

На правах рукописи

ШАРИПОВА Гузьяль Вакильевна

**ОСОБЕННОСТИ РОСТА И ВОДНОГО ОБМЕНА РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ И
ЯЧМЕНЯ С РАЗЛИЧНОЙ СОЛЕУСТОЙЧИВОСТЬЮ ПРИ
НАТРИЙ-ХЛОРИДНОМ ЗАСОЛЕНИИ**

03.00.16.-Экология

03.00.12 - Физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Уфа –2007

Работа выполнена в лаборатории физиологии растений Института биологии Уфимского научного центра Российской Академии наук

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Веселов Дмитрий Станиславович

Научный консультант: кандидат биологических наук, доцент
Высоцкая Лидия Борисовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Зялалов Абдуллазян Абдулкадырович
доктор биологических наук, профессор
Усманов Искандер Юсуфович

Ведущее учреждение: Санкт-Петербургский государственный университет

Защита состоится 13 ноября 2007 г. в 14.00 часов на заседании Регионального диссертационного совета КМ 002.136.01 при Институте биологии Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, г. Уфа, пр. Октября, 69, тел./факс 8 (347) 235-62-47, e-mail: ib@anrb.ru

Автореферат разосланоктября 2007 г.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Уфимского научного центра РАН.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
к.б.н., доцент



Р.В. Уразгильдин

Актуальность. Засоление – один из наиболее важных абиотических факторов внешней среды, приспособление к которому определяет способность растений выживать в этих условиях и давать урожай. Возделываемые виды и сорта растений различаются по чувствительности к засолению (Строгонов, 1962; Flowers, 2004). На начальных этапах онтогенеза устойчивость растений к засолению четко определяется по активности ростовой функции. С точки зрения агрономии наиболее важным критерием солеустойчивости является урожайность растений на засоленных почвах. Однако отбор солеустойчивых форм в полевых условиях осложняет неравномерность распределения засоленных участков (Munns, 2005). Поэтому не прекращается поиск способов оценки устойчивости растений к засолению в контролируемых лабораторных условиях. Для того чтобы повысить эффективность отбора, необходимо хорошо понимать, как формируется солеустойчивость. В действии засоления на растения выделяют два фактора: токсический компонент, связанный с накоплением ионов (прежде всего, ионов натрия) в цитоплазме и дефицит воды (осмотический компонент), обусловленный присутствием избытка ионов в почве (Neumann, 1993). Основное внимание исследователей привлекает изучение механизмов, обеспечивающих ионный гомеостаз при засолении (Yeо, 1998). При этом осмотический компонент воспринимается скорее как фактор, маскирующий проявление токсического компонента (Munns et al., 2002). Вместе с тем, осмотический и токсический компоненты в какой-то мере взаимосвязаны: токсичные ионы поступают в растение с транспирационным потоком, а их накопление нарушает водный обмен (например, функционирование устьичного аппарата (Robinson et al., 1997)). Однако в литературе можно найти не так много сведений об особенностях регуляции водного обмена у растений, различающихся по солеустойчивости, и эти сведения разрознены и противоречивы (Костюк и др., 1994; Леонова и др., 2005). Так, можно встретить утверждения, что устьичная проводимость выше у солеустойчивых растений (Volkov et al., 2004), а также противоположные сведения о том, что она выше у чувствительных к засолению растений (Rivell et al., 2002). Все сказанное свидетельствует о недостаточном внимании к проблеме регуляции водного обмена растений на фоне засоления, что определило актуальность нашей работы.

Цель работы состояла в выявлении особенностей регуляции роста и водного обмена при натрий-хлоридном засолении у растений, различающихся по солеустойчивости. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Провести сравнительное изучение водного обмена относительно солеустойчивых растений ячменя *Hordeum vulgare* (сорт Golf) и более чувствительных к засолению растений твердой пшеницы *Triticum durum* (сорт Безенчукская 139) и выявить особенности их устьичной и ростовой реакции при кратковременном и длительном действии засоления.

2. Оценить значение аквапорина семейства HvPIP2;4 в регуляции водного обмена при засолении путем сопоставления уровня экспрессии гена, гидравлической и устьичной проводимости у линий растений *Hordeum spontaneum*, различающихся по солеустойчивости.

3. С помощью изучения контрастных по засухоустойчивости растений ячменя выявить значимость регуляции устьичной проводимости и транспирации в ограничении потока ионов и предотвращении их токсичного действия, а также поддержании газообмена, фотосинтеза и роста в условиях засоления.

4. Провести сравнительное изучение уровня накопления абсцизовой кислоты (АБК) и скорости закрытия устьиц у растений, различающихся по засухоустойчивости, при кратковременном действии хлорида натрия, с целью подтверждения (или опровержения) гипотезы о том, что АБК контролирует интенсивность транспирационного потока на начальном этапе действия засоления.

5. Провести сравнительный анализ особенностей водного обмена и роста на засолении растений пяти сортов ячменя из коллекции ВИР с целью проверки воспроизводимости закономерностей, обнаруженных при изучении растений контрастных по солеустойчивости и засухоустойчивости.

Научная новизна. Впервые проведено сравнение экспрессии гена аквапорина Hv PIP2;4 растений разных линий *Hordeum spontaneum* (дикий вид ячменя) и показана связь уровня экспрессии с изменением гидравлической и устьичной проводимости, а также более выраженное снижение экспрессии гена, гидравлической проводимости и транспирации у солеустойчивой линии. Сравнительное изучение устьичной реакции на засоление у относительно солеустойчивых и чувствительных к засолению видов, сортов и линий растений показало, что способность растений быстро закрывать устьица при кратковременном действии засоления необходима для формирования солеустойчивости растений. Уровень накопления АБК в листьях был выше у тех растений ячменя, у которых сильнее снижалась устьичная проводимость, что подтвердило роль этого гормона в регуляции транспирационного потока при засолении. Обнаружена связь между уровнем накопления ионов хлора и способностью растений быстро снижать транспирационный поток при засолении. Показано, что харак-

тер связи между уровнем транспирации и солеустойчивостью меняется при длительном действии засоления: в этом случае, в отличие от кратковременного действия засоления, более высокий уровень транспирации обнаружен у солеустойчивых сортов ячменя, что коррелирует с их способностью быстрее накапливать биомассу.

Практическая значимость работы. Обнаружены особенности водного обмена у солеустойчивых форм, которые проявляются в быстром снижении уровня экспрессии генов аквапоринов, снижении гидравлической проводимости и транспирации, что ограничивает приток токсичных ионов и их негативное действие на растения. Показано, что при длительном действии засоления признаком более высокой солеустойчивости растений является относительно высокий уровень их устьичной проводимости. Эти показатели могут быть использованы в системе оценки селекционного материала в процессе отбора солеустойчивых форм.

Апробация работы. Основные положения работы были представлены на международном симпозиуме «Сигнальные системы клеток растений: Роль в адаптации и иммунитете» (Казань, 2006), VI съезде общества физиологов растений России (Сыктывкар, 2007).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 работ, в том числе 1 статья в журнале, рекомендованном ВАК России.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего _____наименования, в том числе _____на иностранных языках. Работа изложена на _____страницах машинописного текста, содержит 22 рисунка и 6 таблиц.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили в лабораторных условиях на растениях ячменя (*Hordeum vulgare*, сортов Golf, Прерия, Михайловский, Ранний, Красноярский 1, Красноярский 80, Porvenir и Riso-1058; *Hordeum spontaneum*, линий T1 и 20-45), и яровой твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf., сорт Безенчукская 139) в водной культуре. Семена ячменя и пшеницы проращивали в темноте в течение 2 - 3 суток на дистиллированной воде с добавлением 10^{-5} М CaCl_2 , при температуре 24°C. Семисуточные проростки пересаживали на 10 % среду Хогланда-Арнона-I и выращивали при освещенности 18 клк и 14-часовой продолжительности светового дня. Для длительных экспериментов растения пересаживали на 100 % питательную среду Хогланда-Арнона-I и выращивали в контейнерах из

оргстекла. Для предотвращения оксидативного стресса питательную среду непрерывно аэрировали воздухом с помощью микрокомпрессоров. Контейнеры оборачивали светонепроницаемой бумагой во избежание подавления роста корневой системы. **Засоление** вызывали добавлением в питательный раствор хлорида натрия до конечной концентрации 100 mM (опыт). Эта концентрация NaCl наиболее часто используется в физиологических экспериментах по изучению действия засоления (Fricke, 1997; Munns, 1993; Neumann, 1997). Водный дефицит создавали, добавляя непроникающее из питательного раствора в корни растений нейтральное осмотически активное вещество полиэтиленгликоль 6000 (ПЭГ) до конечной концентрации 13 %. Оба вещества создавали в питательной среде осмотическое давление равное 0,5 МПа.

Транспирацию определяли весовым методом. **Осмотический потенциал** определяли с помощью осмометра CAMLAB (Великобритания) по температуре замерзания. **Концентрацию хлорид-ионов** определяли с помощью метода капиллярного электрофореза на ионном анализаторе «Нанофор 01». **Относительное содержание воды (ОСВ)** определяли в дифференцированной части листа растений. Измерение проводили согласно описанной методике (Pardossi et al., 1992). ОСВ рассчитывали по формуле: $ОСВ(\%) = 100(\text{сырой вес} - \text{сухой вес}) / (\text{тургорный вес} - \text{сухой вес})$. Содержание воды рассчитывали по формуле: $СВ(\%) = 100(\text{сырой вес} - \text{сухой вес}) / \text{сырой вес}$. **Экспрессию** гена HvPIP2;1 оценивали с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени. **Гидравлическую проводимость** растений рассчитывали по аналогии с законом Ома (Carvajal et al., 1996). Движущей силой потока воды была разность осмотических потенциалов между питательной средой и ксилемным экссудатом. **Устьичную проводимость** растений определяли с помощью автоматического порометра Mk3 (Англия). Измерения **длины и ширины листьев** проводились с помощью металлической линейки с шагом 0,05 см. **Площадь листьев** находили с помощью их сканирования и анализа полученного изображения. **Содержание хлорофиллов *a* и *b*** определяли в аликвоте 96% этилового спирта, полученной из навески побегов. Оптическую плотность раствора измеряли при длинах волн 663 и 644 нм на спектрофотометре СФ-56 (ЛОМО, Russia). Расчет вели по формулам Реббелена (Методы биохимического анализа, 1978). Для **определения содержания гормонов** растительный материал гомогенизировали и экстрагировали 80 % этанолом. Экстракцию АБК из аликвоты водного остатка проводили диэтиловым эфиром (Кислин и др., 1985). Содержание гормонов в растительном материале определяли с помощью твердофазного иммунофер-

ментного анализа по модифицированной методике (Kudoyarova et al., 1998). Статистическую обработку проводили по стандартным программам MS Excel. Все эксперименты повторяли не менее трех и более биологических повторений (n). На рисунках и в таблицах приведены средние значения показателей и ошибки средних.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние засоления на рост и водный обмен растений ячменя (*Hordeum vulgare*) и пшеницы (*Triticum durum*)

Среди возделываемых растений нет галофитов и большинство важнейших сельскохозяйственных культур чувствительны к действию засоления (Балнокин и др., 2005). Однако среди них выделяются виды и сорта, обладающие относительной устойчивостью к неблагоприятному воздействию токсичных ионов. Представляется важным использовать более устойчивые к засолению сельскохозяйственные культуры в областях с повышенной засоленностью почв.

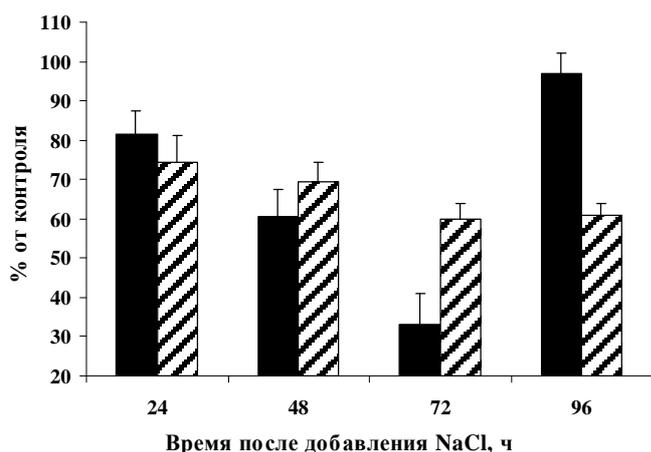


Рис.1. Влияние засоления на устьичную проводимость растений ячменя ■ и пшеницы ▨ (n=8)

Для проведения опытов нами были выбраны растения ячменя и пшеницы, различающиеся по солеустойчивости (Munns et al., 2000). Добавление в питательную среду хлорида натрия до конечной концентрации 100 мМ привело к снижению устьичной проводимости растений пшеницы и ячменя по сравнению с контрольными растениями (рис. 1). Поскольку растения ячменя и пшеницы различались по уровню устьичной проводимости, результаты представлены как процент от значений контрольных растений, которые не подвергались действию засоления. На вторые сутки засоление вызывало снижение устьичной проводимости на 30 % у растений пшеницы и на 40% у растений ячменя. На третьи сутки снижение составило 40% у чувствительного к засолению вида (пшеница) и 70% у устойчивого (ячменя).

Таким образом, сначала уменьшение устьичной проводимости было сильнее выражено у более устойчивых растений ячменя. Но уже на четвертые сутки экспозиции картина изменилась. В то время, когда устьичная проводимость

подвергнутых засолению растений пшеницы оставалась низкой, у растений ячменя этот показатель вернулся к контрольным значениям.

В результате добавления в питательный раствор хлорида натрия до конечной концентрации 100 мМ происходило снижение его водного потенциала, что затрудняло поглощение воды растениями. Вода переставала поступать в корень из-за исчезновения градиента водного потенциала между средой корнеобитания и клетками корня (осмотический компонент действия засоления). Закрывание устьиц является реакцией на снижение доступности воды. В наших экспериментах после первоначального снижения устьичной проводимости (на 70 % после трех суток воздействия по сравнению со значениями контрольных растений), к четвертым суткам действия засоления у растений ячменя наблюдалось резкое увеличение этого показателя (до 90 % от контрольных величин). По всей видимости, у растений ячменя существует защитный механизм, позволяющий поддерживать более высокую устьичную проводимость и, соответственно, более высокий уровень фотосинтеза, что дает возможность растениям продолжать свой рост в новых, экстремальных условиях. У растений пшеницы уровень устьичной проводимости был почти в два раза ниже, чем в контроле, начиная с 72 часов действия засоления, что неизбежно должно было сказаться на фотосинтетической активности. Отрицательное действие засоления на фотосинтетический аппарат проявляется не только в нарушении газообмена, но и в снижении количества пигментов (Cramer et al., 1988; Herradle et al., 1998). Действительно, на девятые сутки действия засоления концентрация хлорофилла уменьшалась в большей степени у растений пшеницы по сравнению с растениями ячменя (табл. 1).

Таблица 1

Концентрация хлорофилла ($\text{мг}\cdot\text{г}^{-1}$ сырой массы) в побеге после 9 суток воздействия хлорида натрия ($n=5$)

Растение	Вариант	a	b	a+b
Ячмень	контроль	4,4±0,2	4,6±0,2	8,7±0,4
	NaCl	3,5±0,3	3,4±0,3	6,7±0,6
	% от контроля	80,6±9,0	75,1±9,6	77,5±10,1
Пшеница	контроль	4,1±0,2	4,0±0,2	7,8±0,4
	NaCl	2,7±0,1	2,2±0,5	5,1±0,2
	% от контроля	66,4±2,7	53,7±12,9	64,7±1,6

Подавление функционирования фотосинтетического аппарата в условиях засоления неизбежно приводит к ингибированию роста побега. Измерение длины листьев показало, что к 9 суткам действия засоления рост третьего и четвер-

того листа ячменя подавлялся в меньшей степени, чем у растений пшеницы (рис. 2). Снижение содержания хлорофилла, которое было сильнее выражено у

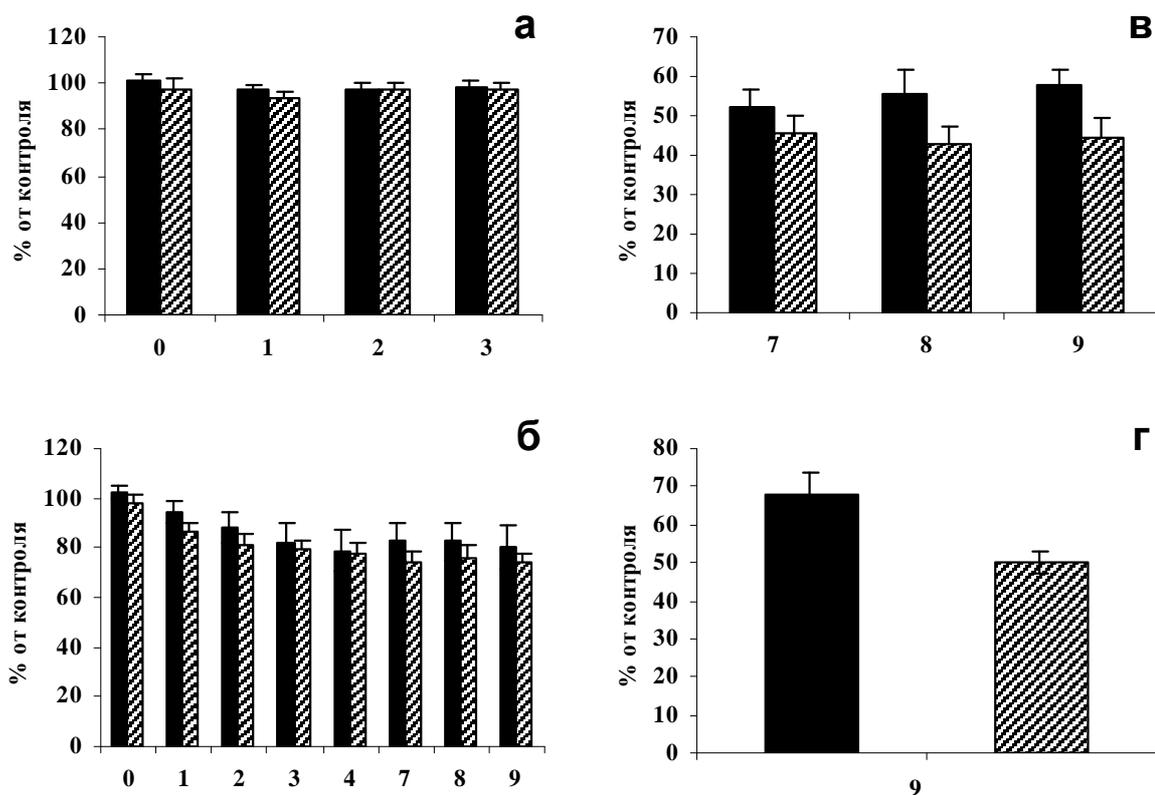


Рис. 2. Влияние засоления на рост первого (а), второго (б), третьего (в) и четвертого (г) листьев растений ячменя ■ и пшеницы ▨. На осях абсцисс представлены сутки после начала действия засоления (n=40)

растений пшеницы, является индикатором подавления фотосинтеза (табл. 1), и более выраженное ингибирование прироста побегов у растений пшеницы можно объяснить тем, что у них уровень фотосинтетических процессов при засолении был подавлен в большей степени, чем у растений ячменя. К 9 суткам засоления было зарегистрировано снижение накопления биомассы побега, которое наиболее значимо проявилось у растений пшеницы (рис. 3). В случае корней различий по биомассе не наблюдалось. Это можно объяснить тем, что дефицит воды, вызванный засолением, влияет на рост корней гораздо в меньшей степени, чем на рост побегов (Frensch, 1997). То, что у растений

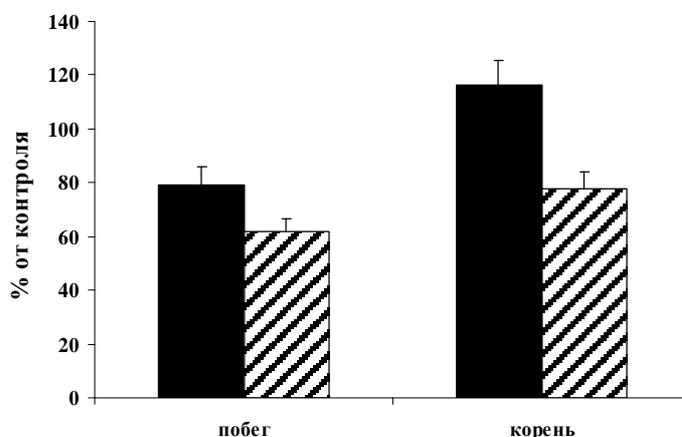


Рис. 3. Сухая масса растений ячменя ■ и пшеницы ▨ через 9 суток с начала засоления (n=20)

ячменя наблюдалось даже увеличение массы корней по сравнению с контролем, по-видимому, связано с удлинением корней как адаптивной реакцией на дефицит воды.

Таким образом, характер различий реакций растений пшеницы и ячменя на засоление менялся со временем. При кратковременном действии засоления растения ячменя, в отличие от пшеницы, сильнее закрывали устьица, что позволяло им в большей степени восстанавливать свои ростовые функции в первые часы стресса за счет ограничения транспирационных потерь и повышения доступности воды для роста растений. При более длительном засолении картина была обратной. В этом случае уровень устьичной проводимости у растений ячменя был выше, что обеспечивало нормальный газообмен и позволяло фотосинтетическому аппарату функционировать с большей интенсивностью (косвенным подтверждением этого предположения являются наши данные по содержанию хлорофилла), в результате чего в меньшей степени угнетался прирост биомассы побега.

2. Изучение водных отношений и роль аквапоринов в реакции растений на засоление на примере двух линий ячменя *Hordeum spontaneum* T1 и 20-45, контрастных по солеустойчивости

Сравнение реакции на засоление у растений пшеницы и ячменя показало важное значение механизмов, обеспечивающих поддержания водного обмена для формирования солеустойчивости. Помимо непосредственного токсичного действия ионов, при засолении также нарушаются водные отношения в растениях. Гидравлическая проводимость на пути воды от клетки к клетке зависит от количества и активности аквапоринов (Morillon and Chrispeels, 2001). Аквапорины – это белки мембраны, формирующие каналы для воды. Действие этих каналов связано с контролем движения воды в растении, что особенно важно при засухе и засолении (Yeо, 1998). Хотя цитоплазматическая мембрана обладает меньшей проницаемостью для воды, чем тонопласт, ее гидравлическая проводимость более переменна, что указывает на важность функционирования аквапоринов цитоплазматической мембраны (PIР аквапорины) (Javot and Maurel, 2002). Семейство аквапоринов PIР2 наиболее ярко представлено в корнях (Javot et al., 2003; Chaumont, et al., 2000) и экспрессия PIР2;4 гена в растениях кукурузы была признана неспецифической реакцией на засоление (Zhu et al., 2005).

Растения ячменя являются традиционным объектом изучения аквапоринов в условиях дефицита воды из-за преобладания трансклеточного пути транспор-

та воды (Steudle and Jeschke, 1983). Для получения более полной картины ответа растений на солевой стресс на следующем этапе нашей работы были изучены водные отношения и вклад аквапоринов в реакцию растений на засоление на примере двух, различающихся по солеустойчивости, линий ячменя Т1 (чувствительная) и 20-45 (устойчивая).

Концентрацию хлорида натрия повышали постепенно, увеличивая её каждые сутки на 25 мМ до конечной величины 75 мМ. В первые 2 часа с начала действия засоления скорость транспирации у растений обеих линий ячменя снижалась в равной степени (рис. 4). Значительное ингибирование этого процесса было зафиксировано через 24 часа после начала засоления у 20-45 растений, в то время, как у Т1 растений транспирация уменьшалась в меньшей степени.

Через 3 часа после увеличения концентрации хлорида натрия с 50 мМ до 75 мМ снижение гидравлической проводимости корней у линии Т1 составило примерно 20% от контроля, а у линии 20-45 гидравлическая проводимость снижалась в 2 раза (абсолютные значения приведены в диссертации).

Изменение во времени экспрессии гена аквапорина для Т1 и 20-45 растений при засолении представлено на рисунке 5. Снижение экспрессии у 20-45 растений стало статистически значимым через 2 часа действия хлорида натрия и осталось на таком уровне до конца эксперимента. Уменьшение экспрессии гена аквапорина у Т-1 растений наблюдалось спустя 24 часа после начала действия засоления. Разница между двумя линиями растений в

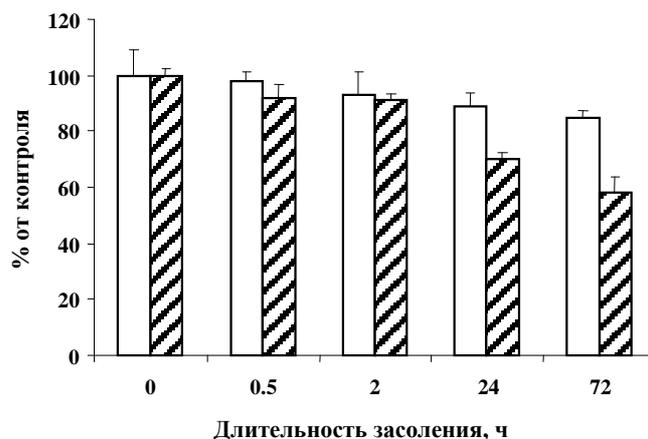


Рис. 4. Влияние засоления на транспирацию: □ - Т1, ▨ - 20-45 (n=30)

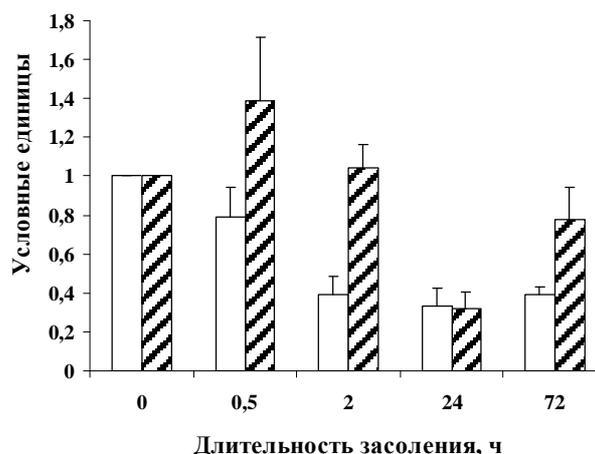


Рис. 5. Изменение в уровне транскрипции гена аквапорина PIP 2;4 (экспрессия представлена по отношению к контролю) при действии натрий-хлоридного засоления: □ - Т1, ▨ - 20-45 (n=5)

степени ингибирования транспирации становится заметной позже, чем различия в уровне экспрессии гена аквапорина, поскольку требуется время, чтобы изменения в экспрессии гена привели к яркому физиологическому эффекту.

Почему у толерантных к засолению растений снижается гидравлическая проводимость, в результате чего затрудняется поступление воды в побег, которое уже и так проблематично из-за уменьшения доступности воды в засоленном растворе? Возможно, снижение гидравлической проводимости линии 20-45 позволяет растениям сохранять оводненность корней в условиях дефицита воды. У солеустойчивой линии 20-45 содержание воды в корнях снижалось лишь на 1 %, в то время как у чувствительной линии Т-1 – на 3 %. Кроме того, из-за уменьшения гидравлической проводимости снижается поступление токсичных ионов в корни растений через неспециализированные ионные каналы (Davenport and Tester, 2000).

Основной показатель жизнеспособности растений – это прирост их биомассы. Засоление ингибировало рост всех листьев (кроме первого) у обеих линий растений. Во всех случаях рост листьев тормозился в большей степени у линии Т1 (рис. 6).

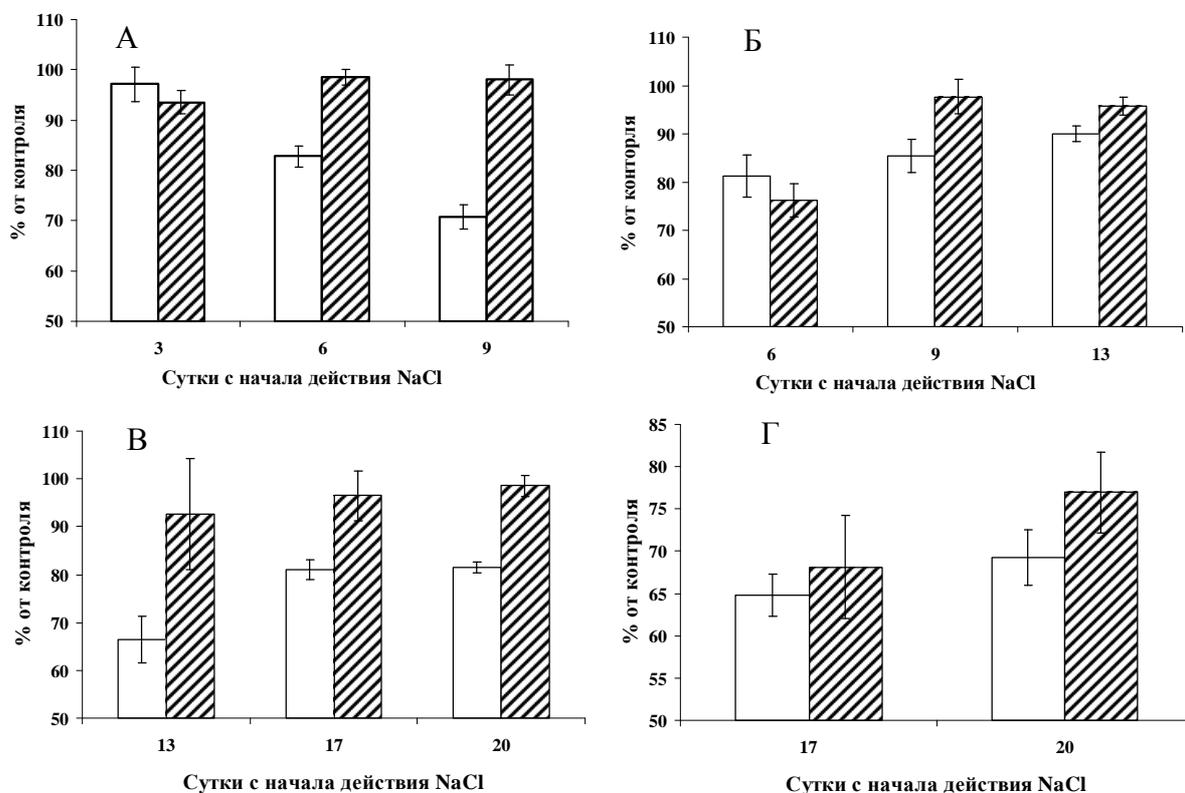


Рис. 6. Изменение длины листьев растений ячменя при действии 75 мМ хлорида натрия: □ - Т1, ▨ - 20-45 (а – второй лист, б – третий лист, в – четвертый лист, г – пятый лист (n=40))

Способность к накоплению биомассы определяется интенсивностью фотосинтеза, что в свою очередь зависит от содержания поглощающих свет пигментов. Содержание хлорофилла $a + b$ снижалось в большей степени у линии T1 по сравнению с 20-45 (рис. 7).

В фазе раннего ответа на солевой стресс для растения важно как можно быстрее «почувствовать» угрозу и запустить в действие долговременную стратегию, которая позволит ему справиться со стрессом не только в первое время его действия. Растения линии 20-45 успешнее справились с преодолением неблагоприятного действия засоления. Вероятно, резкое снижение гидравлической проводимости у линии 20-45 –

это своеобразный сигнал, который поступает из корней в побеги, передавая информацию о развитии водного дефицита в корнях и, по всей видимости, запускает каскад защитных реакций.

Снижение уровня транспирации считается первичным ответом на солевой стресс (Robinson et al, 1997). Физиологический смысл этого явления заключается в том, что побег теряет меньше воды, т.е. компенсирует снижение поступления воды из корней уменьшением ее испарения с поверхности листа через устьичные щели. Таким образом, «сэкономленная» вода может поступать в растущие клетки и способствовать частичному восстановлению ростовых процессов.

Кроме того, в результате снижения интенсивности работы «верхнего концевого двигателя» у поверхности корней меньше концентрируются токсичных ионов. Показано, что растения, не способные в этих условиях закрывать устьица, ожидают обезвоживание и гибель (Volkov et al., 2003). Изменение устьичной проводимости позволяет растениям адаптироваться к условиям окружающей среды (Jones, 1998). В наших экспериментах транспирация в большей степени снижалась у растений, отличающийся большей солеустойчивостью (20-45), чем у чувствительных к засолению растений (T1). Этот факт подтверждает гипотезу о том, что снижение транспирации в условиях засоления необходимо для минимизирования поглощения токсичных ионов и способствует запуску

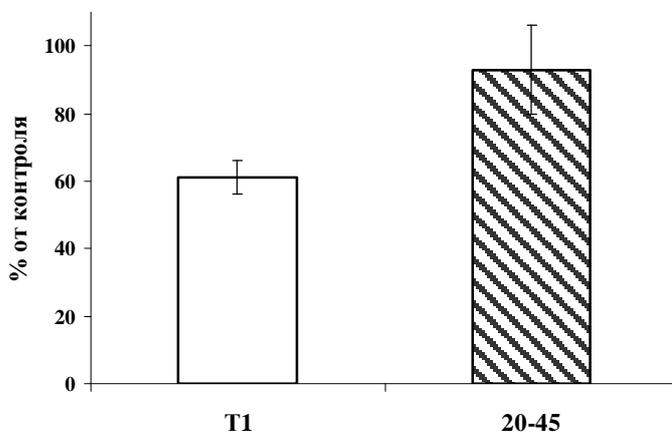


Рис.7. Содержание хлорофилла $a + b$ в листьях ячменя на двадцатые сутки действия засоления ($n=5$)

механизмов солеустойчивости растений. Наблюдаемое нами изменение в экспрессии аквапоринов может быть ответственно за последующее снижение гидравлической проводимости, обеспечивающее сохранение оводненности корней, закрытие устьиц и ингибирование транспирации.

3. Использование сортов Прерия и Михайловский для изучения влияния засоления на растения ячменя

В первых сериях экспериментов мы использовали виды, которые судя по данным литературы, должны были отличаться по солеустойчивости (пшеница и ячмень) и линии, заранее отобранные по чувствительности к хлориду натрия (Т1 и 20-45). Представляло интерес проверить солеустойчивость сортов, районированных в нашей Республике, которые не были ранее охарактеризованы в этом плане. Было необходимо выяснить, будут ли у них работать механизмы солеустойчивости, характерные для ранее изученных нами растений. В ходе предварительных экспериментов нами были выбраны два сорта ячменя, отличающиеся по засухоустойчивости (Прерия - засухоустойчивый, Михайловский - влаголюбивый).

Транспирация растений обоих сортов снижалась уже через 15 минут после добавления соли в питательный раствор (рис. 8 А). Угнетение транспирации за счет закрытия устьиц было ожидаемой реакцией на снижение доступности воды при

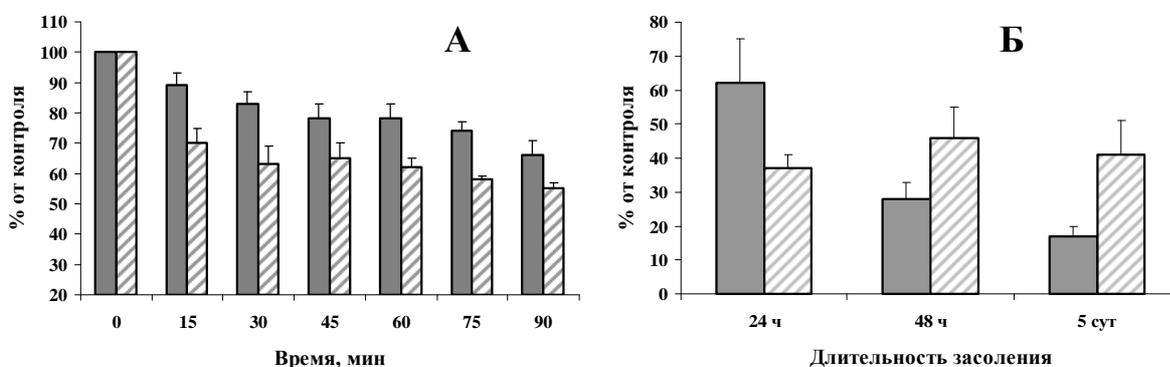


Рис. 8. Влияние кратковременного (А) и длительного (Б) засоления на транспирацию растений ячменя сортов Михайловский \square и Прерия \square (n=20)

засолении в результате уменьшения осмотического потенциала питательной среды. Наблюдения за растениями в течение 90 минут показали, что транспирация под влиянием засоления снижалась сильнее у растений сорта Прерия, чем у растений сорта Михайловский. Эти различия были небольшими и не превышали 10-15%. На следующие сутки солевого стресса скорость транспирации у растений сорта Прерия была по-прежнему ниже контроля (рис. 8 Б), но разница между растениями сорта Прерия и Михайловский

увеличилась почти вдвое. Однако затем картина изменилась. В то время как растения сорта Прерия сохраняли скорость транспирации на уровне 50% от контроля, растения сорта Михайловский снизили этот показатель в 2 раза через двое суток засоления и почти полностью закрыли устьица на 5 сутки эксперимента. Подтверждением того, что транспирация снижалась в результате закрытия устьиц, служат данные по устьичной проводимости (данные приведены в диссертации).

Ранее было показано, что закрытие устьиц у растений ячменя при действии засоления происходит в результате накопления АБК (Fricke et al., 2004; Ахиярова и др., 2005). С помощью метода иммулокализации было обнаружено, что накопление АБК при засолении происходит именно в устьичных клетках (Ахиярова и др., 2006). Представляло интерес выяснить, связаны ли различия в устьичной реакции на засоление с уровнем накопления АБК в растениях разных сортов ячменя. Как видно из рисунка 9, уже через 10 мин содержание АБК в побегах растений увеличивалось в 1,5 раза у растений сорта Михайловский и в 2 раза у растений сорта Прерия. В корнях растений к этому времени содержание АБК возрастало только у растений сорта Прерия. Через сутки

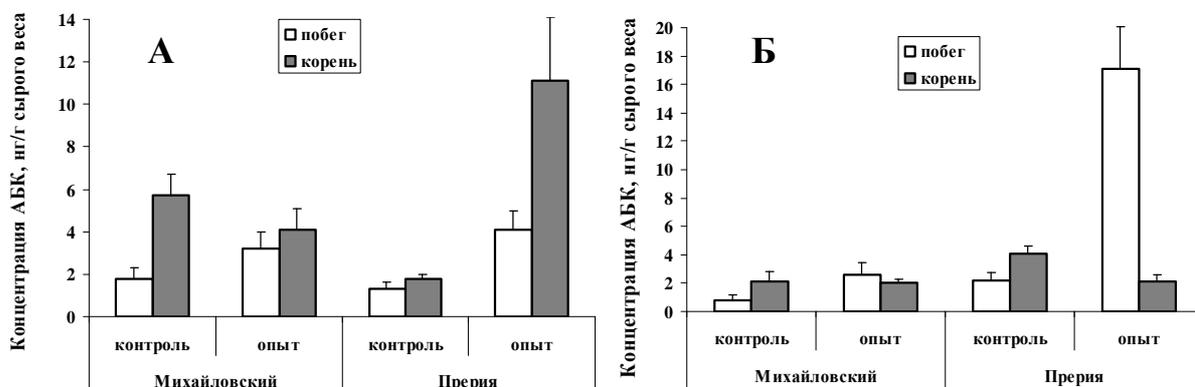


Рис. 9. Концентрация АБК у растений ячменя через 10 минут (А) и 24 часа (Б) после начала экспозиции на хлориде натрия (n=9)

содержание АБК в побегах растений ячменя на фоне засоления было в 3 раза выше, чем в контроле, у растений сорта Михайловский и в 7 раз выше, чем в контроле, у растений сорта Прерия. Таким образом, прослеживается связь между снижением устьичной проводимости и накоплением АБК: у растений сорта Прерия, которые накапливали больше АБК, устьичная проводимость снижалась в большей степени. Эти результаты свидетельствуют о том, что различия в устьичной реакции растений на засоление связаны со способностью накапливать АБК.

Осмотическое давление клеточного сока растений не менялось в первое время после добавления хлорида натрия в питательный раствор (табл. 2). Разница между необработанными и подверженными действию засоления растениями наметилась спустя сутки после начала действия стрессового фактора. В большей степени осмотическое давление возрастало у сорта Михайловский. Через 8 суток эта разница была уже почти в 5 раз выше по сравнению со значениями контрольных растений.

Таблица 2

Влияние засоления на осмотическое давление (МПа) клеточного сока (n=8)

Сорт		Михайловский		Прерия	
Воздействие		контроль	NaCl	контроль	NaCl
70 мин	побег	1,15±0,06	1,36±0,05	1,19±0,03	1,31±0,04
	корень	0,76±0,04	0,97±0,08	0,63±0,11	0,84±0,11
3 часа	побег	1,20±0,04	1,27±0,04	1,20±0,11	1,16±0,03
	корень	0,69±0,03	0,81±0,06	0,66±0,01	0,79±0,06
24 часа	побег	1,09±0,03	1,53±0,01	1,03±0,01	1,39±0,02
	корень	0,58±0,04	0,75±0,09	0,57±0,02	0,79±0,02
48 часов	побег	1,12±0,09	1,67±0,12	1,04±0,1	1,69±0,1
	корень	0,54±0,07	0,76±0,06	0,42±0,01	0,68±0,05
8 суток	побег	1,39±0,02	4,94±0,26	1,49±0,13	3,61±0,06
	корень	0,56±0,03	0,73±0,08	0,76±0,03	0,85±0,06

Накопление осмотически активных веществ поддерживает тургор клеток при возрастании дефицита воды. Поскольку рост клеток растяжением происходит за счет тургора, а количество осмотически активных веществ возрастало при засолении в большей степени у сорта Михайловский, можно было ожидать, что растения этого сорта будут расти на засолении быстрее. Кроме того, считается, что осмотическое приспособление может способствовать поддержанию высокой скорости транспирации (Serraj and Sinclair, 2002). Таким образом, казалось бы, способность к накоплению осмотически активных веществ и поддержанию тургора, которая ярче проявлялась у растений сорта Михайловский, должна была привести к более высокой устьичной проводимости у растений этого сорта при длительном действии засоления. Однако этого не происходило. Почему? Известно, что ионы натрия и хлора являются «дешевым осмотиком» (Munns et al., 2006), накопление которых в вакуолях клеток обеспечивает значительный вклад в осморегуляцию галофитов (одновременно с накоплением нетоксичных осмотиков в цитоплазме). В отличие от галофитов, ячмень, как и большинство возделываемых растений, является гликофитом. Известно, что у гликофитов накопление ионов натрия в побеге приводит к ингибированию их роста (Munns, 2005; Леонова и др., 2005). Таким образом, выраженный ростингибирующий эффект засоления у растений сорта Михайловский

(см. диссертацию) был следствием более быстрого накопления токсичных ионов в побеге растений. Данные, полученные в результате анализа содержания ионов хлора в корнях и побегах растений подтверждают это предположение (табл. 3). Что могло быть причиной более быстрого накопления ионов у растений сорта Михайловский? Поддержание ионного гомеостаза – сложный процесс, обусловленный ускоренным формированием поясков Каспари, а также функционированием селективных каналов, которые ограничивают поступление ионов натрия в клетки, их загрузку в ксилему и т.д. (Tester and Davenport, 2003; Ершов и др., 2005).

Таблица 3

Концентрация (г/л) хлорид ионов в клеточном соке растений после 9 суток засоления (n=6)

Сорта	Воздействие	побеги	корни
Михайловский	контроль	1,4±0,2	0,3±0
	NaCl	38,3±4,1	3,9±0,7
Прерия	контроль	1,7±0,1	0,2±0,1
	NaCl	26,3±4,3	4,3±0,8

Вместе с тем, запуск механизма поддержания ионного гомеостаза требует времени. За это время ионы натрия могут проникать в клетки по неселективным каналам (Davenport et al., 2007). Скорость пассивной диффузии ионов в клетки корня определяется их поступлением к поверхности корня с транспирационным потоком. Загрузка ионов в ксилему зависит от разведения ксилемного сока и также возрастает с увеличением скорости транспирации (Davenport et al., 2007). Таким образом, неудивительно, что у растений сорта Михайловский, у которых транспирация снижалась в меньшей степени, чем у растений сорта Прерия в первые сутки после засоления, в побег поступало больше токсичных ионов, что и могло быть причиной более выраженного подавления роста на засолении.

Таким образом, сравнение реакции на засоление у растений, различающихся по степени засухоустойчивости, позволило показать, что снижение скорости транспирации в начале действия засоления снижает степень его ростингибирующего действия, что, по-видимому, связано с уменьшением притока токсичных ионов с транспирационным потоком. Солеустойчивость растений складывается из многих признаков, и ее невозможно свести к одному механизму. Вместе с тем, полученные нами результаты указывают на то, что способность растений быстро закрывать устьица при наличии соли в питательном растворе способствует формированию солеустойчивости и может быть использована как физиологический признак в процессе селекции. Сравнение растений разных

сортов свидетельствует о том, что степень закрытия устьиц при засолении зависит от уровня и скорости накопления АБК.

4. Сравнение действия натрий-хлоридного засоления на примере различных сортов растений ячменя

В предыдущем разделе представлены результаты исследования пар видов (пшеница и ячмень), линий (Т1 и 20-45) и сортов (Прерия и Михайловский). Выявлены определенные закономерности в характере изменения транспирации и роста растений, различающихся по солеустойчивости. Представляло интерес проверить, удастся ли выявить те же закономерности при изучении более широкого спектра сортов.

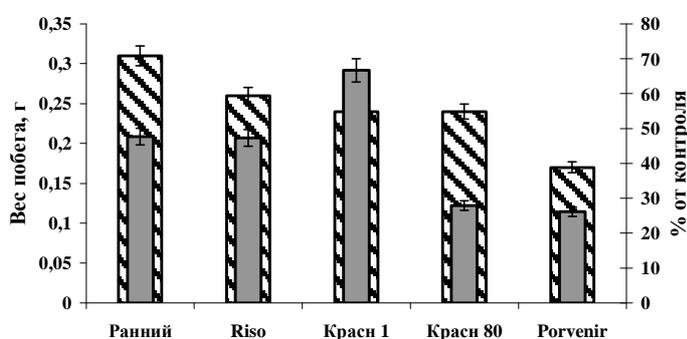


Рис. 10. Сырая масса побегов различных сортов ячменя после 9 суток действия засоления: ▨ абсолютные значения, ■ значения массы, выраженные в % от контроля (n=12)

Нами изучалось действие кратковременного (1-2 часа) и длительного (10 дней) засоления на растения пяти сортов ячменя из коллекции ВИР: Красноярский 1 и 80, Ранний-1, Riso-1058 и Porvenir. Засоление приводило к снижению скорости роста всех изученных сортов растений: через 10 дней масса побега была ниже, чем в

контроле на 30 -70 % (рис. 10). Засоление в наибольшей степени (в 3 раза по сравнению с контролем) подавляло рост побега у растений сорта Красноярский 80 и в наименьшей степени - у сорта Красноярский 1. В последнем случае масса побега на засолении была на уровне 67 % от контроля. По абсолютной массе побегов на фоне длительного засоления его ростингибирующее действие было в наименьшей степени выражено у растений сорта Ранний-1, у которого данный параметр на фоне стрессового воздействия был на 40 % выше, чем в среднем у остальных сортов. Как в абсолютном, так и относительном выражении ростингибирующее действие засоления в наибольшей степени проявлялось у растений сорта Porvenir.

В наших экспериментах транспирация у растений всех сортов кроме Красноярский 80 снижалась на 30-50% уже через 15 мин после добавления соли в питательный раствор, что позволяло этим растениям поддерживать

баланс между снижением притока воды из корней и транспирационными потерями (рис. 11).

Кроме экономии воды, закрытие устьиц на засолении имеет дополнительное приспособительное значение, которое заключается в ограничении проникновения в растения токсичных ионов с транспирационным потоком (см. предыдущие разделы). Отсутствие видимого завядания растений сорта Красноярский 80 указывает на то, что у них приток воды из их корней

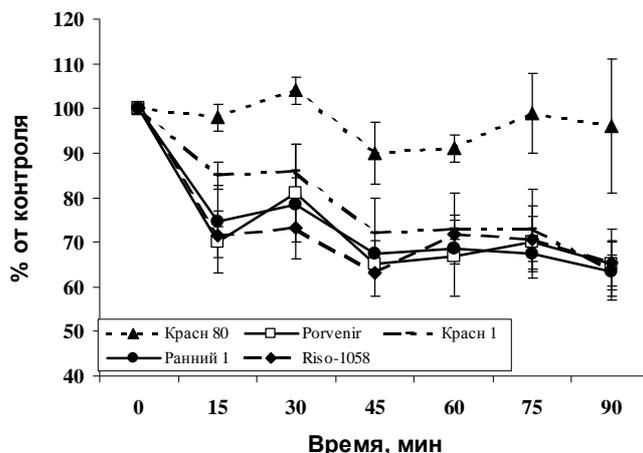


Рис. 11. Влияние кратковременного действия засоления на транспирацию растений разных сортов ячменя (n=20)

на засолении мог поддерживаться за счет возрастания гидравлической проводимости. По всей видимости, высокая скорость транспирационного потока у растений этого сорта способствовала быстрому накоплению токсичных ионов, что могло быть причиной резкого снижения скорости их роста до 20 % от контрольных значений. Растения остальных сортов не различались по транспирационной реакции на кратковременное действие засоления. Однако различия между ними проявлялись при его более длительном действии (рис. 12).

В наибольшей степени транспирация снизилась у растений сорта Ранний-1 (на 63 % по сравнению с контролем), т.е. у сорта, который по скорости накопления биомассы на засолении проявил себя как наиболее устойчивый. Снижение транспирации у растений этого сорта происходило благодаря закрытию устьиц (устьичная проводимость у них была на уровне 30 % от контроля). Такое резкое снижение скорости транспирации за счет закрытия устьиц, по-видимому, было необходимо как компенсация вы-

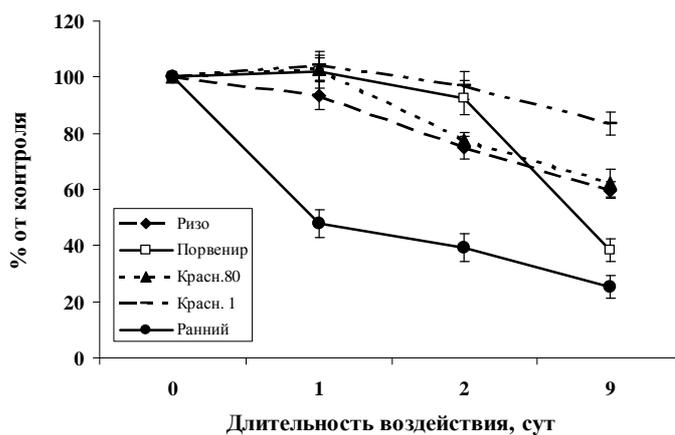


Рис. 12. Влияние длительного действия засоления на транспирацию разных сортов ячменя (n=10)

сокой поглотительной способности хорошо развитой корневой системы (данные по массе растений приведены в диссертации). Второе место по степени снижения транспирации заняли растения сорта Riso, которые также были вторыми по накоплению биомассы побега на засолении. У растений сортов Красноярский 80 и Porvenig скорость транспирации снизилась гораздо меньше, и они были наиболее чувствительными к засолению (у растений сортов Porvenig и Красноярский 80 в наибольшей степени снижалось накопление биомассы по сравнению с контролем). Интересно то, что хотя масса побега растений сорта Красноярский 80 резко снижалась на засолении, по абсолютной величине она была все же на 30 % выше, чем у растений сорта Porvenig. Вероятно, причина этого эффекта заключается в закономерности, обнаруженной австралийскими исследователями (Munns, 2005). Она заключается в том, что за счет массы побега происходит разбавление токсичных ионов. Поэтому, вероятно, приток токсичных ионов с быстрым транспирационным потоком растений сорта Красноярский 80 разбавлялся за счет большой исходной массы побега этих растений. Казалось бы, удастся проследить связь между степенью снижения транспирации и солеустойчивостью. Более высокий уровень транспирации на засолении был у растений чувствительных сортов (Porvenig и Красноярский 80), а низкий уровень транспирации – у относительно солеустойчивых сортов (Ранний-1 и Riso). Однако в эту картину не вписывались растения сорта Красноярский 1. У них на фоне высокой транспирации степень ингибирования роста под влиянием засоления была самой низкой (масса их побегов на засолении была только на 23 % ниже контроля). Эти результаты объясняются тем, что устойчивость к засолению связана не только со скоростью транспирационного потока. Известно, что с увеличением транспирации возрастает проникновение ионов по неселективным ионным каналам (Davenport et al., 2007). Однако это далеко не единственный путь поступления ионов натрия в растения. Кроме них имеется много различных селективных каналов, работа которых предотвращает поступление ионов натрия и хлора в побег и их накопление до токсичного уровня в цитоплазме (Tester, Davenport, 2003). Эффективная работа таких каналов может обеспечить устойчивость растений к засолению на фоне высокой скорости транспирации, что может позволить растению держать устья открытыми. Такая возможность в свою очередь обеспечивает высокую активность накопления биомассы растениями за счет нормализации газообмена и фотосинтеза на засолении. Относительная устойчивость растений сорта Красноярский 1 к

засолению, которая проявлялась на фоне высокой скорости транспирации, может быть связана с эффективностью работы механизмов, обеспечивающих ионный гомеостаз. Отсутствие видимого завядания растений сортов Красноярский 1 и Rogvenig указывает на высокую гидравлическую проводимость этих растений на фоне засоления. Однако в последующем у растений сорта Rogvenig транспирация падала, в то время как у Красноярский 1 она сохранялась на высоком уровне, что указывает на снижение способности корней растений Rogvenig проводить воду. Это могло быть проявлением их чувствительности к токсичному действию ионов и причиной резкого торможения роста у растений этого сорта.

Таким образом, сравнение реакции растений разных сортов на засоление выявило довольно сложную картину. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что способность растений быстро закрывать устьица в начале действия засоления является важным условием формирования солеустойчивости. Однако, в дальнейшем, поддержание ионного гомеостаза определяется иными механизмами, которые обеспечивают возможность поддержания устьиц в открытом состоянии. Эти результаты свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения динамики транспирационного ответа с целью поиска критериев оценки солеустойчивости растений, в процессе селекции устойчивых к засолению сортов.

Выводы

1. Сравнение реакции на кратковременное воздействие хлорида натрия у относительно солеустойчивых растений ячменя и менее устойчивых растений твердой пшеницы, а также линий и сортов ячменя показало, что быстрое закрытие устьиц и снижение транспирационного потока характерно для более солеустойчивых генотипов.
2. Установлено, что быстрое падение гидравлической проводимости и транспирации у растений солеустойчивой линии ячменя *Hordeum spontaneum* 20-45 по сравнению с менее устойчивыми к засолению растениями линии Т-1 связано с более выраженным снижением экспрессии гена РР2;4 на фоне засоления.
3. Показано, что при кратковременном действии хлорида натрия уровень накопления АБК был выше в листьях растений ячменя сорта Прерия, у которых устьичная проводимость снижалась в большей степени по сравнению с растениями сорта Михайловский. Эти результаты свидетельствуют о роли АБК в ограничении транспирационного потока при засолении.

4. Выявлено, что при кратковременном засолении растения ячменя сорта Михайловский отличаются от растений сорта Прерия более высоким уровнем транспирации и большим накоплением токсичных ионов хлора.
5. Обнаружено, что при более длительном действии засоления характер связи между устьичной проводимостью и солеустойчивостью меняется на противоположный по сравнению с тем, который был выявлен при кратковременном действии засоления: более высокая устьичная проводимость проявляется у более солеустойчивых растений.

Выражаю благодарность всем сотрудникам нашей лаборатории, особую признательность Кудояровой Г.Р. за ценные советы и поддержку на всех этапах моей работы и сердечную благодарность моему научному руководителю Веселову Д.С. за неоценимую помощь.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Веселов Д.С., Шарипова Г.В., Кудоярова Г.Р. Сравнительное изучение реакции растений ячменя (*Hordeum vulgare*) и пшеницы (*Triticum durum*) на кратковременное и длительное действие натрий хлоридного засоления // Агрехимия. - 2007. №7. С. 41-48.
2. Веселов Д.С., Шарипова Г.В. Источник и последствия быстрой генерации сигнала АБК при засолении. Тезисы докладов международного симпозиума «Сигнальные системы растений: роль в адаптации и иммунитете». Казань, 27-30 июня 2006. С. 162-163.
3. Фархутдинов Р.Г., Фаизов Р.Г., Высоцкая Л.Б., Шарипова Г.В., Веселов Д.С., Кудоярова Г.Р. Устьичная реакция на дефицит воды у растений ячменя, рекомендованных к районированию в контрастных климатических условиях. Тезисы докладов международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем». Сыктывкар, 18-24 июня 2007. С. 406-408.
4. Шарипова Г.В., Веселов Д.С., Чернов В.Е., Пендинен Г.И., Кудоярова Г.Р. Ростовая реакция на засоление у растений разных сортов ячменя и ее связь с соотношением массы побег/корень и характером изменения транспирации. Тезисы докладов международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем». Сыктывкар, 18-24 июня 2007. С. 427-429.
5. Веселов Д.С., Шарипова Г.В. Сравнение чувствительности водного обмена и роста растений ячменя и пшеницы к натрий-хлоридному засолению. Тезисы докладов международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем». Сыктывкар, 18-24 июня 2007. С. 66-67.