем возрастал до 80 % на 2 минуты при промывке колонки и вновь снижался до уровня 1 % при кондиционировании в течение последних 3 минут анализа образца. Скорость потока составляла 0,3 мл/мин. Детектирование L-триптофана происходило с использованием флуоресцентного детектора при длинах волн λ = 280 нм и λ = 350 нм. Стандартами для идентификации всех компонентов служили свежеприготовленные чистые образцы аминокислот.



**Control +Cd +Co +Zn +Hg**

Рис. 2. Пластиковые гнотобиотические системы для постановки стерильных опытов с семенным материалом в условиях гидросветокультуры

Fig. 2. Plastic gnotobiotic systems for fixing diseased experiments with apparent suitability in hydroculture conditions

Для расчета  $I_F$  экссудации аминокислот использовали искусственную нейронную сеть (НФС), основанную на принципе фрактального подобию чисел и повторяющихся степенных рядов [9]. Значения  $I_F$  могут варьировать в диапазоне от 0,0 до 1,0 со следующей градацией: 0,7...1,0 – высокий уровень; 0,3...0,7 – средний уровень; 0,0...0,3 – низкий уровень биоконсолидации компонентов в экссудатах. Равенство  $I_F$  нулю означает, что растение становится целиком зависимо от нестабильности внешних условий в конкретной почвенной среде, а генетический контроль над биохимическими процессами минимален. При  $I_F$  равном единице контроль над метаболизмом растения со стороны генома достигает максимального уровня, а влияние внешних факторов минимизировано. То есть чем меньше значение  $I_F$ , тем меньше согласованность экспрессии генов, определяющих экссудацию аминокислот растениями гороха, и тем больше хаоса в управлении внутренними биохимическими процессами в растениях. При этом урожайность не будет превышать среднестатистических значений.

Визуальное описание сути вычислительных преобразований в структурной взаимосвязи корневой экссудации аминокислот приведено на рис. 3. На фрактальность нейронной сети указывает пирамидальный характер заполнения нейронами слоев сети.

В слое нейронов № 0 происходит логарифмирование данных ( $y_{l,1,i}$ ), соответствующих одному вари-

анту опыта с номером ( $l$ ), по формуле (1) и упорядочивание их по убыванию.

$$y_{l,0,i} = \log_2(s_{l,0,i}), \quad (1)$$

где  $s_{l,0,i}$  – концентрация аминокислоты с номером ( $i$ ), моль;  $i = 1, 2, \dots, n$ ;

$n$  – общее число аминокислот, число нейронов в слое № 0.

В слоях № 1, ...,  $n-1$  выходные значения нейронов ( $y_{l,k,i}$ ) вычисляются по формуле (2).

$$y_{l,k,i} = y_{l,k-1,i} - y_{l,k-1,i+1}, \quad (2)$$

где  $k = 1, 3, \dots, n-1$  – номера нейронных слоев;

$n$  – число аминокислот, число нейронов в первом слое;

$i = 1, 2, \dots, n-k$  – порядковые номера нейронов в слое с номером ( $k$ );

$l$  – номер варианта опыта.

В результате в последнем слое с номером ( $n-1$ ) присутствует только один нейрон.

Промежуточная матрица  $D(l, k)$  содержит значения, вычисляемые по формуле (3).

$$d_{l,k} = \text{StandardError}(y_{l,k,1}, y_{l,k,2}, \dots, y_{l,k,n-k}), \quad (3)$$

где  $k = 1, 2, \dots, n-1$  – номер нейронного слоя;

$d_{l,n-1} = 0$ ;

$n$  – общее число аминокислот, число нейронов в слое № 0;

$l$  – номер варианта опыта.

Весовые коэффициенты ( $w_{l,k}$ ) нейронов слоя с номером ( $n$ ) вычисляются по формулам (4, 5).

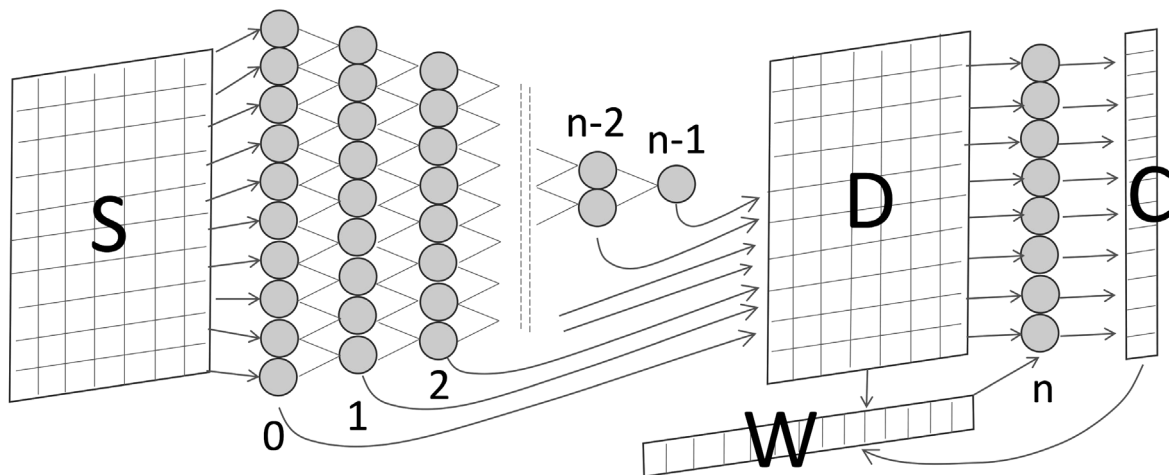


Рис. 3. Рекуррентная фрактальная нейронная сеть для обработки данных экссудации аминокислот растениями гороха и вычисления индекса структурной взаимосвязи аминокислот:

$S$  – матрица исходных данных экссудации аминокислот по вариантам опыта.  $D$  – матрица промежуточных данных.  $W$  – вектор, участвующий в вычислении весовых коэффициентов слоя нейронов с номером ( $n$ ).

$C$  – вектор индексов биоконсолидации экссудации аминокислот.

После обучения нейронной сети векторы  $C$  и  $D$  имеют коэффициент корреляции, равный единице

Fig. 3. Recurrent fractal neural network for processing data on amino acid exudation by pea plants and calculating the index of the structural relationship of amino acids:

$S$  is a matrix of initial data on the exudation of amino acids according to the variants of the experiment.  $D$  is the matrix of intermediate data.  $W$  is a vector involved in calculating the weight coefficients of the layer of neurons with number ( $n$ ).

$C$  is the vector of biocomposition indices of amino acid exudation.

After training the neural network, the vectors  $C$  and  $D$  have a correlation coefficient equal to one

$$\omega_k = \frac{1}{r_D} \cdot (r_k - r_C), r_C = \frac{1}{n-2} \cdot \sum_{k=1}^{n-2} r_k, r_D = \sqrt{\sum_{k=1}^{n-2} (r_k - r_C)^2}, \quad (4)$$

$$r_k = \text{CoefficientCorrelation}(d_{1,k}, d_{2,k}, \dots, d_{n-2,k}; w_1, w_2, \dots, w_{n-2}), \quad (5)$$

где  $k = 1, 2, \dots, n-2$ ;  $n$  – число аминокислот, число нейронов в слое № 0.

Вектор  $I_F$  вычислялся по формулам (6).

$$c_l = 1 + a \cdot p_l; \quad p_l = \frac{1}{n-2} \cdot \sum_{k=1}^{n-2} \omega_k \cdot d_{l,k}. \quad (6)$$

где  $a$  – числовая константа, не влияющая на обучение нейронной сети.

Обучение нейронной сети основано на вычислении базового коэффициента корреляции ( $R$ ) по формуле (7) и поиска весовых коэффициентов ( $w_{l,k}$ ), при которых  $R = 1$ .

$$R = \text{Correlation coefficient}(c_1, c_2, \dots, c_{n-2}; w_1, w_2, \dots, w_{n-2}) \rightarrow 1 \quad (7)$$

Для обучения нейронной сети и получения искомого результата предлагается проводить несколько циклов рекуррентных вычислений [10]. На первом шаге в вектор  $W$  вводятся случайные значения и вычисляется вектор  $C$ . Далее вектор  $W$  замещается значениями вектора  $C$ , и вычисления повторяются

(см. возвратную стрелку от  $C$  к  $W$  на рис. 3). После 5–7 итераций достигается условие  $R = 1$ .

Прочую обработку экспериментальных данных проводили с помощью пакета stats и gplots в системе R [11–12]. Для визуализации полученных данных был применен метод построения тепловой карты на основе корреляционных матрицы расстояний.

### Результаты (Results)

Как ожидалось внесение токсичных концентраций ТМ привело к ингибированию роста растений (рис. 4). Добавление кадмия и кобальта в большей мере отразилось на снижении показателей биомассы дикой линии SGE, чем у мутантного генотипа SGECdt, что лишним раз подтверждает наши результаты из прошлых работ. Известно, что кадмий вызывает значительное угнетение роста за счет подавления скорости транспирации, биосинтеза хлорофилла в листьях, а также снижение/замещение поступления биофильных микроэлементов. Кобальт же долгое время рассматривался как микроэлемент, необходимый только для животных и микроорганизмов. В настоящее время он считается

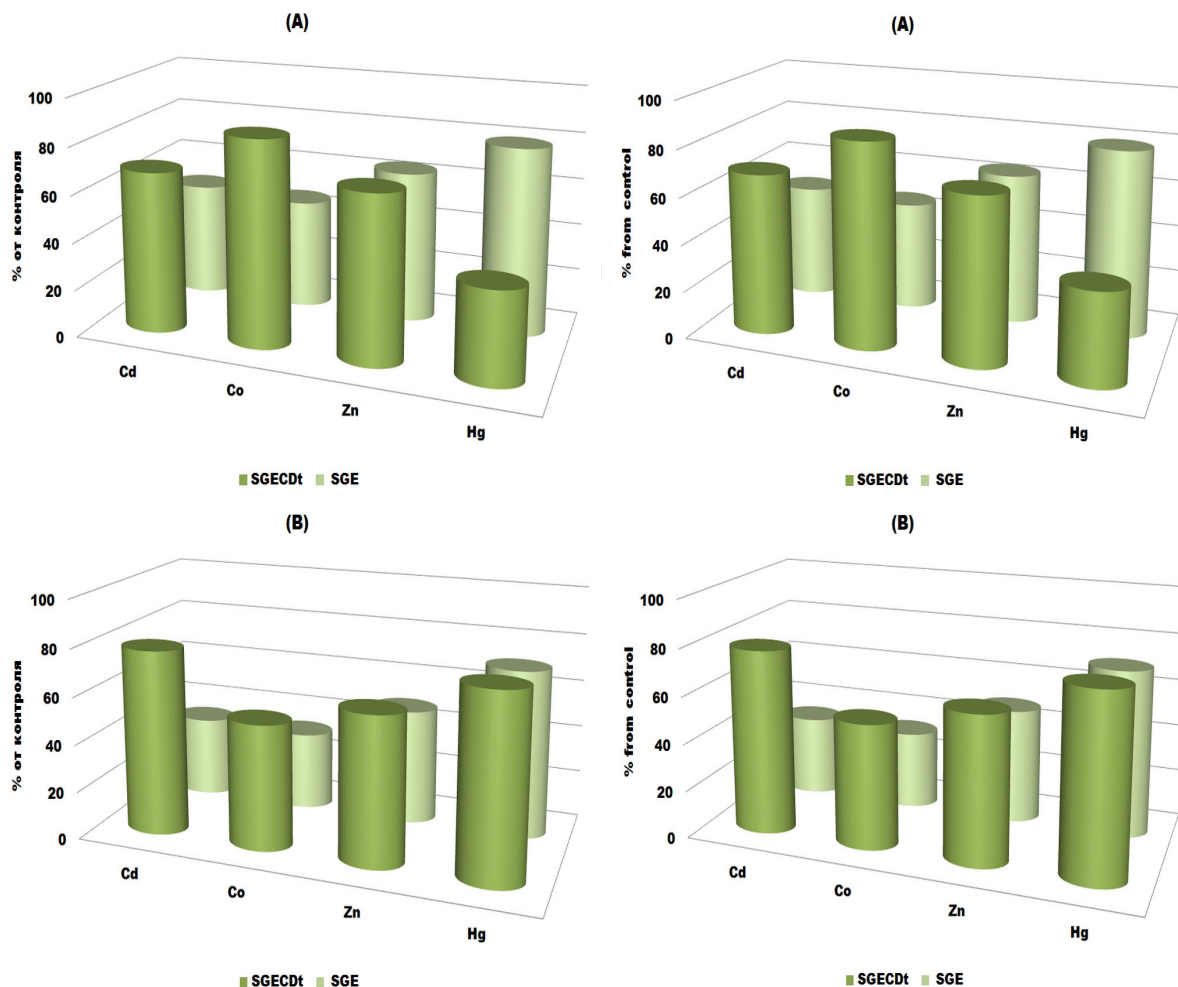


Рис. 4. Влияние воздействия тяжелых металлов на показатели сухой биомассы побегов (A) и корней (B) растений

Fig. 4. Effect of metal exposure on dry biomass of shoots (A) and roots (B) of plants

полезным и для высших растений. Так, например, у зернобобовых культур кобальт участвует в процессах фиксации атмосферного азота в клубеньках. Однако при чрезмерном накоплении его в окружающей среде он также начинает действовать на растения как ТМ второго класса опасности. Механизм устойчивости мутанта к этим токсикантам не связан с биосинтезом глутатиона и фитохелатинов. Вероятнее всего, здесь проявился эффект экологической стехиометрии, когда за счет лучшей скоординированности гомеостаза, заложенной в генотипе растений, происходит перераспределение свободной энергии, выделяемой при гидролизе АТФ, используемой для импорта эссенциальных элементов-антагонистов ТМ в корни и надземную часть. Повышенное накопление в растении отдельных полезных микроэлементов, таких как сера, молибден, марганец, медь, железо, кремний, сопряжено с метаболизмом аминокислот. Увеличение суммарного пула последних у мутанта SGECDt (рис. 5), также

связано с отдельными аспектами детоксикации ТМ в тканях растений. Добавление в питательную среду ртути, напротив, показало, что дикий тип, проявил лучшую устойчивость к токсиканту. Исходя из литературных данных, это связано с деятельностью белков-аквапоринов, отвечающих на адаптивность растений, путем регуляции их водного режима. По всей видимости, обработка мутантного генотипа SGECDt ртутью привела к существенному снижению транспирации воды, водного и осмотического потенциала листьев, тургора и гуттации. Нарушения гидролитической проводимости корней привело к деградации проводящих тканей ксилемы и флоэмы главного корня, в результате чего по восходящему току, в надземные органы растения вместе с водой стало поступать меньше растворенных в ней минеральных солей, что в итоге и привело к снижению их развития. Что касается цинка, то здесь ингибирование биомассы обоих органов у двух генотипов было равноценно.

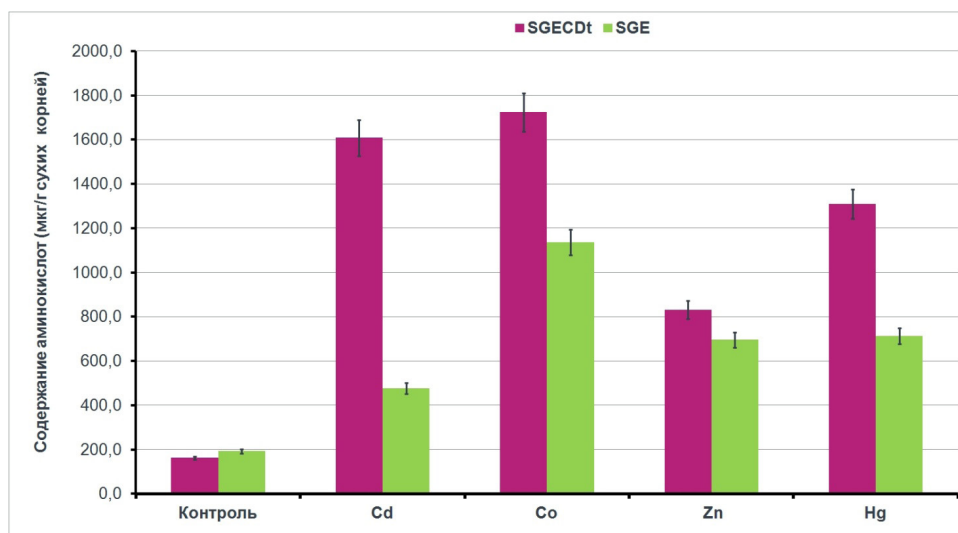


Рис. 5. Усредненные показатели фракционного состава корневых выделений у разных генотипов гороха посевного выращенных на питательной среде, обогащенной солями ТМ. Планки (бары) на столбцах обозначают ошибки средних

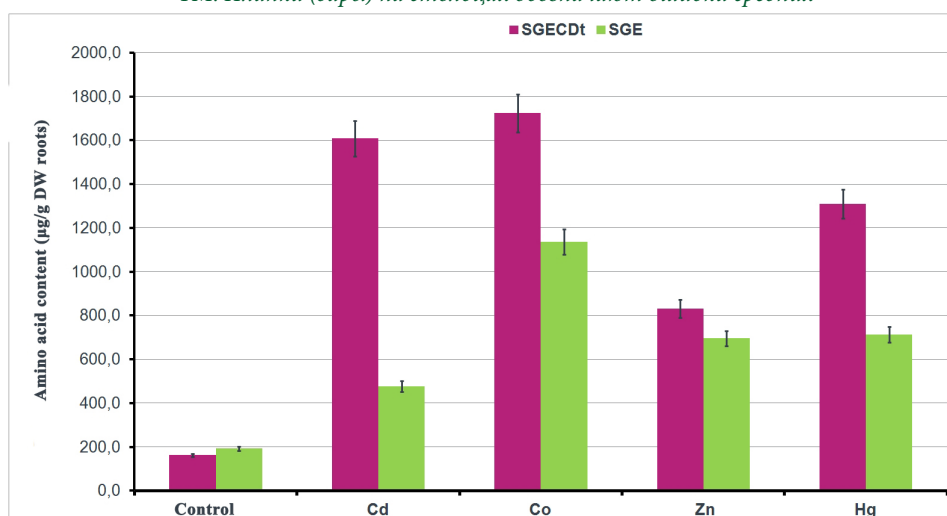


Fig. 5. Average indices of the fractional composition of root secretions in different genotypes of peas grown on a nutrient medium enriched with HM salts. The bars (bars) on the columns indicate the errors of the means

Биохимические исследования показали, что в присутствии токсичных ионов Cd и Co мутант SGECDt показал меньший выход свободного пролина, как основной стрессовой аминокислоты [13–14], по сравнению с растениями дикой линии SGE. Это согласуется с результатами, полученными нами в ранних исследованиях. Анализ соотношений, приведенный на тепловой карте (рис. 6), показал, что у обоих генотипов при добавлении в среду цинка и ртути, аминокислотный состав сфор-

мировал отдельный независимый кластер. Здесь можно отметить, что данные токсиканты привели к повышению выхода глицина в прикорневую зону у дикого типа. Этот факт можно связать с тем, что данная аминокислота входит в состав соли бетаина – важного осмолита, который быстро накапливается в растениях в условиях различных экологических стрессов [15]. Кроме того, он помогает растениям быстро восстанавливаться после сильного пагубного воздействия. У мутанта данный эффект

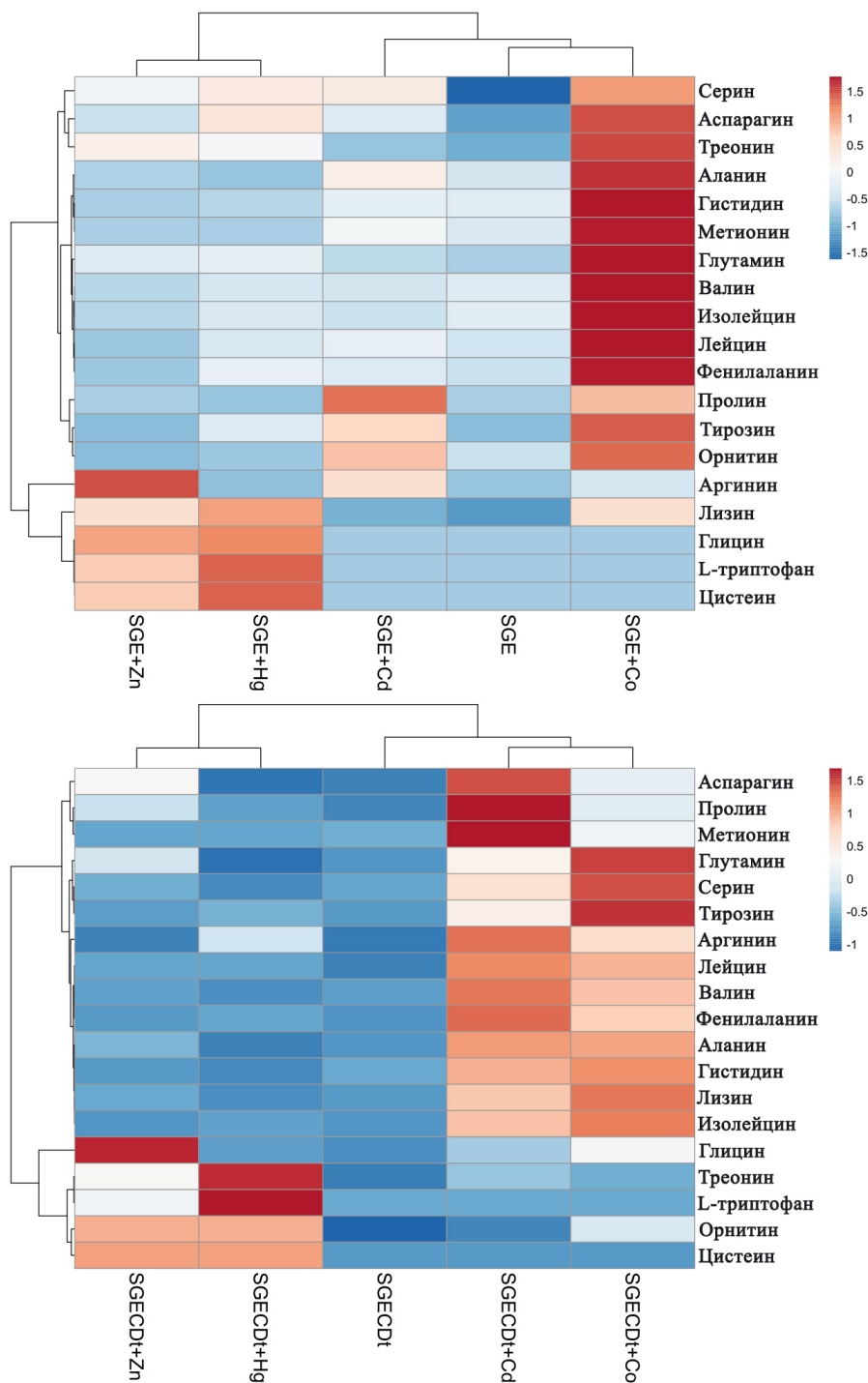


Рис. 6. Тепловая карта кластерного изменения корневых экссудатов у разных генотипов *Pisum sativum* при металл-индуцированном стрессе. Синий цвет указывает на более низкую, красный – на более высокую концентрацию каждого компонента



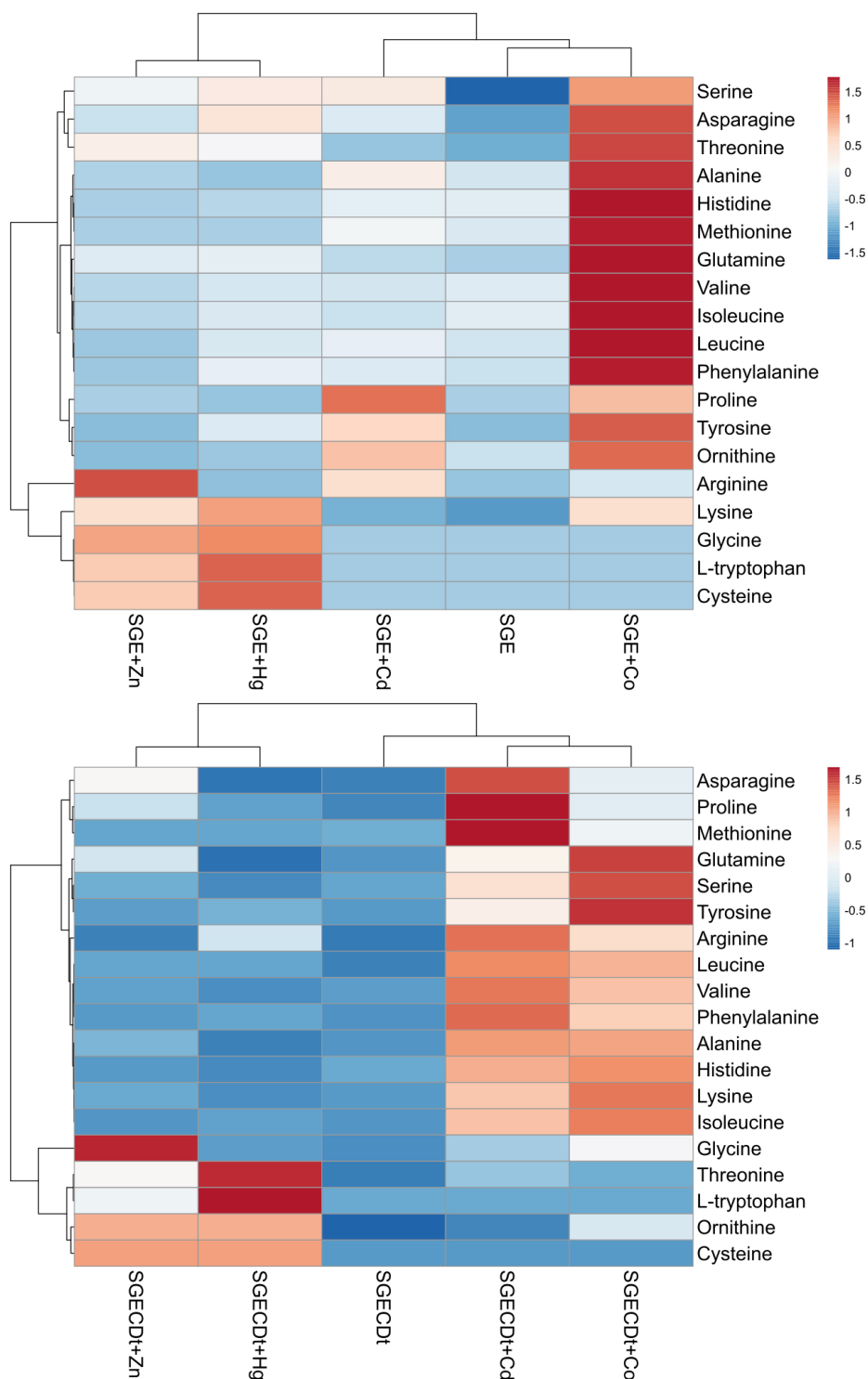


Fig. 6. Heat map of cluster changes in root exudates in different genotypes of *Pisum sativum* under metal-induced stress. Blue indicates a lower concentration, red indicates a higher concentration of each component

проявился в меньшей степени, что, как и в случае с пролином, означает другой механизм устойчивости данного мутанта к абиотическим стрессам. Так, для него при загрязнении среды солями ТМ, в особенности Zn и Hg, отмечено увеличение выхода треонина, при практически неизменном или небольшом повышении содержания аланина. Похожий результат был ранее отмечен в литературе

и в стратегии адаптации для двух металлофитов из рода *Noccaea*. Если искать примеры подобных ответных биохимических реакций на токсичное воздействие металлов среди животного царства, то здесь можно выделить исследования на мышах, где в результате скрининга 20 аминокислот лишь треонин эффективно увеличивал накопление Cd в фекалиях (аналог корневых выделений), тем самым

активно снижая аккумуляцию токсиканта в кишечнике [16]. Другой специфической аминокислотой, что может в дальнейшем использоваться в качестве индикаторной сигнальной молекулы при изучении устойчивости мутантного генотипа к воздействию абиотических стрессов, является L-триптофан. Результаты анализа показали значительное увеличение выхода данной аминокислоты при воздействии Zn и Hg. Известно, что L-триптофан является одной из наиболее значимых аминокислот для роста растений в нормальных условиях окружающей среды, а также при воздействии различных абиотических стрессов. Наравне с метионином и гистидином он играет главную роль в защите в реакциях адаптации растений к кадмиевому стрессу. Также у высших растений L-триптофан является физиологическим предшественником фитогормонов мелатонина и индоллил-3-уксусной кислоты (ИУК). Последние, обладая осмолитическими свойствами, могут ре-

гулировать транспорт различных ионов в качестве питательных веществ внутрь растения. А как было сказано ранее, поступление питательных элементов вместе с водой в надземные органы, является основным механизмом толерантности мутанта к токсическому действию ионов ТМ [7]. На примере других бобовых (белого люпина и нута) экзогенная обработка триптофаном в большинстве случаев улучшала рост и фотосинтетическую активность растений. Также обработка триптофаном была наиболее эффективным способом повышения продуктивности растений *Lupinus termis* L, подвергшихся стрессу в виде засухи [17].

Результаты расчета с применением нейронной сети и  $I_F$  приведены в таблице 1. Нейронные сети контролируют только смещение  $I_F$  и весовых данных относительно контроля. Размерные данные нейронные сети не контролируют. Поэтому в таблице приведены смещения.

Таблица 1

**Значения индекса биоконпозиции экссудации аминокислот растениями гороха по вариантам опыта и его смещение относительно контрольного варианта и среднего веса**

№	Варианты опыта	Индекс биоконпозиции аминокислот ( $I_F$ )	Средний вес растения, мг	Смещение индекса биоконпозиции аминокислот, %	Смещение среднего веса растений, %
1	SGE	0,39	87	0	0
2	SGE + Cd	0,34	38	-14,9	-56,4
3	SGE + Co	0,36	36	-0,9	-58,2
4	SGE + Zn	0,45	51	-18,4	-41,1
5	SGE + Hg	0,44	66	-18,1	-23,6
Коэффициент корреляции				-0,67	
6	SGECDt	0,31	73	0	0
7	SGECDt + Cd	0,37	52	3,5	-29,0
8	SGECDt + Co	0,39	56	-4,8	-23,3
9	SGECDt + Zn	0,58	50	-53,2	-2,2
10	SGECDt + Hg	0,37	36	-77,3	-50,2
Коэффициент корреляции				0,01	
Ошибки средних		±0,03	±5	-	-

Table 1

**Values of the biocomposition index of amino acid exudation by pea plants according to the experimental variants and its displacement relative to the control variant and the average weight**

No.	Experience options	Amino acid biocomposition index ( $I_F$ )	Average plant weight, mg	Amino acid biocomposition index shift, %	Shift in the average weight of plants, %
1	SGE	0.39	87	0	0
2	SGE + Cd	0.34	38	-14.9	-56.4
3	SGE + Co	0.36	36	-0.9	-58.2
4	SGE + Zn	0.45	51	-18.4	-41.1
5	SGE + Hg	0.44	66	-18.1	-23.6
Correlation coefficient				-0,67	
6	SGECDt	0.31	73	0	0
7	SGECDt + Cd	0.37	52	3.5	-29.0
8	SGECDt + Co	0.39	56	-4.8	-23.3
9	SGECDt + Zn	0.58	50	-53.2	-32.2
10	SGECDt + Hg	0.37	36	-77.3	-50.2
Correlation coefficient				0.01	
Standard error		±0.03	±5	-	-

**Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)**

У SGE коэффициент корреляции  $(-0,67)$   $I_F$  со средней массой растений указывает на то, что чем больше хаоса в растительных биохимических процессах, тем меньше биомасса растений. Как и ожидалось, у SGE имелась чувствительность к Cd, Zn и Hg. Однако обнаружена устойчивость к выбранной концентрации Co. Отрицательное значение коэффициента корреляции  $I_F$  со средними значениями сухой биомассой у дикого типа также означает, что при данных концентрациях содержания ТМ в питательной среде растение затрачивает больше сил на накопление биомассы уже на ювенильной фазе своего роста с целью последующего проявления эффекта разбавления токсикантов при дальнейшем развитии в онтогенезе.

У SGECDt корреляция  $I_F$  со средней массой растений отсутствует  $(0,01)$ . Это указывает на то, что в данном растении существенно изменена схема биохимических процессов в сторону меньшей чувствительности к одним ТМ и большей чувствительности к другим. Подтверждена устойчивость к Cd и Co и чувствительность к Zn и Hg.

Дестабилизация аминокислотного состава корневых выделений под действием ТМ, вероятно, связана с экспрессией определенного числа генов, в результате чего в растениях активизируется синтез и структура стрессовых белков и металлсвязывающих соединений, повышающих устойчивость и адаптацию растений. Экзометаболиты в виде аминокислот Треонина и L-триптофана могут служить здесь специфическими сигнальными молекулами для первичной оценки устойчивости мутантного генотипа растений гороха SGECDt к воздействию различных абиотических стрессов.

Определение аминокислотного состава корневых выделений в различные периоды роста расте-

ний, дает возможность оценить результаты сложных процессов азотфиксации, выявить суммарный эффект воздействия азота на синтез аминокислот с учетом изменений в развитии растений, а также охарактеризовать качество растительной продукции.

В перспективе представляется возможным сравнительные исследования, сочетающие анализы изменения экзо- и эндогенных показателей растительных метаболитов. Также, поскольку чаще всего загрязнения сред ТМ носят полиметаллический характер, чтобы полностью раскрыть механизмы адаптации растительных культур, на основе подобранных концентраций ТМ планируется проведение экспериментов с комбинированным воздействием токсикантов.

**Благодарности (Acknowledgements)**

Статья подготовлена в рамках выполнения Государственного задания No. FGEW-2021-0004 «Выделение, изучение и скрининг перспективных штаммов симбиотических, ассоциативных бактерий и грибов арбускулярной микоризы, для создания высокоэффективных и технологичных биопрепаратов широкого спектра действия и разработка подходов к созданию комбинированных биопрепаратов на основе геномного анализа и подбора штаммов, обладающих комплементарными наборами генов, ответственных за эффективное взаимодействие с растениями».

Полученные данные также являлись частью кандидатской диссертации Яна Викторовича Пухальского. Авторы признательны доктору биологических наук А. А. Белимову за предоставление семенного материала, а также кандидату биологических наук, ведущему научному сотруднику ВНИИСХМ А. И. Шапошникову за помощь с получением расчетных данных.

**Библиографический список**

1. Daudert D. G. Exploring the Impact of Pretrained Bidirectional Language Models on Protein Secondary Structure Prediction. Michigan: Masters Theses, 2018. 65 p.
2. Розенберг Г. С. Фрактальные методы анализа структуры сообществ // Принципы экологии. 2018. № 4. С. 4–43.
3. Kawasaki A., Okada S., Zhang C. et al. A sterile hydroponic system for characterising root exudates from specific root types and whole-root systems of large crop plants // Plant Methods. 2018. Vol. 14. Article number 114. DOI: 10.1186/s13007-018-0380-x.
4. Драгавцев В. А. Новая система регуляции у растений и необходимость создания селекционного фототрона в РФ // Журнал технической физики. 2018. № 88. С. 1331–1335.
5. Зеленков В. Н., Верник П. А., Бандурин В. В., Латушкин В. В., Новиков В. Б., Гаврилов С. В., Коршук В. А. Использование программно-аппаратного цифрового комплекса «Синерготрон» для разработки инновационных технологий выращивания растений // Международный академический вестник. 2019. № 7 (39). С. 37–40.
6. Латушкин В. В., Зеленков В. Н., Лапин А. А., Верник П. А., Гаврилов С. В., Новиков В. Б. Экспериментальное моделирование условий онтогенеза растений и биотехнологических методов их выращивания в закрытой экосистеме – синерготроне // Вестник РАН. 2021. Т. 21. № 1. С. 46–53.

7. Belimov A. A., Malkov N. V., Puhalsky J. V., Tsyganov V. E., Bodyagina K. B., Safronova V. I., Dietz K. J., Tikhonovich I. A. The Crucial Role of Roots in Increased Cd-tolerance and Cd-accumulation in the Pea (*Pisum sativum* L.) Mutant SGECDt // *Plant Biology*. 2018. Vol. 62. No. 3. Pp. 543–550.
8. Sharakshane A. An easy estimate of the PFDD for a plant illuminated with white LEDs: 1000 lx = 15  $\mu\text{mol/s/m}^2$  // *BioRxiv*. 2018. DOI: 10.1101/289280.
9. Гафаров Ф. М., Галимянов А. Ф. Искусственные нейронные сети и приложения: учебное пособие. Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2018. 121 с.
10. Гудфеллоу Я., Бенджио И., Курвилль А. Глубокое обучение. Москва: ДМК Пресс, 2018. 652 с.
11. Team Core R. A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: Statistical Computing, 2018. 1731 p.
12. Weinberg S., Harel D., Abramowitz S. *Statistics Using R: An Integrative Approach*. Cambridge: Cambridge University Press, 2020. 692 p.
13. Ghosh U. K., Islam M. N., Siddiqui M. N., Cao X., Khan M. A. R. Proline, a multifaceted signalling molecule in plant responses to abiotic stress: understanding the physiological mechanisms // *Plant Biology*. 2022. No. 24 (2). Pp. 227–239.
14. Siddique A., Kandpal G., Kumar P. Proline Accumulation and its Defensive Role Under Diverse Stress Condition in Plants: An Overview // *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2018. Vol. 12 (3). Pp. 1655–1659.
15. Ali S., Abbas Z., Seleiman M. F., Rizwan M., Yava Ş İ., Alhammad B. A., Shami A., Hasanuzzaman M., Kalderis D. Glycine Betaine Accumulation, Significance and Interests for Heavy Metal Tolerance in Plants // *Plants*. 2020. Vol. 9 (7). Article number 896. DOI: 10.3390/plants9070896.
16. Li Y., Fang Z., Zhou X., Gao J., Wang J., Huang L., Chen Y., Sun L., Deng Q., Gooneratne R. Threonine Facilitates Cd Excretion by Increasing the Abundance of Gut *Escherichia coli* in Cd-Exposed Mice // *Molecules*. 2023. Vol. 28 (1). Article number 177. DOI: 10.3390/molecules28010177.
17. Sadak M. S., Ramadan A. A. E. Impact of melatonin and tryptophan on water stress tolerance in white lupine (*Lupinus termis* L.) // *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2021. Vol. 27 (3). Pp. 469–481.

**Об авторах:**

Ян Викторович Пухальский<sup>1</sup>, инженер-микробиолог I категории, ORCID 0000-0001-5233-3497, AuthorID 784249; +7 952-399-61-66, [puhalskyan@gmail.com](mailto:puhalskyan@gmail.com)

Николай Иванович Воробьев<sup>1</sup>, кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник, ORCID 0000-0001-8300-2287, AuthorID 86787; +7 905 279-46-61, [nik.ivanvorobyov@yandex.ru](mailto:nik.ivanvorobyov@yandex.ru)

Святослав Игоревич Лоскутов<sup>2</sup>, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник, ORCID 0000-0002-8102-2900, AuthorID 688368; +7 905 214-43-23, [lislosk@mail.ru](mailto:lislosk@mail.ru)

Юрий Владимирович Лактионов<sup>1</sup>, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией экологии симбиотических и ассоциативных ризобактерий, ORCID 0000-0001-6241-0273, AuthorID 557086; +7 911 734-10-40, [laktionov@list.ru](mailto:laktionov@list.ru)

<sup>1</sup> Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

<sup>2</sup> ВНИИПД – филиал ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

## Genotypic screening for the resistance of leguminous crops to the effects of heavy metals, based on neuron profiling of their amino acid exudation

Ya. V. Pukhalskiy<sup>1</sup>✉, N. I. Vorobyev<sup>1</sup>, S. I. Loskutov<sup>2</sup>, Yu. V. Laktionov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Pushkin, Russia

<sup>2</sup> VNIIPD – a branch of Gorbатов Research Center for Food Systems, Saint Petersburg, Russia

✉E-mail: [puhalskyan@gmail.com](mailto:puhalskyan@gmail.com)

**Abstract.** The purpose of the article was to assess the change in the level of structural organization of the amino acid profile of root exometabolites of various resistance genotypes of peas under the influence of metal-induced stress. **Research method.** Plants were grown under sterile controlled conditions (climatic chamber) with the addition of toxic concentrations, cadmium, cobalt, zinc or mercury to the nutrient medium. The objects for the study were the Cd-sensitive genotype of the pea variety SGE, as well as the unique Cd-resistant mutant SGECDt cre-

ated on its basis. **Results.** It has been established that all salt solutions of metals have an inhibitory effect on plant growth rates. At the same time, as expected, the addition of cadmium and cobalt to the medium had a greater effect on the decrease in the biomass of the wild line SGE than in the mutant genotype SGECdt. The latter reacted more to the introduction of toxic mercury into the environment. As for zinc, here, the inhibition of the biomass of both organs in the two genotypes was equivalent. The addition of all toxicants to the medium led to an increase in the total yield of all amino acids. In the SGECdt mutant, this manifested itself to a greater extent, which is associated with certain aspects of metal detoxification in this genotype in plant tissues. Cluster analysis made it possible to separate the ratios of the amino acid profile obtained on zinc and mercury in both genotypes into a separate independent group. The results of calculations using a neural network confirmed the resistance of the mutant to Cd and Co ions, and sensitivity to Zn and Hg. The wild line was found to be resistant to the selected concentration of Co. **Scientific innovation.** The mathematical model, designed on the basis of the collected amino acid exudation data array, makes it possible, on the basis of a matrix of correlation ratios, to predict the yield of absolutely dry plant protein biomass and to primary screening the adaptive lability of various varieties under metal-induced stress.

**Keywords:** *Pisum sativum*, SGECdt, heavy metals, root secretions, amino acids, neural network, fractals, biocomposition indices.

**For citation:** Pukhalskiy Ya. V., Vorobyev N. I., Loskutov S. I., Laktionov Yu. V. Genotipicheskiy skринing us-toyчивости zernobobovykh kul'tur k vozdeystviyu tyazhelykh metallov na osnovanii neyronnogo profilirovaniya ekssudatsii ikh aminokislot [Genotypic screening for the resistance of leguminous crops to the effects of heavy metals, based on neuron profiling of their amino acid exudation] // Agrarian Bulletin of the Urals. 2023. No. 05 (234). Pp. 83–96. DOI: 10.32417/1997-4868-2023-234-05-83-96. (In Russian.)

**Date of paper submission:** 12.01.2023, **date of review:** 02.02.2023, **date of acceptance:** 13.02.2023.

#### References

1. Daudert D. G. Exploring the Impact of Pretrained Bidirectional Language Models on Protein Secondary Structure Prediction. Michigan: Masters Theses, 2018. 65 p.
2. Rozenberg G. S. Fraktal'nyye metody analiza struktury soobshchestv [Fractal methods for analyzing the structure of communities] // Principles of ecology. 2018. No. 4. Pp. 4–43. (In Russian.)
3. Kawasaki A., Okada S., Zhang C. et al. A sterile hydroponic system for characterising root exudates from specific root types and whole-root systems of large crop plants // Plant Methods. 2018. Vol. 14. Article number 114. DOI: 10.1186/s13007-018-0380-x.
4. Dragavtsev V. A. Novaya sistema regulyatsii u rasteniy i neobkhodimost' sozdaniya selektsionnogo fitotrona v RF [A new system of regulation in plants and the need to create a breeding phytotron in the Russian Federation] // Journal of technical physics. 2018. No. 88. Pp. 1331–1335. (In Russian.)
5. Zelenkov V. N., Vernik P. A., Bandurin V. V., Latushkin V. V., Novikov V. B., Gavrillov S. V., Korshuk V. A. Ispol'zovaniye programmno-apparatnogo tsifrovogo kompleksa "Sinergotron" dlya razrabotki innovatsionnykh tekhnologiy vyrashchivaniya rasteniy [Use of software and hardware digital complex "Synergotron" for the development of innovative technologies for growing plants] // International Academic Bulletin. 2019. No. 7 (39). Pp. 37–40. (In Russian.)
6. Latushkin V. V., Zelenkov V. N., Lapin A. A., Vernik P. A., Gavrillov S. V., Novikov V. B. Eksperimental'noye modelirovaniye usloviy ontogeneza rasteniy i biotekhnologicheskikh metodov ikh vyrashchivaniya v zakrytoy ekosisteme – sinergotron [Experimental modeling of plant ontogenesis conditions and biotechnological methods of their cultivation in a closed ecosystem – synergotrone] // Bulletin of the Russian Academy of Natural Sciences. 2021. Vol. 21. No. 1. Pp. 46–53. (In Russian.)
7. Belimov A. A., Malkov N. V., Puhalsky J. V., Tsyganov V. E., Bodyagina K. B., Safronova V. I., Dietz K. J., Tikhonovich I. A. The Crucial Role of Roots in Increased Cd-tolerance and Cd-accumulation in the Pea (*Pisum sativum* L.) Mutant SGECdt // Plant Biology. 2018. Vol. 62. No. 3. Pp. 543–550.
8. Sharakhshane A. An easy estimate of the PFDD for a plant illuminated with white LEDs:  $1000 \text{ lx} = 15 \mu\text{mol/s/m}^2$  // BioRxiv. 2018. DOI: 10.1101/289280.
9. Gafarov F. M., Galimyanov A. F. Iskusstvennyye neyronnyye seti i prilozheniya: uchebnoye posobiye [Artificial neural networks and applications: textbook]. Kazan: Kazan Publishing House. un-ta, 2018. 121 p. (In Russian.)
10. Goodfellow J., Bengio I., Courville A. Glubokoye obucheniye [Deep learning]. M.: DMK Press, 2018. 652 p. (In Russian.)
11. Team Core R. A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: Statistical Computing, 2018. 1731 p.

12. Weinberg S., Harel D., Abramowitz S. *Statistics Using R: An Integrative Approach*. Cambridge: Cambridge University Press, 2020. 692 p.
13. Ghosh U. K., Islam M. N., Siddiqui M. N., Cao X., Khan M. A. R. Proline, a multifaceted signalling molecule in plant responses to abiotic stress: understanding the physiological mechanisms // *Plant Biology*. 2022. No. 24 (2). Pp. 227–239.
14. Siddique A., Kandpal G., Kumar P. Proline Accumulation and its Defensive Role Under Diverse Stress Condition in Plants: An Overview // *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2018. Vol. 12 (3). Pp. 1655–1659.
15. Ali S., Abbas Z., Seleiman M. F., Rizwan M., Yava Ş İ., Alhammad B. A., Shami A., Hasanuzzaman M., Kalderis D. Glycine Betaine Accumulation, Significance and Interests for Heavy Metal Tolerance in Plants // *Plants*. 2020. Vol. 9 (7). Article number 896. DOI: 10.3390/plants9070896.
16. Li Y., Fang Z., Zhou X., Gao J., Wang J., Huang L., Chen Y., Sun L., Deng Q., Gooneratne R. Threonine Facilitates Cd Excretion by Increasing the Abundance of Gut Escherichia coli in Cd-Exposed Mice // *Molecules*. 2023. Vol. 28 (1). Article number 177. DOI: 10.3390/molecules28010177.
17. Sadak M. S., Ramadan A. A. E. Impact of melatonin and tryptophan on water stress tolerance in white lupine (*Lupinus termis* L.) // *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2021. Vol. 27 (3). Pp. 469–481.

#### ***Authors' information:***

Yan V. Pukhalskiy<sup>1</sup>, 1st category microbiologist engineer, ORCID 0000-0001-5233-3497, AuthorID 784249; +7 952-399-61-66, [pukhalskiyan@gmail.com](mailto:pukhalskiyan@gmail.com)

Nikolay I. Vorobyev<sup>1</sup>, candidate of technical sciences, leading researcher, ORCID 0000-0001-8300-2287, AuthorID 86787; +7 905 279-46-61, [nik.ivanvorobyov@yandex.ru](mailto:nik.ivanvorobyov@yandex.ru)

Svyatoslav I. Loskutov<sup>2</sup>, candidate of agricultural sciences, senior researcher, ORCID 0000-0002-8102-2900, AuthorID 688368; +7 905 214-43-23, [lislosk@mail.ru](mailto:lislosk@mail.ru)

Yuriy V. Laktionov<sup>1</sup>, candidate of biological sciences, leading researcher, head of the laboratory of ecology of symbiotic and associative rhizobacteria, ORCID 0000-0001-6241-0273, AuthorID 557086; +7 911 734-10-40, [laktionov@list.ru](mailto:laktionov@list.ru)