



На правах рукописи

Алиева Зарина Магомедрасуловна

**РЕАКЦИЯ ОТДЕЛЕННЫХ ОРГАНОВ
РАСТЕНИЙ НА СОЛЕВОЙ СТРЕСС**

*Специальность 03.00.12 – физиология
и биохимия растений*

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2001

Работа выполнена на кафедре физиологии растений и дарвинизма
Дагестанского государственного университета

Научный руководитель: доктор биологических наук,
профессор Юсуфов А.Г.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор Ермаков И.П.
доктор биологических наук
Балнокин Ю.В.

Ведущая организация: Дагестанский государственный
педагогический университет

Защита диссертации состоится «4» декабря 2001г. в 11 часов на
заседании диссертационного совета К 002/210.01 по присуждению ученой
степени кандидата биологических наук при Институте физиологии растений
им. К.А.Тимирязева.

Адрес: 127276 Москва, ул. Ботаническая , 35.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
физиологии растений.

Автореферат разослан «10» сентября 2001г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук



Азаркович М.И.

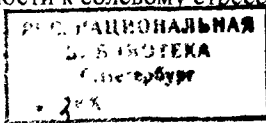
ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Онтогенез высших растений сопряжен со сложными дифференцировками и сменой направлений и условий морфогенеза (Чайлахян, 1955; Синно, 1963; Wareing, Phillips, 1978) Особое значение для регуляции целостности и продуктивности растений имеет возможность восстановления утраченных структур при повреждениях индивидуума. Для ее изучения используются различные модели (Бугенко, 1964; Чайлахян, 1975).

Чувствительность растений к различным стрессовым воздействиям обычно оценивается по проявлению реакции отдельных органов (Костюк и др., 1994). Реакция же на солевой стресс отдельных органов в изолированной культуре по проявлению процессов регенерации и способности к восстановлению целостности остается пока мало изученной. Исследование этого вопроса представляет интерес для оценки устойчивости самого растения к стрессам (Строгонов, 1962; Минаева и др., 1992; Юсуфов, Магомедова, 1998). С другой стороны, изучение органов в изолированном состоянии позволяет выяснить, насколько дифференциация связана с физиологической чувствительностью отдельных органов и структур к критическому воздействию. Для решения этого вопроса удобным является сравнение реакции отделенных структур одного и того же растения и гомологичных структур разных объектов, что позволяет быстро получить и оценить результаты. Имеются данные по действию засоления среды на изолированные корни, листья, стеблевые черенки, каллусы (Строгонов, 1962; Калинин и др., 1980; Строгонов и др., 1989). Однако пока мало уделяется внимания сравнительному изучению реакции на солевой стресс разных изолированных структур в пределах одного и того же и различных растений. Такое сравнение делалось нами по разным показателям, включая выживаемость и процессы регенерации. Особое внимание уделяли ризогенезу, как показателю, характеризующему состояние жизнеспособности структуры. К тому же высокая чувствительность меристематических тканей делает их удобным тестом для оценки действия засоления на изолированные органы. Эти показатели дополнены изучением содержания ионов натрия и пролина.

Цели и задачи исследования. Цель работы - сравнительное изучение реакции отделенных структур разной степени сложности на солевой стресс и выяснение возможности их использования для оценки солеустойчивости целого растения. В связи с этим ставились следующие задачи:

1. Сравнение реакции разных отделенных органов растений на солевой стресс (NaCl);
2. Сравнение реакции различных видов растений на начальных этапах развития на солевой стресс по морфофизиологическому состоянию отделенных структур разной степени организации;
3. Выяснение чувствительности к солевому стрессу отделенных орга-



нов в зависимости от накопления ионов Na^+ в тканях и степени повреждения;

4. Выбор показателей, характеризующих солеустойчивость растений по реакции отделенных органов.

Научная новизна работы. Исследование выполнено на стыке проблем дифференциации, регенерации и действия солевого стресса. В работе впервые дается сравнительная оценка чувствительности к солевому стрессу разных изолированных структур одного и того же и разных объектов, отличающихся по солеустойчивости и способности к морфогенезу путем регенерации.

Впервые проведено сравнение нормы реакции различных органов и структур разной организации по их чувствительности к воздействию солевого стресса по нескольким параметрам, определяющим их жизнеспособность. Ризогенез отделенных органов и структур использован как морфофизиологический тест на устойчивость растений к солевому стрессу. Показано, что чувствительность к засолению органов и структур зависит от сложности их организации и взаимодействия в системе. Полученные результаты служат конкретизацией особенностей морфогенеза и устойчивости растений в условиях солевого стресса.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Характеристика жизнеспособности структур разного происхождения и ее зависимости от степени сложности у различных объектов в условиях солевого стресса.

2. Определение параметров и возможностей использования реакции отделенных органов для оценки солеустойчивости растений.

Теоретическая и практическая значимость работы. На базе общей генетической основы при дифференциации происходит изменение пороговой чувствительности структур. Полученные при выполнении данной работы результаты имеют значение для оценки возможности моделирования реакции на солевой стресс целого растения по реакции изолированных структур и могут стать основой для разработки метода определения солеустойчивости отделенных органов в изолированной культуре. Они служат дальнейшим развитием представлений о целостности, способности к регенерации и устойчивости растений.

Материалы работы используются в учебном процессе на биологическом факультете Даггосуниверситета при чтении курсов «Физиология растений», «Физиология устойчивости растений», « Физиология роста и развития растений» и проведении лабораторных занятий по отдельным разделам большого практикума.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на научных конференциях профессорско-преподавательского состава ДГУ (1995-2000 г.), межвузовской научной конференции «Проблемы сельскохозяйственной экологии» (Махачкала, 1996), межвузовской студенческой науч-

ной конференции, посвященной 65-летию ДГУ (Махачкала, 1997), VII Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда» (Москва, 1997), II Международной конференции «Изучение онтогенеза растений природных и культурных флор в ботанических учреждениях и дендропарках Евразии (Белая Церковь, 1998), II (X) съезде Русского ботанического общества (Санкт-Петербург, 1998), юбилейной конференции ДНЦ РАН (Махачкала, 1999), IV съезде общества физиологов растений (Москва, 1999).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 работ и 1 находится в печати.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 156 стр машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, содержащего 196 источников (из них 60 зарубежные), приложения, содержит 40 таблиц и 25 рисунков.

Объекты и методы исследования

Основным объектом исследований являлась фасоль обыкновенная (*Phaseolus vulgaris* L.) сорта Сакс. В части опытов использованы баклажан (*Solanum melongena* L.) сорта Алмаз, подсолнечник (*Helianthus annuus* L.) сорта ВНИИМК 8883, томат (*Lycopersicon esculentum* Mill.) сорта Утро, свекла (*Beta vulgaris* L.) сорта Бордо 437, гледичия (*Gleditschia triacanthos* L.). При их выборе учитывали солеустойчивость и регенерационную активность отделенных структур. Фасоль – солечувствительная, более устойчивы подсолнечник, свекла; промежуточное положение занимают баклажан, томат.

У растений в возрасте 5-30 дней отделяли листья (без почек, с черешками и без черешков), семядоли, гипокотильные и стеблевые черенки (рис.1). Стеблевые черенки срезали над семядолями либо с сохранением, либо с удалением точек роста и листьев. Гипокотильные черенки срезали на расстоянии около 1-2 см над корневой системой с сохранением или удалением точек роста и семядолей. Культивирование структур вели в широком диапазоне концентраций NaCl (5-80 мМ). Дополнительно проводили опыты, где NaCl вводили в жидкую среду Мурасиге-Скуга (МС) (1/6 нормы). В качестве контроля использовали воду или среду МС без NaCl. Изолированные структуры в большей части опытов культивировали в пенициллиновых стаканчиках или пробирках по 1-2 в каждом при естественном освещении (комнатные условия) и температуре 21-26°C, в некоторых опытах - при дополнительном искусственном освещении. Основную часть опытов проводили в весеннее и осеннее время. Растворы меняли через 3-4 дня или чаще. Структуры культивировали в растворах соли постоянно или

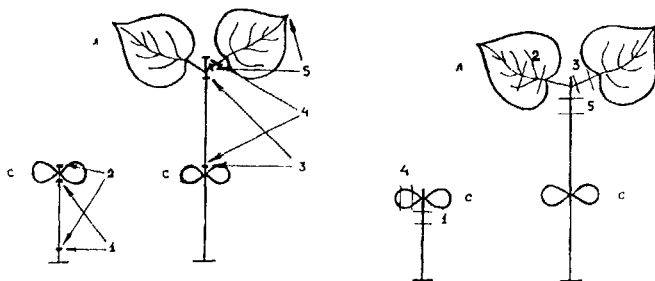
кратковременно (с дальнейшим докультивированием в воде)

Часть опытов проводили в условиях *in vitro* Асептика обеспечивалась по общепринятой методике (Бутенко, 1964; Калинин и др., 1980). Экспланты гипокотилей (ЭГ), пластинок листа (ЭЛ), черешков (ЭЧ), семядолей (ЭС) и побегов (ЭП) (рис 2) размером 5-10 мм помещали на среду (МС) с добавлением индолил-3-масляной кислоты (ИМК) и 6-бензиламинопурина (БАП) в разных соотношениях. Солевой стресс создавали введением в среду NaCl в концентрации 0.5 и 1.0%

Оценку действия солевого стресса на изолированные структуры проводили по комплексу показателей: выживаемость (% живых от общего числа по разным срокам учета); продолжительность жизни (ПЖ) (в сут.); общая укореняемость, сроки и мощность каллусообразования и развития корневой системы (количество и длина корней, величина ризогенной зоны), соотношение биомассы корней и надземной части, характер и тип повреждений. В опытах *in vitro* учитывались также тип и мощность каллуса, рост эксплантов после помещения на среду.

Морфологический анализ сочетался с изучением интенсивности накопления свободного пролина (по методу L.S.Bates et al., 1973, в модификации Л.Г.Калинкиной и др., 1990) и изменения содержания ионов натрия, калия и кальция в разных структурах после сжигания при 450-500°C высушенного материала (Разумов, 1986). Определение проводили на атомно-адсорбционном спектрометре (AASIN, ГДР, Carl Zeiss, Jena). В отдельных опытах определяли содержание зеленых пигментов на СФ-46 (Гавриленко и др., 1975). В таблицах приведены средние арифметические значения для варианта и их ошибки (Лакин, 1990).

Рис.1. Схема отделения структуры Рис.2.Схема отделения экспланта



1 Отрезок гипокотыля без точки роста и семядолей 2 Отрезок гипокотыля с точкой роста и семядолями 3 Отрезок эпикотыля без точки роста и листьев 4 Отрезок эпикотыля с точкой роста и листьями 5 Лист

1 Гипокотиль
2 Листовая пластинка
3 Черешок
4 Семядоля
5 Эпикотиль
Л – лист, С – семядоля

Выживаемость и процессы регенерации у отделенных органов при действии водных растворов NaCl

Жизнеспособность и процессы регенерации отделенных органов при культивировании в благоприятных условиях и на засоленной среде

Гомологичные структуры разных объектов и различные структуры одного и того же объекта заметно отличались по выживаемости и регенерационным процессам. Наибольшую активность по показателям каллусо- и корнеобразования, включая темпы и мощность их развития, проявили структуры фасоли, низкую – гледичии. По каждому объекту регенерационные процессы наиболее выражены у гипокотильных и стеблевых черенков. Листья уступали им как по выживаемости, так и по общей укореняемости и мощности развития корневой системы в изолированной культуре. Реализация процессов регенерации меняется в интенсивности и темпах по мере упрощения регенерируемой модели (Юсуфов, 1996, Wies, Rior, 1994). В наших опытах отрезки эпикотилей или гипокотилей без точек роста и листьев или соответственно семядолей характеризовались пониженной жизнеспособностью по сравнению с интактными черенками. У таких упрощенных структур особенно четко проявлялись различия между объектами. Так, только у фасоли наблюдалась высокая укореняемость отрезков эпикотилей и гипокотилей, более низкая – у подсолнечника, а у гледичии оба типа структур отмирали без корней.

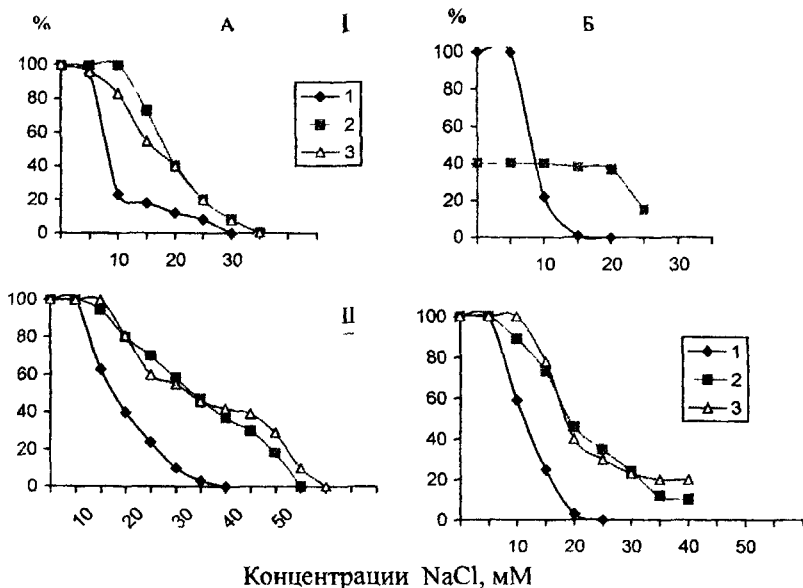
В условиях солевого стресса, препятствующих реализации потенций к регенерации, различия между структурами в выживаемости и регенерации усиливаются. Раствор 80 мМ NaCl оказался летальным для всех испытанных структур и объектов. Состояние же их в растворах 5 мМ обычно не отличалось от контроля. Поэтому в большинстве опытов изучалось действие растворов NaCl в диапазоне 10-40 мМ NaCl.

Высокую чувствительность к действию растворов NaCl проявили отделенные листья всех объектов. В растворах, превышающих 20 мМ, отмечено быстрое их отмирание (без корней, но с каллусом) у всех изученных объектов (рис.2). В растворах меньших концентраций этому предшествовало пожелтение, о чем свидетельствовали и данные по содержанию хлорофилла. Не замечена строгая корреляция между солеустойчивостью объекта и укореняемостью их отделенных листьев в условиях засоления. Так, в растворе 10 мМ NaCl у более солечувствительной фасоли укореняемость снижалась в 2-2.5 раза по сравнению с контролем, у баклажана – в 1.4 раза, у более устойчивого подсолнечника листья вообще не дали корни. В условиях засоления среды развитие корней у фасоли задерживалось на 2 дня по сравнению с контролем, у баклажана задержки не наблюдалось, иногда при засолении (10мМ) корни закладывались даже раньше.

Гипокотильные и стеблевые черенки одних и тех же растений проявили большую устойчивость к NaCl по сравнению с ИЛ. У них отмечен ризогенез в условиях засоления, уровень которого для листьев оказался сильно

токсичным. У стеблевых черенков фасоли укореняемость снижалась в растворе 10 и полностью подавлялась в 20 мМ, баклажана – 20 и 40, подсолнечника – 40 и 60 мМ соответственно (рис.3,4).

Рисунок 3
Выживаемость (А) и общая укореняемость (Б) листьев (I) и стеблевых черенков (II) фасоли (1), баклажана (2) и подсолнечника (3) в растворах NaCl



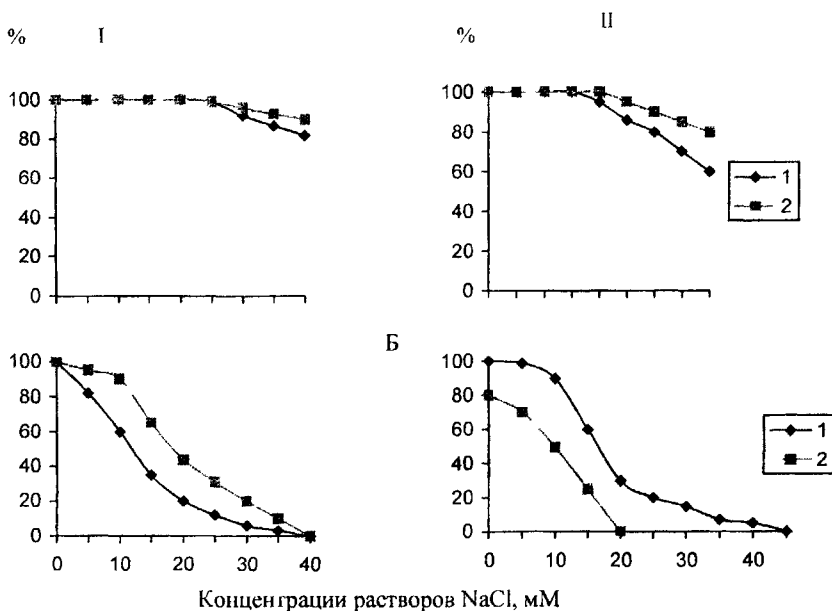
Различия проявились не только в пороговых и летальных концентрациях, но и в изменении темпов и мощности ризогенеза у разных объектов. В большей степени ризогенез в условиях засоления подавлялся у черенков фасоли, меньше – у баклажана, томата, в еще меньшей – у подсолнечника и свеклы.

Торможение процессов регенерации у гипокотильных черенков обычно происходило в области более высоких концентраций NaCl, чем у стеблевых тех же объектов (рис 3,4). Это особенно заметно у фасоли: эпикотильные черенки отмирали без корней в растворе 20 мМ NaCl на 15 день, в 40 мМ – уже на 5-6 день, тогда как ее гипокотильные черенки в этих вариантах укоренялись на 80 и 40 % соответственно. У гипокотильных черенков подсолнечника лишь в варианте 40 мМ задерживались сроки развития

корней и снижалась укореняемость (до 80%) Высокая укореняемость гипокотильных черенков баклажана, томата, гледичии наблюдалась в вариантах 10 и 20 мМ NaCl.

Рисунок 4

Выживаемость (I) и укореняемость (II) гипокотильных черенков фасоли (1) и подсолнечника (2) с семядолями (А) и без семядолей (Б) в условиях засоления (12 день культивирования)



Таким образом, по укореняемости гипокотильных черенков в условиях сильного засоления солеустойчивая фасоль не уступала другим объектам. Однако у фасоли корни в варианте 40 мМ NaCl появлялись позже, чем у подсолнечника, хотя в контроле преимущество было у фасоли.

Наиболее высокую выживаемость и регенерационную активность в условиях засоления имели отрезки гипокотилей фасоли – их укоренение наблюдалось изредка даже в растворах 20-40 мМ, у подсолнечника ризогенез в этих условиях сильно угнетался, а у гледичии и баклажана такие структуры отмирали без корней (рис.4). Удаление листьев и точек роста у эпикотильных черенков в значительно большей степени подавляло регенерационные процессы, чем удаление семядолей и точек роста у гипокотильных. При этом укореняемость таких структур в условиях засоления наблюдалась только у фасоли, и – очень слабая – у подсолнечника.

Действие засоления на черенки проявлялось и в изменении соотношения биомассы побегов и корней – коэффициента полярности, он увеличивается тем сильнее, чем больше нарушается соотношение между ростом побегов и корней У гипокотильных черенков фасоли с семядолями в условиях засоления этот показатель возрастал сильнее, чем у подсолнечника и гледичии) (табл. 1).

Таблица 1

Сырая биомасса корней и отрезков гипокотилей с семядолями фасоли, подсолнечника и гледичии при культивировании в условиях засоления среды

Варианты		Сырая биомасса, мг		Побег/корни
		Побег	Корни	
Фасоль	Контроль	334±25	9±1	37.1
	NaCl, mM 10	336±20	5±2	67.2
	20	274±15	2±1	137.0
Подсолнечник	Контроль	608±39	26±5	23.1
	NaCl, mM 10	596±40	19±1	31.5
	20	610±40	24±5	25.9
	40	448±31	13±5	34.4
Гледичия	Контроль	373±30	17±1	21.9
	NaCl, mM 10	361±29	14±2	25.8
	20	298±37	9±3	33.1

Примечание. Для фасоли и подсолнечника приведены данные на 15, для гледичии – на 25 день культивирования

В опытах с культивированием отделенных структур на питательной среде МС, дополненной NaCl, порог токсичности соли оказался сдвинутым в область более высоких концентраций соли.

Эффект солевого стресса проявлялся и при кратковременном (24 ч) действии растворов NaCl с последующим культивированием в воде. Токсичными для отделенных листьев и эпикотильных черенков фасоли в этих опытах были концентрации 20 mM и выше, а ризогенез подавлялся у первых – при обработке раствором 50, а у вторых – 80 mM NaCl.

Действие солевого стресса на отделенные органы при культивировании их на питательной среде *in vitro*

В условиях засоления (0.5% NaCl, 85 mM) подавлялось развитие почек и корней у всех эксплантов. При 1% NaCl (170 mM) у большинства эксплантов всех объектов заметно снижалась активность каллусообразования и частота корнеобразования. В целом большая чувствительность характерна эксплантам фасоли, меньшая – подсолнечника (табл.2). Мини-

мальную выживаемость у фасоли при засолении имели ЭС: она снижалась до 10 % на 30-й день культивирования уже при 0.5% NaCl. У ЭЛ и ЭГ ее

Таблица 2
Реакция эксплантов фасоли (А), подсолнечника (Б) и баклажана (В) на внесение NaCl в питательную среду

Варианты	Выживаемость на 28 день, %			Каллусообразование, %			
	А	Б	В	А	Б	В	
ЭГ 1	100±10	85±10	60±11	95±10	85±9	63±11	
	2	100±10	80±10	55±8	85±10	80±10	55±10
	3	50±9	50±8	20±9	71±10	50±8	0
ЭС 1	40±10	100±0	95±5	66±9	100±5	75±10	
	2	10±6	100±5	80±5	13±1	90±10	70±10
	3	13±7	75±10	41±11	23±5	70±10	50±10
ЭЛ 1	70±9	60±9	100	75±10	25±5	90±8	
	2	70±9	50±9	100	18±7	20±5	86±10
	3	27±9	40±8	100	30±5	0	86±5

Примечания. Обозначения вариантов 1 – МС+ИМК (0.5 мг/л) +БАП (2.5 мг/л), 2 – МС+ИМК+БАП+NaCl (0.5%), 3 – МС+ИМК+БАП+NaCl (1%)

снижение наблюдалось только при 1% NaCl. Наименее чувствительными оказались ЭГ, процент эксплантов при 1% засолении у них снижался незначительно, а у семядолей и листьев – в 2-3 раза. Высокую чувствительность к засолению проявили ЭЛ всех объектов: солевой стресс сильнее подавлял у них прирост биомассы экспланта и каллуса, чем у других эксплантов. Выживаемость, прирост и каллусообразование ЭЛ при 1% NaCl составили для фасоли 39, 76 и 53% по сравнению с контролем, а для баклажана все эти показатели оставались на уровне контроля. У подсолнечника наименее чувствительными к засолению были ЭС, а также ЭГ, у фасоли – ЭГ. Это соответствует реакции целых органов в нестерильной культуре. У баклажана же засоление 1% NaCl приводило к высокой летальности ЭГ.

Таким образом, органоспецифичность солеустойчивости и видовые особенности в определенной мере сохранялись и в культуре *in vitro*.

Состояние гомеостаза отделенных органов в условиях солевого стресса

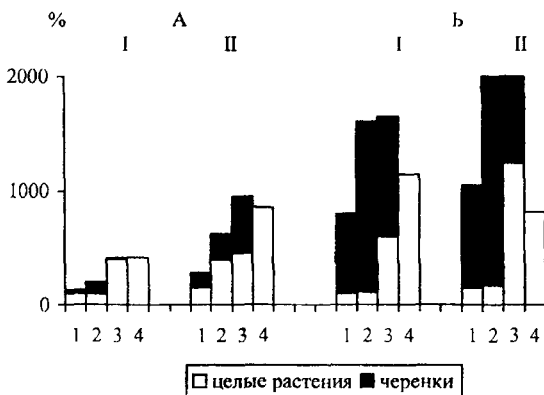
Как показатель эффективности ионного гомеостаза мы измеряли содержание Na^+ в разных органах: корнях, стеблях, черешках и пластинках листа у целых растений, облиственных стеблевых черенков, изолированных листьев (с сохранением и удалением черешков) фасоли, а также в отрезках гипокотилей фасоли и подсолнечника и листьях фасоли и баклажана.

Накопление ионов натрия возрастало с увеличением продолжительности культивирования органов в растворах NaCl и сопровождалось снижением содержания K^+ и Ca^{2+} . При этом оно неодинаково менялось и в разных структурах. Первоначально (1 и 3 сутки культивирования) интенсивная аккумуляция натрия наблюдалась в корнях и стеблях целых растений, стеблях и черешках у стеблевых черенков, черешках у отделенных листьев (рис. 5,6).

В пластинках листа у эпикотильных черенков, культивируемых в растворах 10 и 20 мМ NaCl в течение 1 суток, содержание натрия составило 143 и 321% к контролю, тогда как в тканях черешков – 200 и 300%, стеблях – 400 и 2000%. С возрастанием длительности культивирования в растворах соли (до 3 и более суток) барьерная функция стеблей и черешков ослабевала, что приводило к повышению содержания натрия в пластинках.

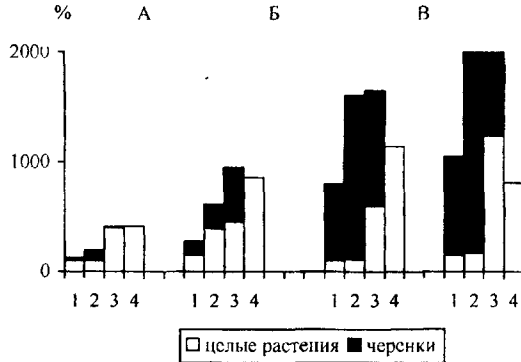
Рисунок 5

Изменение содержания Na^+ в тканях пластинок (1), черешков (2), стеблей (3) и корней (4) у растений и стеблевых черенков фасоли в условиях засоления 10 и 20 мМ (I и II)



Здесь и на рис 6 за 100% принято содержание ионов в соответствующих структурах в контроле. Сроки культивирования I и 5 суток (A и Б)

Изменение содержания Na^+ в листовых пластинках (1) и черешках (2) отделенных листьев фасоли при культивировании в растворах NaCl 10, 20 и 40 мМ (I - III)



Продолжительность культивирования 1, 3, 5 суток (А - В).

У отделенных листьев в черешках содержание Na^+ увеличивалось в 3-4 раза уже при слабом засолении (5 мМ NaCl), не меняясь в пластинках. Барьерная функция черешков проявлялась и в условиях более сильного засоления 10-20 мМ NaCl в течение 1-3 суток. Уже в растворе 40 мМ через сутки, а 10-20 мМ - через 5 суток происходило возрастание содержания натрия в пластинке. В варианте с предварительным удалением черешков у отделенных листьев замечено быстрое накопление натрия в пластинках уже в растворе 5 мМ NaCl .

Таким образом, корни и стебли у целых растений, стебли и черешки у стеблевых черенков, черешки у отделенных листьев в условиях засоления выполняют защитную функцию по отношению к пластинке листа. Наименьшее накопление Na^+ в пластинке при одинаковых условиях засоления происходило у целых растений, максимальное - в отделенных листьях с удаленными черешками. При продолжительных воздействиях засоления из-за потери барьерных функций структур происходит перераспределение натрия и выравнивание его содержания в системе в целом.

В целом жизнеспособность отделенных листьев в условиях засоления определялась в большей мере накоплением натрия в пластинках, чем в черешках.

Переводом в водную культуру удавалось повысить жизнеспособность лишь изолированных листьев, ранее культивированных в растворе 10 мМ соли (3 суток). Уровень ионов натрия, достигаемый за это время в 20 мМ, уже необратимо подавлял жизнеспособность листьев, они редко формиро-

вали даже слабые корни и имели низкую выживаемость. Значительное накопление ионов Na^+ в отрезках гипокотилей фасоли (превышающее контроль более, чем в 4 раза уже через 1 сутки в варианте 10 мМ) не сопровождалось таким значительными ухудшением их выживаемости и укореняемости, какие наблюдались у отделенных листьев (табл. 3).

Аккумуляция натрия в отрезках гипокотилей подсолнечника происходила менее интенсивно, чем у фасоли (табл. 3). Несмотря на это, у них сильнее подавлялись выживаемость и регенерационные процессы.

Итак, уровень содержания ионов натрия для каждой структуры имеет свою критическую и предельную зоны чувствительности к накоплению ионов натрия. Она до определенного предела регулируется взаимодействием структур в пределах изолированной системы.

Таблица 3

Содержание Na^+ (в мг/г сухой ткани) в отрезках гипокотилей фасоли и подсолнечника через 1, 3 и 5 суток (а-в) культивирования в растворах NaCl

Варианты	Фасоль			Подсолнечник	
	а	б	в	б	
Контроль, H_2O	1.6	1.6	1.6	10.9	
NaCl , мМ					
10	6.4	7.8	15.0	14.9	
20	7.4	13.4	19.0	16.2	
40	12.1	28.1	37.7	24.2	

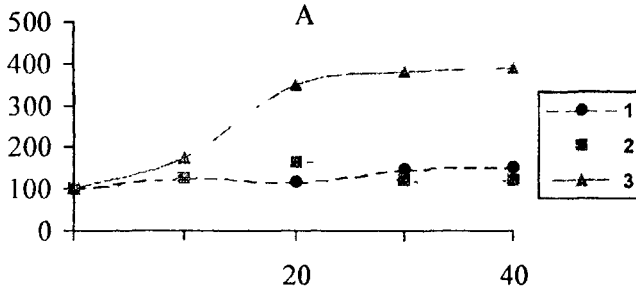
Другим механизмом поддержания гомеостаза растения в условиях солевого стресса является увеличение уровня содержания пролина – вещества, накапливающегося при стрессе и играющего защитную роль (Greenway, Munns, 1980; Шевякова, 1983; Кузнецов, Шевякова, 1999) или рассматриваемого маркером стрессовых ситуаций (Мело, 2000).

Увеличение уровня содержания пролина наблюдалось в пластинках отделенных листьев и стеблевых черенках фасоли, особенно при концентрации NaCl 20мМ и выше. Интенсивная аккумуляция пролина в растворах 40 и 80 мМ сопровождалась быстрым отмиранием структур (рис. 7, табл. 4).

Обнаружены различия в содержании пролина в условиях засоления между тканями листовой пластинки и стебля у черенков, пластинки и черешка у отделенных листьев. У отделенных листьев часто возрастает содержание пролина по сравнению с интактными листьями стеблевых черенков. У отрезков эпикотилей варианты засоления лишь незначительно отличались по содержанию пролина от контроля. В отрезках гипокотилей (как с семядолями, так и без них) его уровень вообще не увеличивался, что косвенно может говорить о регуляции солеустойчивости у них другими механизмами (табл. 5). Семядоли интенсивно накапливали пролин в ответ на изоляцию независимо от действия солевого стресса (результат обще-

Рисунок 7

Содержание пролина (в % к контролю) в сухой биомассе пластинок отделенных листьев при культивировании в растворах NaCl в течение 24, 72 и 120 часов (1-3)



Засоление создавали введением NaCl в среду МС, контроль - МС без NaCl.

Таблица 4

Влияние сроков культивирования отделенных листьев фасоли в растворах NaCl на содержание пролина (мкМ/г сырой ткани)

Варианты	Сроки культивирования, сутки		
	1	2	6
Контроль (H ₂ O)	1 50±0 15	1 71±0.10	1 72±0 10
Растворы NaCl, мМ			
17	1 50±0 15	1 71±0 10	2 15±0 30
34	1 15±0.08	2 49±0 57	9 28±1.98
40	1 25±0 29	2 48±0 52	отмирание
80	1 53±0 33	3 68±0 35	отмирание

Таблица 5

Уровень содержания пролина (мкМ/г ткани) в тканях отрезков гипокотилей фасоли с удаленными (А) и сохраненными (В) семядолями (Б) при культивировании в растворах NaCl

Варианты	Сырая биомасса			Сухая биомасса		
	А	Б	В	А	Б	В
H ₂ O	0 6±0.1	3.8±1 0	0 6±0.1	12 7±1 0	38 2±8.4	14 4±0.1
NaCl, мМ						
10	0.7±0.2	3.0±0 5	0.6±0.1	11.3±3 2	22 9±6.1	13 7±2 6
20	0.5±0.1	3.5±0.5	0.6±0.2	9.9±0.8	33 0±2.5	15.2±4.5
40	0.6±0.1	3.1±1.0	0.7±0 1	9.5±0 3	31.2±11.2	10.7±4.4

го усиления гидролитических процессов). У семядолей, оставленных на гипокотильных черенках, уровень содержания пролина был намного ниже, чем у отделенных семядолей, хотя и здесь варианты контроля и опыта достоверно не отличались (табл.5).

В гипокотильных и стеблевых черенках гледичии уровень содержания пролина возрастал в варианте 40 мМ NaCl. при этом только в листовых пластинках и семядолях.

В варианте 10 мМ NaCl, где заметно подавлялся ризогенез у листьев фасоли и почти не угнетался у баклажана, содержание пролина также было различным; у фасоли на 4 сутки оно достоверно не отличался от контроля, а у баклажана – возрастал в 2,3 раза.

Результаты опытов показали, что между содержанием ионов Na^+ и уровнем пролина не всегда наблюдается прямая связь. Так, содержание пролина в отделенных листьях заметно возрастало при культивировании их в концентрациях NaCl, превышающих 20 мМ, а содержание Na^+ значительно увеличивалось уже в 5-10 мМ растворах. У отрезков же гипокотилей такой связи вообще не наблюдалось: при значительном повышении содержания натрия в их тканях уровень пролина не превосходил контрольный показатель.

Для понижения чувствительности структуры к засолению имело значение изначальное (до действия стресса) повышение содержания пролина в тканях отделенных листьев, которого мы достигали обработкой их раствором полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000).

Качественная характеристика действия солевого стресса на отделенные органы растений

Пороговые концентрации чувствительности обычно не совпадают как для разных процессов, так и структур (табл.6). Это тем более справедливо для разных объектов. По мере упрощения модели – целое растение > отделенная структура (разные по степени сложности) чувствительность к засолению, как правило, возрастает. При этом имеет значение и происхождение структуры: фрагмент эпикотилия, или гипокотилия, или листовой пластинки (с черешком или без него), их экспланты *in vitro* ведут себя по-разному. При одинаковой выживаемости, структуры могут отличаться по активности каллусо- или корнеообразования в условиях засоления.

По выживаемости и ПЖ изолированные структуры фасоли составили следующий убывающий ряд: гипокотильные черенки > стеблевые черенки > отрезки гипокотилия, тогда как по укореняемости: гипокотильные черенки \geq отрезки гипокотилия > стеблевые черенки > отделенные листья > отделенные листья без черешков > отрезки эпикотилия. В отсутствие засоления эти ряды выглядят несколько иначе. По выживаемости и продолжительности жизни – гипокотильные черенки \geq стеблевые черенки > отделенные листья > отделенные листья без черешков > отрезки гипокотилия > отрезки

Таблица 6

Пороговые дозы чувствительности к растворам NaCl (мМ) у разных объектов и структур

Объекты и структуры	Легальная концентрация	Ризогенез		
		слабое ингибирование	Полное подавление	
Фасоль	1	≥40	≥20	>40
	2	>20	20	40
	3	≥20	10	≥20
	4	10	5	10
	5	>20	10	15
Подсолнечник	1	>60	≥40	≥40
	2	40	10	>20
	3	>50	≥40	≥50
	4	≥20	≥10	20
	5	≥10	<10	10
Баклажан	1	40	20	>20
	3	>40	20	≥40
	5	>20	>10	20
Гледичия	1	>50	≥10	≥20
	2	>40	≥5	>10
Свекла	1	>50	>40	50
	5	40	20	>20
Томат	1	>40	20	40
	3	40	20	40

Примечание. Обозначение структур: 1-облиственные черенки с апексами, 2-отрезки эпикотилей без точек роста и листьев, 3-отрезки гипокотилей с семядолями и апексом, 4-отрезки гипокотилей без семядолей и апекса, 5-отделенные листья.

эпикотилия. По укореняемости: гипокотильные черенки ≥ стеблевые черенки. У других объектов эти последовательности могут нарушаться.

В целом связь между солеустойчивостью объекта и жизнеспособностью его изолированных структур в условиях солевого стресса сильнее выражена у стеблевых черенков, наиболее приближающихся по уровню организации к целому растению. У упрощенных структур (отделенных листьев, отрезков эпикотилей или гипокотилей) такая связь не всегда наблюдается. Однако и для стеблевых черенков, как и для других изученных отделенных структур, говоря об их жизнеспособности в условиях солевого стресса, следует различать выживаемость и процесс ризогенеза. Процессы ризогенеза более чувствительны к солевому стрессу (табл.6).

Заключение

Дифференциация организма в онтогенезе – результат реализации генетической программы, приводит к возникновению определенных морфофизиологических различий между структурами и системного контроля, определяющего устойчивость растений к стрессам. В результате этого у структур меняется реакция на действие стрессовых факторов, они проявляют различную жизнеспособность. В работе этот вопрос получил подтверждение при изучении жизнеспособности изолированных структур одного и того же и разных видов растений, а также барьерных функций отдельных структур.

Проведенные исследования свидетельствуют о различиях чувствительности отделенных органов и структур растений к солевому стрессу. С упрощением модели процессы регенерации реализуются с меньшей интенсивностью и возрастает чувствительность к засолению. В адаптации целого растения участвуют различные механизмы (Захарин, 1990; Кузнецов, 1990; Удовенко, 1990). При этом реакция разных структур не всегда соответствует устойчивости целого растения, что было отмечено ранее и на ряде других объектов при изучении реакции изолированных клеток, тканей и органов (Строгонов и др., 1989; Керимов и др., 1993). Наиболее соответствуют друг другу реакции целого растения и стеблевых черенков. Между реакцией других, особенно упрощенных, структур и целых растений не всегда имеется прямая связь, что говорит о роли организменного уровня в регуляции солеустойчивости. У таких структур большее значение имеет их потенциальная регенерационная активность. При высокой солечувствительности фасоли, отрезки ее эпикотилей и гипокотилей, более активные в ризогенезе в нормальных условиях (по сравнению с другими объектами), имели преимущество и в условиях засоления. У эксплантов, обладающих плохой выживаемостью и невысокой активностью к регенерации, реакция при этом еще больше отклоняется независимо от солеустойчивости культуры.

Процессы корнеобразования лучше характеризуют солеустойчивость объектов, чем каллусообразование и выживаемость отделенных органов в условиях засоления. Наиболее четко характеризует функциональное состояние отделенных органов в условиях солевого стресса их ризогенез. Это говорит о возможности использования его в качестве теста для оценки солеустойчивости объекта. Органоспецифичность солеустойчивости и видовые особенности в определенной степени сохраняются и в культуре *in vitro*. Это представляет интерес с точки зрения разработки методики тестирования солеустойчивости *in vitro*.

Уровень содержания ионов Na^+ в тканях имеет существенное значение для жизнеспособности изолированных структур в условиях засоления. С повышением содержания натрия в среде повышается его содержание в тканях отделенных органов, что сопровождается снижением содержания

калия и кальция. Но это не всегда и не у всех структур сопровождается накоплением пролина. Между накоплением Na^+ и пролина в тканях, а также выживаемостью изолированных структур связь не всегда наблюдается. Для каждой структуры имеется своя критическая зона чувствительности к накоплению ионов натрия. Она до определенного предела регулируется взаимодействием структур в пределах изолированной системы. В перспективе заслуживает конкретизации роль взаимодействия метамерных структур в защитных реакциях устойчивости к засолению.

Выводы

1. Разные органы и структуры в условиях солевого стресса различаются между собой по реализации процессов регенерации. С упрощением изолированной модели процессы регенерации реализуются с меньшей активностью и возрастает чувствительность к солевому стрессу.

2. Пороговая чувствительность к солевому стрессу для разных структур меняется при оценке по разным показателям. Наиболее четким показателем, характеризующим функциональное состояние отделенных органов в условиях солевого стресса, оказался ризогенез. Ризогенез стеблевых черенков может служить тестом в оценке солеустойчивости растений.

3. Отрицательный эффект солевого стресса проявляется в блокировке процессов каллусо- и ризогенеза, в развитии некротических пятен, отмирании точек роста, повреждении корней и возрастании величины коэффициента полярности, увеличении содержания ионов Na^+ и уменьшении – K^+ и Ca^{2+} в тканях отделенных органов. Такие изменения сильнее выражены при культивировании в водных растворах NaCl , чем на питательной среде Мурасиге-Скуга. Повышение содержания Na^+ не у всех структур сопровождается повышением содержания пролина.

4. При непродолжительном культивировании в условиях засоления черешки и стебли у изолированных структур служат барьерами, препятствующими проникновению натрия в функционально активные клетки мезофилла. При увеличении длительности воздействия соли эти структуры теряют барьерную функцию.

5. Различия в солечувствительности отделенных органов и структур разного происхождения сохраняются и в культуре *in vitro*. Она в значительной мере определяется солеустойчивостью объекта и активностью процессов регенерации. Высокую чувствительность к NaCl проявляют листовые пластинки, однако у отдельных объектов даже они сохраняют активность к регенерации в условиях засоления.

6. По показателям выживаемости, продолжительности жизни, укореняемости, приросту биомассы, повреждениям стеблевых черенков можно составить следующий возрастающий ряд чувствительности к объектам к засолению: свекла – подсолнечник – томат – баклажан – гледичия – фасоль. Этот ряд несколько нарушается при оценке по другим структурам и

процессам. Наиболее соответствуют друг другу реакция на засоление целых растений и стеблевых черенков.

7. Индивидуальность структур определяется как солеустойчивостью самих структур и объектов, так и активностью их к регенерации. При высокой чувствительности к засолению у фасоли ее отделенные структуры, особенно упрощенные, проявляют высокую активность к регенерации, что способствует ее проявлению даже в условиях засоления.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Алиева З.М., Гамзатова З.Г., Юсуфов А.Г. Реакция на засоление среды изолированных структур растений // Вестник Дагестанского государственного университета. Естест. науки. – Махачкала, 1996 – Вып. 1. – С 167-170.

2. Алиева З.М. Устойчивость изолированных тканей томатов и фасоли к ксенобиотикам // Тр. молодых ученых. – Махачкала, 1996. – Вып. 1 – С 85-88.

3. Алиева З.М. Агрэкологическое значение метода изолированных органов растений // «Проблемы сельскохозяйственной экологии»: Тез. докл. межвуз. науч. конф. – Махачкала, 1996. – С. 35-36

4. Хабибова А.Ш., Алиева З.М. Культура тканей разных структур баклажана // Тез. докл. межвуз. студенческой науч. конф., посвященной 65-летию ДГУ. – Махачкала, 1997. – С. 136-137.

5. Юсуфов А.Г., Алиева З.М. Возрастная специфика морфогенеза у структур баклажан *in vitro* // «Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда»: Тез. докл. VII Межд. конф. – М., 1997 – С 189-190.

6. Алиева З.М. Чувствительность изолированных структур баклажана и фасоли к засолению // Проблемы биологии и прикладной экологии. Сб. тр. молодых ученых. Саратов, 1997. – Вып. 1. – С.44-46.

7. Алиева З. М. Дифференциация онтогенеза и чувствительность разных структур растений к солевому стрессу // «Изучение онтогенеза растений природных и культурных флор в ботанических учреждениях и дендропарках Евразии»: Материалы II Межд. конф. Белая Церковь, 1998. – С 13-16.

8. Гаджиева И.Х., Юсуфов А.Г., Абдурахманов А.А., Алиева З.М. Общее и специфическое в реакции изолированных структур растений на солевой стресс // Проблемы ботаники на рубеже 20-21 вв: Тез. докл. 2 (10) съезд рус. ботан. общ-ва. С-Пб., 1998. Т.1. –С.110.

9. Алиева З.М. О роли накопления свободного пролина в солеустойчивости изолированных структур фасоли // Тез. докл. IV съезда общества физиологов растений России. М., 1999. - Том. I. – С. 313.

10. Алиева З.М., Четвертиновская О.И. О роли взаимодействия структур в поддержании гомеостаза изолированных листьев при солевом стрессе

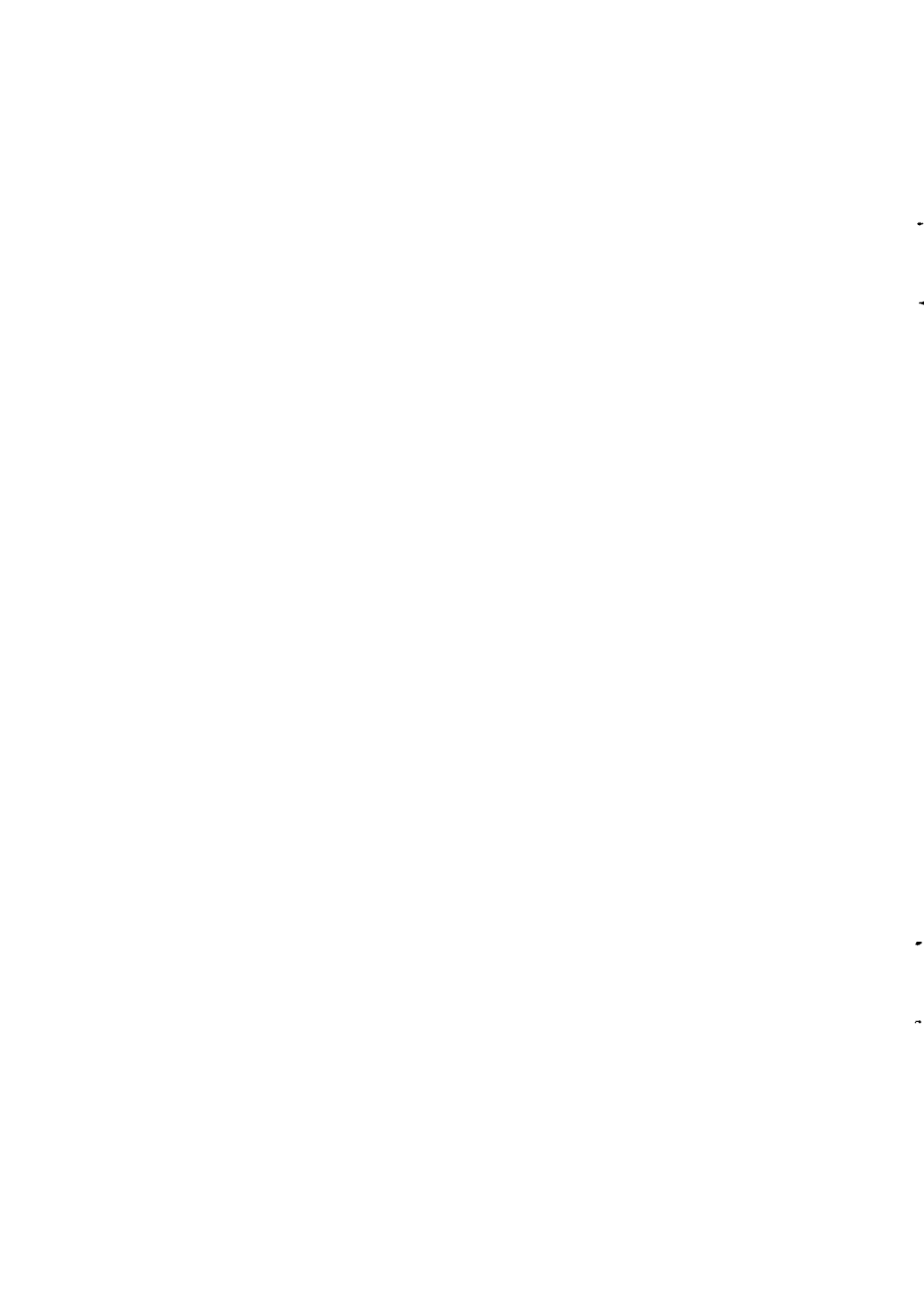
се // Тез докл науч. конф Дагестанского гос.ун-та Махачкала, 2000. С 19-20.

11 Алиева З.М Факторный анализ процессов регенерации // Достижения и современные проблемы развития науки в Дагестане: Тез. док. Межд науч конф, посвященной 275-летию РАН и 50-летию ДНЦ РАН 21 мая 1999 г Естесг науки Махачкала, 1999. С. 257-258

12 Алиева З.М., Магомедова М.А., Юсуфов А.Г. Влияние мозаичности дифференциации индивидуума растений на жизнеспособность структур в изолированной культуре // Вестник Дагестанского научного центра РАН.- Махачкала, 2000. – №8 – С.74-79.

13 Алиева З.М Действие засоления среды на изолированные листья фасоли и вопрос о защитной роли пролина // Известия ВУЗов Северо-Кавказский регион Естесг науки. - 2000, №4. – С.74-76

14 Алиева З.М., Юсуфов А.Г Влияние накопления ионов натрия на жизнеспособность изолированных структур фасоли // Сельскохозяйственная биология . – 2001 – №5 (в печати).



Формат 60x84 1/16 Печать ризографная Бум № 1
Уч п.л. – 1 изд п.л – 1 Заказ № 142-01 Тираж – 100 экз
Отпечатано в типографии ООО «Полиграф-сервис»
Махачкала, ул Коркмасова,35*

РНБ Русский фонд

2003-4

19210

31 12 01