

*На правах рукописи*



**ГРИНИН Антон Леонидович**

**УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ ГОРЧИЦЫ К ЗАСОЛЕНИЮ  
И ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ПРОЛИНА**

**03.01.05 - физиология и биохимия растений**

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2010

Работа выполнена в лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва.

**Научный руководитель:**

Кандидат биологических наук

Холодова Валентина Павловна

**Официальные оппоненты:**

Доктор биологических наук, профессор

Тараканов Иван Германович

Доктор биологических наук, профессор

Хрянин Виктор Николаевич

**Ведущая организация:** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет.

Защита состоится «22» июня 2010 г. в 13<sup>00</sup> часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.

Факс: (495) 977-80-18, e-mail: [ifr@ippras.ru](mailto:ifr@ippras.ru); [m-azarkovich@ippras.ru](mailto:m-azarkovich@ippras.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан «20» мая 2010 г.

Ученый секретарь

совета по защите докторских  
и кандидатских диссертаций,  
кандидат биологических наук

М.И. Азаркович

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Среди неблагоприятных для растений факторов одним из самых распространенных является засоление. По последним данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН, более 800 млн га земли подвержены засолению. Воздействие хлоридного засоления значительно нарушает корневое питание и водный режим гликофитов, ингибирует процесс фотосинтеза, в результате чего подавляется рост растений и их урожайность (Flowers, 2004). Ценная сельскохозяйственная масличная культура горчица сарептская (*Brassica juncea* L.) культивируется в России преимущественно в условиях аридных зон, где около половины всех распаханых земель подвержены засолению. Важной практической задачей является отбор высокоурожайных сортов горчицы с повышенной солеустойчивостью.

Избыточное поступление солей в клетки растений при засолении сдвигает ионный баланс, нарушает структуру и функции макромолекул, инициирует избыточный синтез активных форм кислорода (АФК). Однако помимо прямого токсичного действия, засоление вызывает у растений осмотический стресс, обусловленный резким падением водного потенциала корнеобитаемой среды растения (Кузнецов, Шевякова, 1999). В ответ на нарушение баланса неорганических ионов и водного статуса в растении включается ряд антистрессорных механизмов, к которым относятся активация поглощения солей из среды с целью восстановления потока воды в растении и сопровождающая этот процесс аккумуляция в клетках совместимых осмолитов (Kumar, 2009). Одним из наиболее распространённых и важных осмолитов считается иминокислота пролин (Про) (Misra, Saxena, 2009; Yousfi et al., 2010). Однако в настоящее время накапливается все больше данных, что у гликофитов осмотическая функция Про часто не выполняется или она не является основной (Munns, 2008; Verbruggen, Hermans, 2009; Attri et al., 2010). Ряд исследователей прямо критикуют идею о функционировании Про в качестве осмолита (Gagneul et al., 2007; Larher et al., 2009). В литературе до сих пор не существует систематического анализа соотношения концентраций NaCl

индуцируемого Про с концентрациями накапливаемых в клетках ионов натрия и хлора.

В последние годы все больше говорится о Про как о химическом шапероне, способном защищать макромолекулы, сохраняя их нативную структуру и биологическую активность (Diamant et al., 2001; Chattopadhyay et al, 2004). Развитие представлений о химических шаперонах имеет важное практическое значение для понимания адаптационных процессов и разработки новых технологий консервации ферментов для медицинских целей и химической промышленности.

#### **Цель и задачи исследования.**

Целью настоящей работы являлось изучение некоторых физиологических и молекулярных механизмов адаптации растений горчицы к солевому стрессу и выяснение возможной роли пролина.

В связи с данной целью были поставлены следующие задачи:

1. Оценить устойчивость к засолению различных сортов горчицы.
2. Изучить взаимосвязи содержания Про с содержанием неорганических ионов, мРНК *P5CS* (ген пирролин-5-карбоксилат синтазы), мРНК *PDH* (ген пролиндегидрогиназы) и величиной осмотического потенциала в условиях засоления.
3. Исследовать роль NO в регуляции содержания Про при засолении.
4. Изучить возможность функционирования Про в качестве химического шаперона в условиях засоления.

**Научная новизна.** На основе ряда физиологических и биохимических параметров впервые проведена оценка на солеустойчивость нескольких отечественных сортов горчицы, активно используемых в сельском хозяйстве. Достоверно установлено явление резкого падения концентрации Про при продолжительном засолении. Впервые показано, что сигнальная функция оксида азота на начальных этапах засоления реализовалась в быстром повышении концентрации  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  и  $\text{K}^+$ , вероятно, за счет активации ионных каналов в листьях горчицы, что вызывало дополнительную аккумуляцию Про. В модельных опытах впервые установлено, что Про в условиях засоления способен обеспечивать поддержание активности фермента малатдегидрогиназы (МДГ), что свидетельствовало в пользу его функционирования в качестве химического шаперона. Выдвинуто предположение, что в условиях засоления выравнивание осмотического

потенциала основных компарментов клетки могло осуществляться за счет аккумуляции в цитоплазме ионов К.

**Практическая значимость.** Полученные в работе данные по сортовым различиям растений горчицы в условиях засоления могут быть использованы в подборе сортов для выращивания растений на засоленных почвах. Исследования уточняют представления об осморегуляторной функции Про, о сигнальных процессах в растении и дают возможность высказать предположение об осморегуляторной роли ионов калия в цитоплазме. Данные по функционированию Про в качестве химического шаперона имеют большой практический интерес для медицинских целей и химической промышленности в разработке сред для эффективной консервации ферментов. Теоретические обобщения и совокупность полученных экспериментальных данных могут использоваться в курсах лекций для студентов биологических факультетов вузов страны.

**Апробация работы.** Результаты работы докладывались на международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем» (Сыктывкар, 2007); международной научной конференциях «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений» (Екатеринбург, 2008); международной конференции «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях крайнего севера» (Апатиты, 2009), конференции молодых ученых ИФР РАН (Москва 2008, 2009 годы).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 8 работ, из них две статьи в рецензируемых журналах.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследований, изложения полученных результатов и обсуждения, заключения и выводов. Работа изложена на 130 страницах машинописного текста, включая 5 таблиц, 31 рисунок; библиография содержит 250 название, в т.ч. 219 на иностранных языках.

## **ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Объектом исследования была выбрана горчица сарептская (*Brássica juncea* L.) - однолетнее травянистое, ценное сельскохозяйственное растение. Семена

горчицы предоставлены Донским филиалом ВНИИМК Ростовской области. Исследовали высокопродуктивные сорта, активно используемые в сельском хозяйстве и пищевой промышленности: Донской, Лера, Славянка и Скороспелка. **Условия выращивания.** Растения выращивали на модифицированной среде Хогланда-Снайдерс при 12-часовом световом периоде и освещенности 37,6 Вт/м<sup>2</sup> люминесцентными лампами Philips (F36W/54), температуре воздуха – 23±1°C/15±1°C, относительной влажности – 55/70% день/ночь. **Условия проведения опытов.** Дезинфицированные семена проращивали в кюветах с перлитом в течение 14 суток, после чего проростки пересаживали в пластиковые сосуды объемом 1000 мл на модифицированную среду Хогланда-Снайдерс. По достижению растениями 4-недельного возраста в питательный раствор опытных вариантов вносили NaCl в концентрации 100 и 150 мМ, проводя смену питательной среды каждые 5 суток. Действие засоления продолжалось до 35 суток, фиксацию растительного материала проводили в 12–14 часов жидким азотом и хранили при -70<sup>0</sup>С. **Измерение свежей массы** отдельных органов растений проводили стандартным весовым методом. **Определение содержания K<sup>+</sup> и Na<sup>+</sup>** проводили с помощью пламенного фотометра LEKI FP-640, фирмы LEKI Instruments (Финляндия). Измерения концентрации Cl<sup>-</sup> и NO<sub>3</sub><sup>-</sup> проводили на ионолаузере EA 940, фирмы Orion Research Inc (США) с помощью ионоселективных электродов этой же фирмы и фирмы Metter Toledo (США). **Осмотический потенциал** измеряли криоскопическим методом на осмометре Osmomat 030, фирмы Gonotac (США). Величину осмотического потенциала выражали в МПа. **Содержание свободного пролина** определяли с помощью кислого нингидринового реактива (30 мл ледяной уксусной кислоты + 20 мл 6М Н<sub>3</sub>РO<sub>4</sub> + 1,25 г нингидрина) (Bates et al. 1973). **Активность пролиндегидрогиназы (ПДГ (EC:1.5.1.2))** оценивали по скорости использования НАД<sup>+</sup> на окисление пролина, измеряя увеличение концентрации образующегося НАДН в единицу времени (Mattioni et al., 1997). **Определение содержания сахаров** проводили фенольным методом (Dubois et al., 1956) с небольшими модификациями. **Содержание мРНК P5CS и PDH** проводили методом обратной транскрипции полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Тотальную РНК выделяли с использованием RNeasy Mini Kit

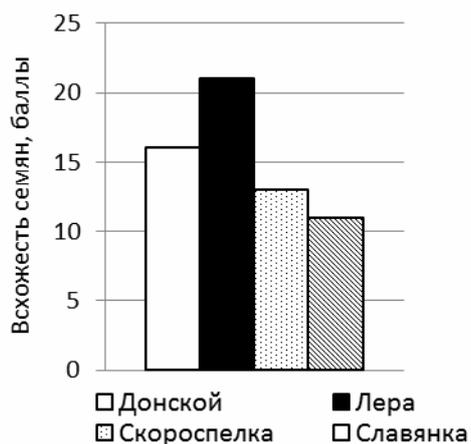
фирмы QIAGEN. Реакцию обратной транскрипции проводили по руководству фирмы Fermentas. Для ПЦР использовали ДНК-амплификатор 2720 Thermal Cycler фирмы Applied Biosystems (США). Специфические праймеры для проведения ПЦР генов *P5CS* и *PDH* конструировали с использованием базы данных Национальной медицинской библиотеки (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) в среде Vector NTI 9.0.0. Для выяснения механизмов защитного действия NO в условиях стресса в качестве донора NO использовали нитропруссид натрия  $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5]\text{NO}$  (SNP); структурным аналогом нитропруссиды, не являющимся донором NO, служил гексацианоферрат калия  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (K<sub>3</sub>-ГЦФ), а в качестве скэвенджера NO использовали (2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethyl-imidazole-1-oxyl-3-oxide) (сРТЮ). **Функционирование Про** в качестве химического шаперона определяли по способности пролина сохранять активность фермента малатдегидрогеназы (МДГ) под воздействием NaCl in vitro. Измерение активности фермента проводили спектрофотометрически при длине волны 340 нм (окисление НАДН), при 30 °С, в 50 мМ Tris буфере (рН 7,3), содержащем 2 мМ щавелевоуксусной кислоты; 0,14 мМ НАДН; 4,5 ед. МДГ Реакция запускалась добавлением МДГ. Измерение активности в отсутствие субстрата проводилось для корректировки спонтанного окисления НАДН. Измеряли активность МДГ в присутствии 100 мМ NaCl и различных концентрациях Про.

Все опыты проводили в трехкратной биологической повторности. Результаты обрабатывали общепринятыми методами статистики (Доспехов, 1985).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

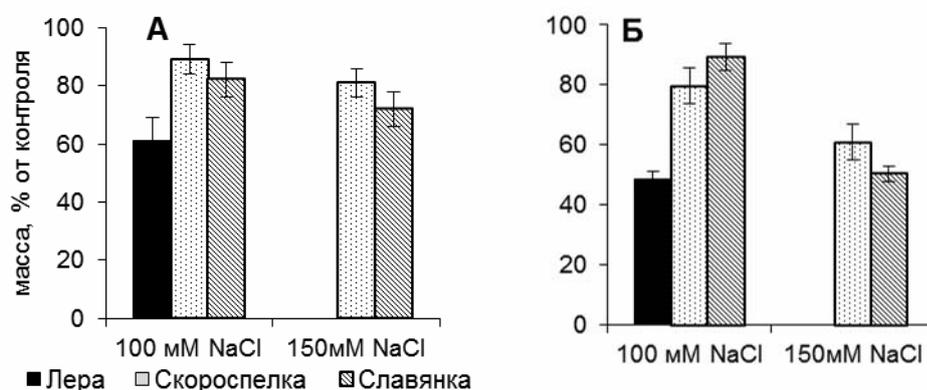
### Изучение устойчивости различных сортов горчицы к хлоридному засолению

Влияние засоления на прорастание и рост корней проростков оценивали с помощью балльной системы, присваивая наименьший балл наибольшему абсолютному значению того или иного показателя и наоборот (рис. 1). Наиболее сильно токсическое действие соли проявилось на проростках с. Лера, у которых сумма негативных баллов достигла максимального значения – 21. Наибольшей устойчивостью отличился с. Славянка (сумма баллов 10), с. Скороспелка и Донской заняли промежуточное положение (сумма баллов 13 и 16,- соответственно).



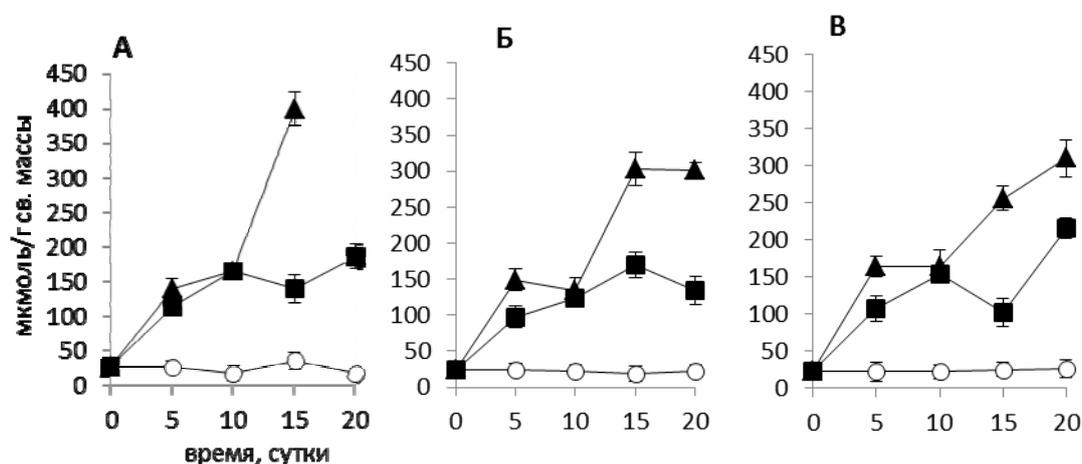
**Рис. 1.** Обобщенный показатель токсического действия засоления на проростки горчицы, баллы

Влияние засоления на биомассу растений проводили на 20-е сутки выращивания растений в питательной среде с добавлением 100 мМ NaCl. Измеряли свежую биомассу листьев и корней (рис. 2-А, Б). По важному физиологическому показателю – биомассе листьев – наилучшие результаты показал с. Скороспелка: при росте на 100 мМ NaCl накопление биомассы снизилось всего на 24,1 %, на 150 мМ – на 33,2%. Сорт Славянка уступал ему около 10 % на каждой концентрации (разница недостоверна). У с. Скороспелка и Славянка при 100 мМ NaCl не было обнаружено достоверного различия по действию засоления на биомассу корней, при высокой концентрации соли биомасса корней снижалась почти наполовину (рис. 2-Б). Значительно сильнее проявилось негативное действие засоления на растениях с. Лера. При концентрации NaCl 100 мМ масса листьев растений этого сорта снизилась на 40% , масса корней – более чем на 50% (рис. 2-А, Б), а при 150 мМ NaCl растения этого сорта погибли на 17-й день опыта.



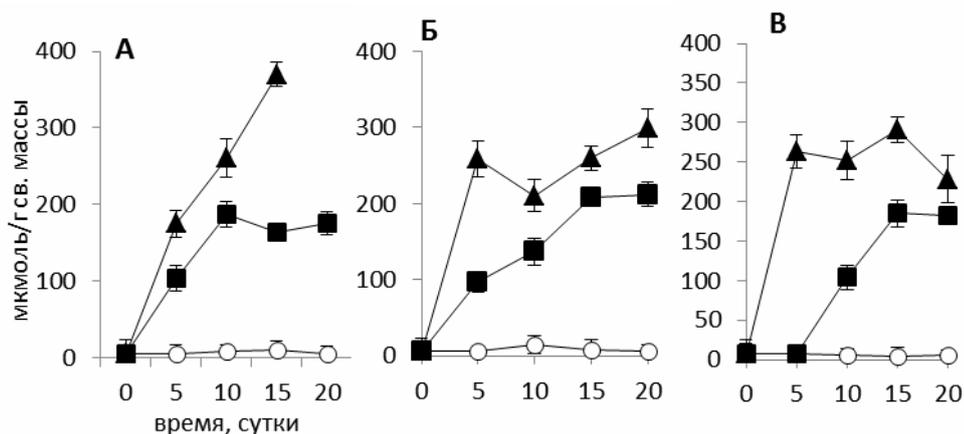
**Рис. 2.** Влияние засоления на биомассу листьев (А) и корней (Б) молодых растений горчицы, % от контроля.

Влияние засоления на содержание  $\text{Na}^+$  в листьях горчицы. Концентрация  $\text{Na}^+$  в листьях контрольных растений составляла  $21,2 \pm 4,5$  мкмоль/г св. массы и не изменялась на протяжении всего опыта (рис. 3). В условиях засоления все сорта показывали интенсивное накопление  $\text{Na}^+$ . Уже на 5-е сутки засоления его концентрация превышала контрольные значения в 5 раз, на 10-е сутки – в 7–8 раз. У растений с. Лера при концентрации  $\text{NaCl}$  150 мМ на 15-е сутки накапливалось до 400 мкмоль/г св. массы, в то время как два других сорта накапливали лишь до 300 мкмоль/г св. массы. У растений с. Славянка при обеих концентрациях  $\text{NaCl}$  после 10 суток воздействия поглощение  $\text{Na}^+$  стабилизировалось. Это характеризует данный сорт, как наиболее способный регулировать поступление  $\text{Na}^+$  при засолении. В листьях с. Скороспелка содержание  $\text{Na}^+$  росло на протяжении всего эксперимента.



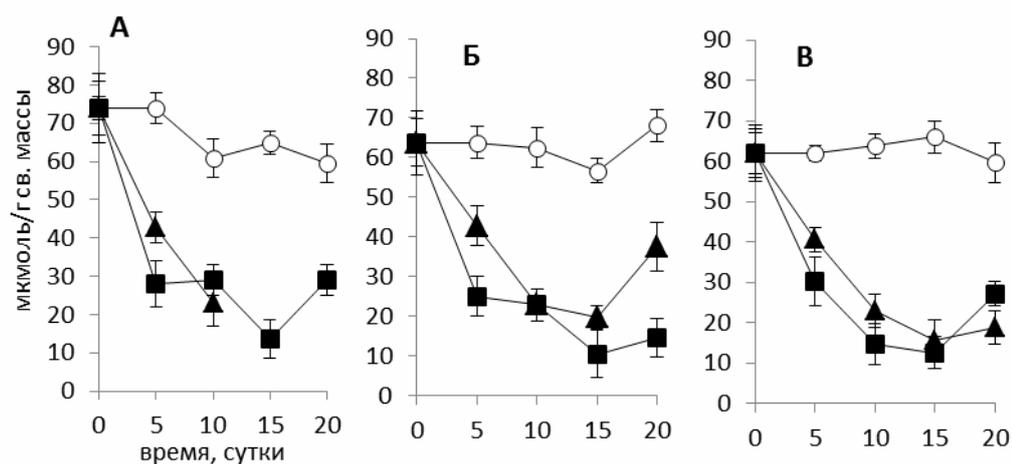
**Рис. 3.** Содержание  $\text{Na}^+$  в листьях растений. Сорт Лера (А), Славянка (Б), Скороспелка (В): ○ – контроль; ■ – 100 мМ  $\text{NaCl}$ ; ▲ – 150 мМ  $\text{NaCl}$

Влияние засоления на содержание  $\text{Cl}^-$  в листьях горчицы. Как и  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  при засолении интенсивно поступал в листья растений всех исследованных сортов (рис. 4). При 100 мМ  $\text{NaCl}$  на 5-е сутки их содержание в 10 раз превышало контрольные значения, а при концентрации  $\text{NaCl}$  150 мМ  $\text{Cl}^-$  – в 25–27 раз. При дальнейшем воздействии у с. Славянка и Скороспелка наблюдалось сокращение скорости поступления ионов хлора. Растения с. Лера при концентрации  $\text{NaCl}$  150 мМ накапливали значительно больше  $\text{Cl}^-$  (до 400 мкмоль/г св. массы) по сравнению с другими сортами, что, вероятно, вместе с накоплением ионов натрия служило одной из причин гибели растений.



**Рис. 4.** Содержание  $\text{Cl}^-$  в листьях растений. Сорт Лера (А), Славянка (Б), Скорospelка (В):  $\circ$  – контроль;  $\blacksquare$  – 100 мМ NaCl;  $\blacktriangle$  – 150 мМ NaCl

Влияние засоления на содержание  $\text{K}^+$  в листьях горчицы. Концентрация калия в норме в растениях горчицы составляла  $70,3 \pm 9,1$  мкмоль/г св. массы. Интенсивное поступление  $\text{Na}^+$  приводило к снижению содержания  $\text{K}^+$ , которое наблюдалось у всех сортов уже на 5-е сутки (рис. 5.). На 15-е сутки засоления у растений всех сортов снижение концентрации  $\text{K}^+$  прекращалось. Вероятно, концентрация 10–15 мкмоль/г св. массы была необходимым минимумом для поддержания жизнедеятельности растений.



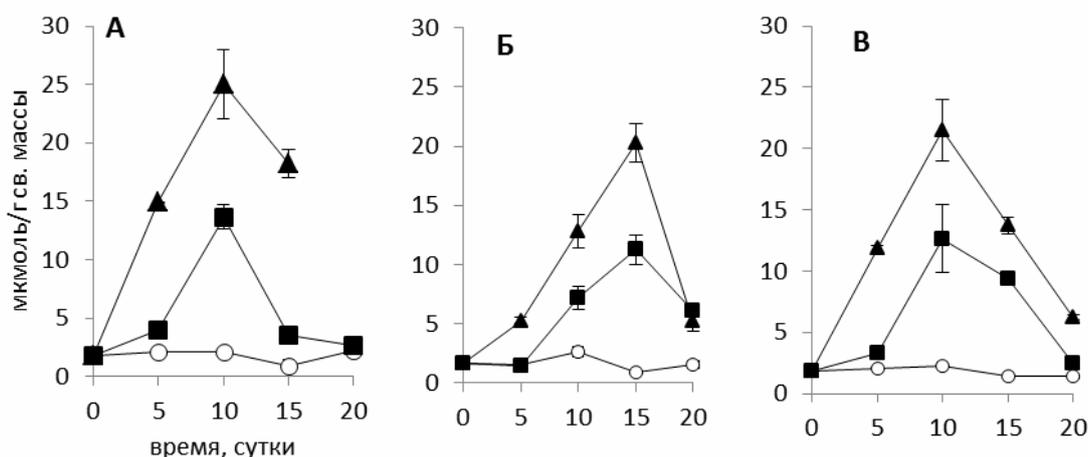
**Рис. 5.** Содержание  $\text{K}^+$  в листьях растений. Сорт Лера (А), Славянка (Б), Скорospelка (В):  $\circ$  – контроль;  $\blacksquare$  – 100 мМ NaCl;  $\blacktriangle$  – 150 мМ NaCl

Влияние засоления на содержание Пролина. В условиях интенсивного накопления  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  в листьях растений представлялось необходимым оценить в них

уровень совместимых (органических) осмолитов. В растениях горчицы основным осмолитом является Про (Arshaf, 2005).

В ответ на засоление происходило быстрое накопление свободного Про в листьях растений всех сортов, и уже на 5-е сутки его содержание превышало исходные значения в 2–8 раз (рис. 6). Наиболее высокая концентрация Про регистрировалась у с. Лера, в листьях растений которого при концентрации NaCl 150 мМ на 5-е сутки Про содержалось в 8 раз больше исходного значения, на 10-е сутки увеличилось еще в 1,8 раза. Это привело к тому, что максимальная концентрация Про у растений этого сорта составляла 25 мкмоль/г свежей массы тканей листьев и была выше соответствующих значений у растений других сортов в 1,2 и в 1,16 раз (для сортов Славянка и Скороспелка, соответственно).

Однако неожиданно на 10–15-е сутки воздействия NaCl содержание Про в листьях растений всех сортов горчицы стало снижаться и к концу опыта (на 20-е сутки) резко падало. У растений с. Лера и Скороспелка при 100 мМ NaCl содержание Про снизилось наиболее резко, в 5 и в 1,8 раза соответственно. В отличие от этих сортов, у растений с. Славянка понижение содержания Про началось позже, на 15-е сутки, и было менее выраженным, превосходя в конце опыта уровень контрольного варианта в 4 раза.

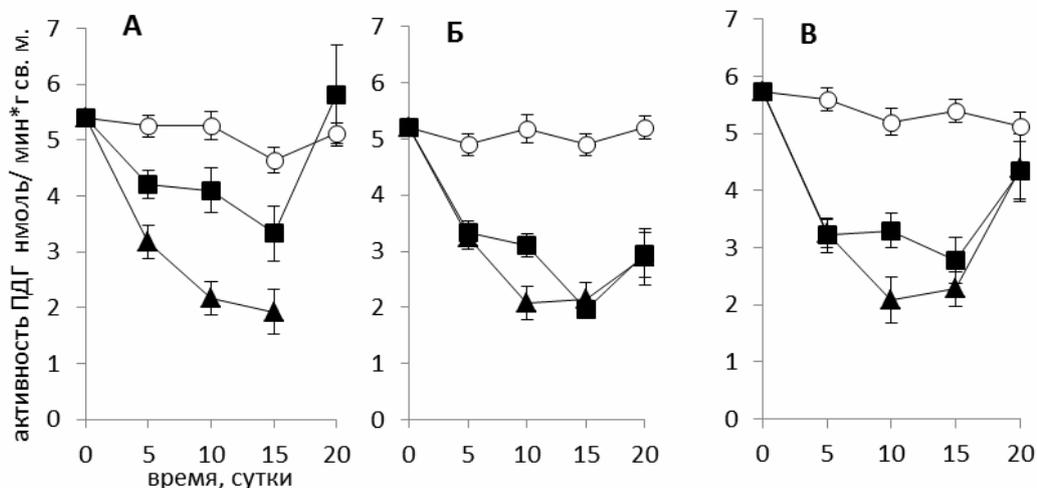


**Рис. 6.** Содержание Про в листьях растений. Сорт Лера (А), Славянка (В), Скороспелка (С): ○ – контроль; ■ – 100 мМ NaCl; ▲ – 150 мМ NaCl

В литературе содержатся немногочисленные факты о снижении Про при засолении, однако это явление до сих пор не обсуждалось (Larher et al., 2003; Yamada et al., 2005). Достоверность сильного, многократного снижения содержания Про в

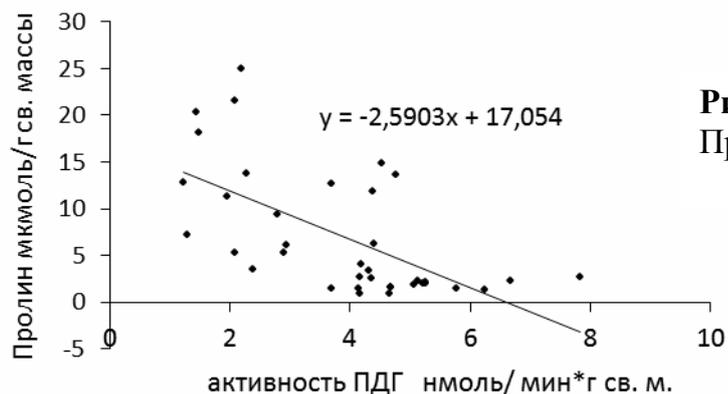
условиях засоления на растениях горчицы была подтверждена нами в нескольких опытах.

Влияние засоления на активность ПДГ. В регуляции содержания Про участвует фермент ПДГ, ответственный за деградацию этой аминокислоты. Измерение активности ПДГ (рис. 7) в листьях растений изученных сортов горчицы, выращенных в отсутствие засоления, показало довольно высокий конститутивный уровень (5-6 нмоль/ мин\*г свежей массы) его активности, но не выявило существенных сортовых различий и не обнаружило значительных изменений в ходе опыта. Активность ПДГ при 150 мМ NaCl на 10-й день воздействия снижалась в листьях растений с. Славянка до 60% от контроля. У с. Скороспелка падение активности было чуть более глубоким, до 65% от контроля, сопровождаемое, как и у с. Славянка, увеличением активности на 20-й день эксперимента. Сильное отличие с. Лера касалось главным образом завершающего периода опыта, в течение которого произошел очень резкий подъем активности ПДГ – до 5,2 нмоль/ мин\*г свежей массы листьев при 100 мМ NaCl в среде (рис. 7А), что даже превышало уровень активности растений контрольного варианта.



**Рис. 7.** Измерение активности фермента ПДГ. Сорт Лера (А), Славянка (В), Скороспелка (С): ○ – контроль; ■ – 100 мМ NaCl; ▲ – 150 мМ NaCl

Сопоставление данных по содержанию Про и активности ключевого фермента его катаболизма показало наличие обратной зависимости между этими параметрами (рис 8), подтверждая тот факт, что в условиях засоления активность ПДГ является важным механизмом регуляции содержания Про в тканях растений горчицы.



У растения горчицы в условиях засоления наблюдали взаимосвязь содержания Про и уровня матричных РНК генов его метаболизма. Исследования проводили на растениях с. Славянка. Содержание мРНК *P5CS* увеличивалась до 5 суток, что совпадало с фазой увеличения концентрации Про. После 5-х суток воздействия NaCl содержание мРНК *P5CS* резко снижалось (рис. 9), на 10-е сутки падение составило 1,8 раз, а на 20-е – достигло уровня контроля, который в течение всего эксперимента проявлял крайне низкую активность. Содержание мРНК *PDH* после 10 суток резко возрастало и увеличивалось на 20-е сутки в 15 раз. Следовательно, падение концентрации Про после 15 суток засоления коррелировало с изменением содержания матричных РНК как фермента синтеза, так и фермента деградации Про.

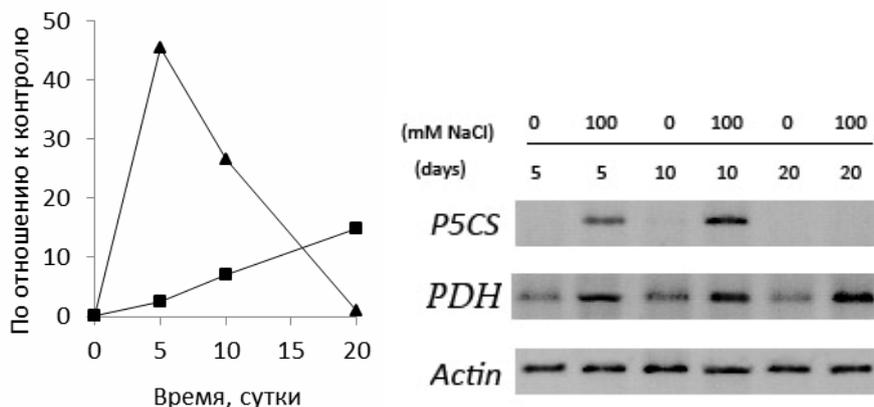


Рис. 9. Содержание мРНК: ▲ – *P5CS*; ■ – *PDH*

Расчет максимальной концентрации Про у горчицы сарептской, в пересчете на объем цитоплазмы (5%), в сопоставлении с суммой концентраций  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  показал соотношение 2/3. У галофитов, по литературным данным (Perera et al., 1997; Ueda et al., 2002), это соотношение было близким к 1.

Таким образом, в процессе сортового анализа было установлено, что с. Лера оказался наименее, а с. Славянка наиболее устойчивым к условиям засоления. Был достоверно установлен факт резкого падения содержания Про при продолжающемся воздействии засоления. Продемонстрирована зависимость между концентрацией Про и активностью ПДГ. Показана зависимость между содержанием Про и содержанием мРНК *P5CS* и *PDH*. Установлено, что даже максимальная концентрация Про в листьях растений при засолении составляла не более 2/3 суммы внутриклеточной концентрации натрия и хлора. Исходя из этого можно заключить, что содержание Про было недостаточным для поддержания осмотического равновесия между цитоплазмой и вакуолью.

Целью следующих этапов работы стало изучение возможной роли Про на разных этапах адаптации растений к условиям засоления. Работа проводилась на растениях с. Славянка. В исследованиях использовали концентрацию NaCl – 100 мМ, которая ингибировала рост растений, но не вызывала их гибели.

### **Изучение возможной роли пролина на разных фазах стрессорного ответа на засоление**

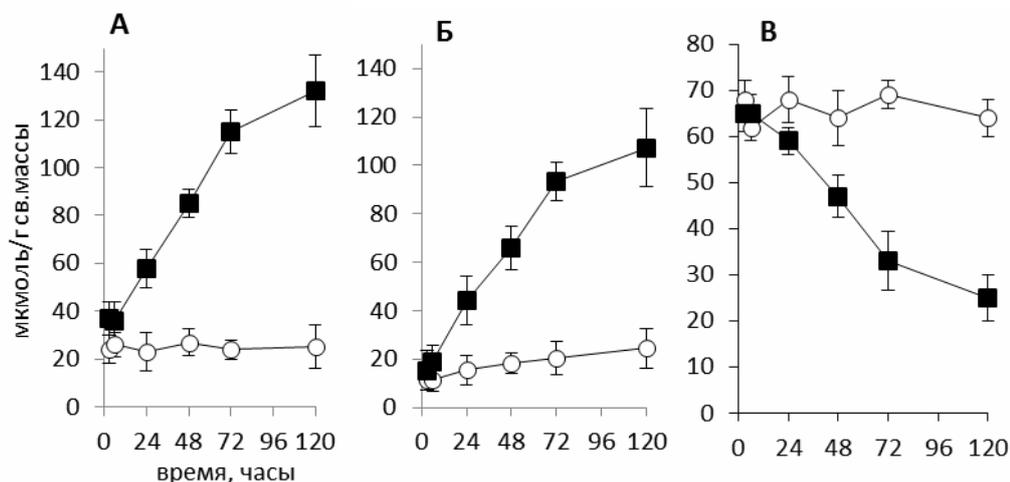
Исходя из принципа дискретности адаптационного процесса, стрессорный ответ растений на засоление мог быть условно разделен на:

- быстрый стрессорный ответ или стресс-реакцию
- этап специализированной, или долговременной адаптации

Помимо этого было изучено поведение растений на этапе восстановления, т.е. при переносе растений, подвергнутых действию NaCl, на среду без избыточного засоления (с 15 по 20 сутки).

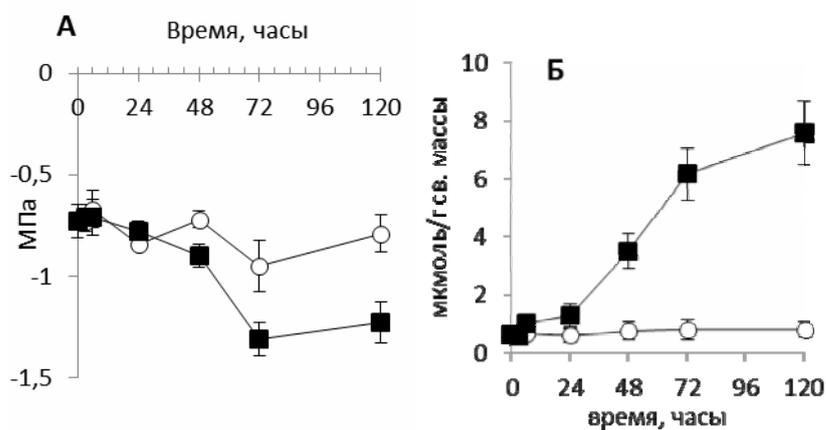
Быстрый стрессорный ответ (стресс-реакция) отчетливо проявлялся в течение первых 5 суток воздействия соли. Засоление приводило к интенсивному поступлению ионов в листья растений. Увеличение содержания ионов натрия и хлора было достоверным уже через 24 часа воздействия, концентрация Na<sup>+</sup> увеличивалась в 2,4 раза, а Cl<sup>-</sup> – в 4 раза (рис. 10-А,Б). Дальнейшее накопление этих ионов имело линейный характер с небольшим замедлением после 3-х суток. На 5-е сутки концентрация Na<sup>+</sup> превышала исходное значение уже в 5,5 раза, а концентрация Cl<sup>-</sup> – в 9,5 раз.

Содержание  $K^+$  (рис. 10-В) при засолении быстро уменьшалось. Достоверное изменение содержания калия регистрировалось на первые сутки воздействия  $NaCl$ , когда падение составляло 12% по отношению к контролю. Дальнейшее уменьшение концентрации калия имело линейный характер и на 5-е сутки содержание  $K^+$  было в 2,6 раза ниже исходных значений.



**Рис. 10.** Содержание  $Na^+$  (А),  $Cl^-$  (Б),  $K^+$  (В) в листьях растений: ○ – контроль; ■ – 100 мМ  $NaCl$

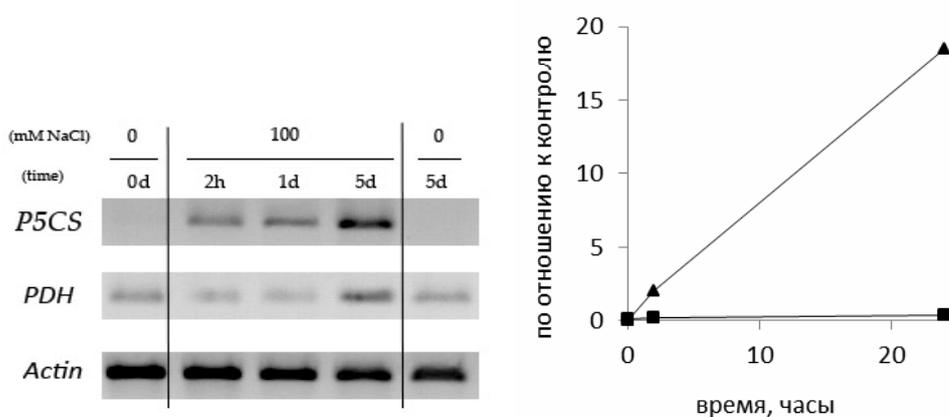
Достоверное понижение осмотического потенциала клетки происходило на 2-е сутки засоления (рис. 11-А). Замедление скорости понижения осмотического потенциала после 3-х суток можно соотнести с небольшим сокращением поглощения ионов на данном отрезке времени.



**Рис. 11.** Изменение осмотического потенциала (А) и содержания Про (Б) в листьях растений: ○ – контроль; ■ – 100 мМ  $NaCl$

Увеличение содержания Про было достоверным на 2-е сутки эксперимента (рис. 11-Б), увеличиваясь более чем втрое по отношению к контролю и продолжая линейно расти до 5 суток воздействия.

Быстрое изменение содержание Про в ответ на засоление позволяло предполагать, что регуляция этого процесса происходит на уровне экспрессии генов метаболизма Про на самых ранних этапах стрессорного ответа. Действительно, изменение содержания мРНК *P5CS* наблюдалось уже в первые часы засоления (рис. 12). На 2-й час содержание мРНК *P5CS* увеличилось вдвое, а на 5-е сутки – почти в 20 раз. Содержание мРНК *PDH* было низким вплоть до 5-х суток, что, очевидно, способствовало интенсивной аккумуляции синтеза Про в ответ на солевой стресс.

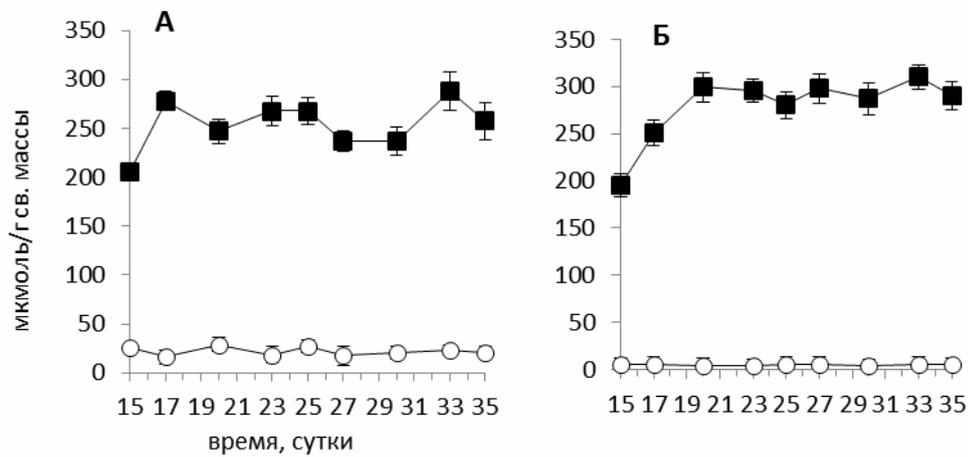


**Рис. 12.** Содержание мРНК: ▲ – *P5CS*; ■ – *PDH*

На ранней стадии засоления хорошо прослеживались корреляции между поступлением неорганических ионов и содержанием Про, что проявлялось в высоких значениях:  $R_{Na^+, Про} = 0,976$ , а  $R_{Cl^-, Про} = 0,978$ . Это показывает, что на раннем этапе воздействия солевого стресса между поступлением ионов и содержанием Про в растениях существовала достоверная прямая зависимость, тогда как между накоплением Про и изменением осмотического потенциала устанавливалась обратная ( $R_{ос.п., Про} = -0,711$ ) зависимость. Исходя из этого, можно предположить, что на ранней стадии засоления Про, хоть и не накапливался в равном соотношении с суммой  $Na^+$  и  $Cl^-$  (65%), все же был ведущим осморегулятором.

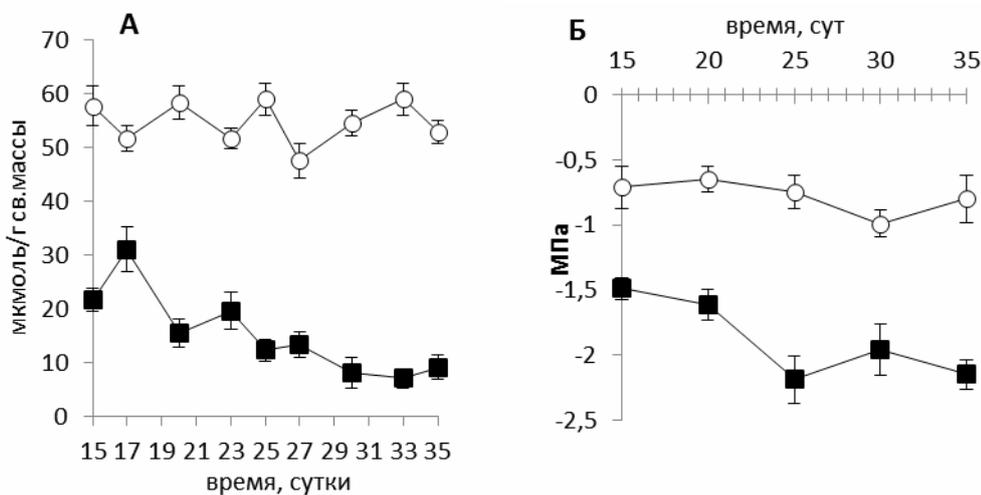
Этап специализированной (долговременной) адаптации характеризуется переходом быстрых кратковременных защитных изменений в долговременные механизмы поддержания жизнедеятельности организма в новых, ранее не пригодных условиях. На данном этапе происходит стабилизация метаболизма и физиологических

функций. У растений горчицы наступление данного этапа наблюдалось на 17–20-е сутки засоления. Так, интенсивное поступление  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  на 17–30-е сутки достигало уровня 300 мкмоль/г св. массы и в дальнейшем не претерпевало значительных изменений (рис. 13-А,Б).



**Рис. 13.** Содержание  $\text{Na}^+$  (А),  $\text{Cl}^-$  (Б) в листьях растений:  $\circ$  – контроль;  $\blacksquare$  – 100 мМ NaCl

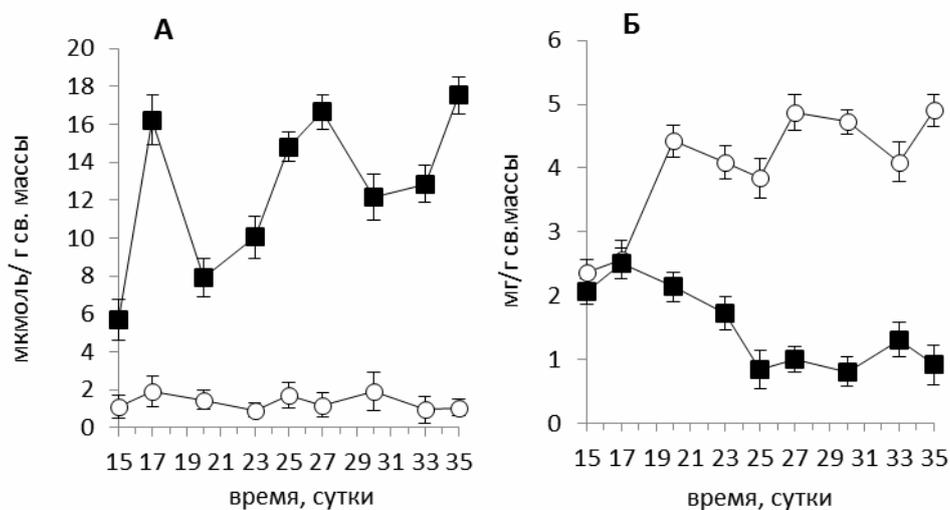
После 20-х суток засоления скорость снижения концентрации  $\text{K}^+$  замедлялась, и содержание устанавливалось на уровне 10 мкмоль/г св. массы (рис. 14-А).



**Рис. 14.** Содержание  $\text{K}^+$  (А), величина осмотического потенциала в листьях растений (Б):  $\circ$  – контроль;  $\blacksquare$  – 100 мМ NaCl

Понижение величины осмотического потенциала в листьях, связанное с поступлением  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$ , прекращалось на 25 сутки засоления на уровне  $2,1 \pm 0,5$  мПа (рис. 14-Б).

При стабилизации  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  и низком осмотическом потенциале можно было ожидать, что Про в листьях будет продолжать сохранять высокие концентрации. Однако после 15 суток засоления происходило резкое падение уровня Про (более чем на 50%) (рис. 15-А). Затем на 23-27 сутки, наблюдалось увеличение концентрации Про, сменяющееся на 30-е сутки падением в 1,5 раза. На 35-е сутки наблюдалось очередное повышение концентрации. Следовательно, изменение содержания Про при длительном засолении имело циклический характер. Следует отметить, что накопление Про в ответ на засоление не было транзиторным, так как его исчезновение не связано с переходом растений в фазу длительного адаптации. Факт падения содержания Про позволяет предположить, что эта аминокислота, не являлась основным осмолитом при длительном засолении. В качестве другого возможного осмолита были изучены сахара (рис. 15-Б). Однако общее содержание сахаров при засолении было даже ниже, чем в контрольном варианте, что не дает возможности говорить об их существенном вкладе в поддержание осмотического равновесия.

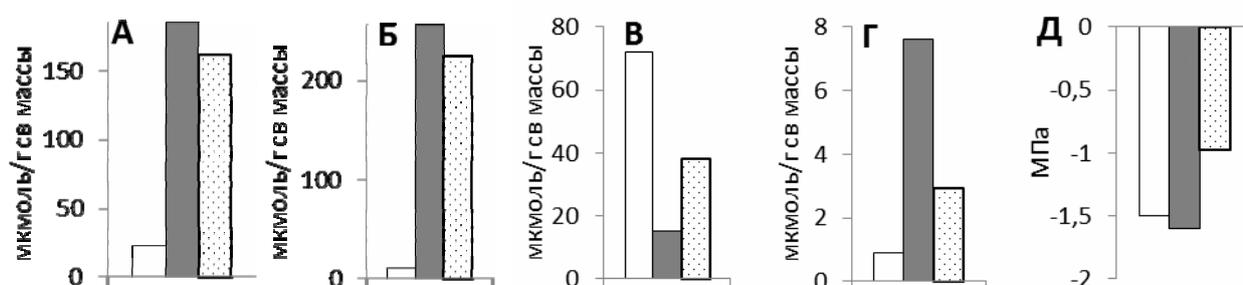


**Рис. 15.** Содержание Про (А), общее содержание сахаров в листьях растений (Б):  
○ – контроль; ■ – 100 мМ NaCl

Корреляции между содержанием  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  с одной стороны, и содержанием Про с другой, на протяжении этапа специализированной адаптации не являлись достоверными ( $R_{\text{Na}^+, \text{Про}} = 0,495$ , а  $R_{\text{Cl}^-, \text{Про}} = 0,614$ ). Коэффициент корреляции между содержанием Про и уровнем осмотического потенциала также был крайне низок ( $-0,112$ ), что говорит об отсутствии взаимосвязи между этими параметрами. Как и на этапе быстрого стрессорного ответа, соотношение концентрации Про в цитоплазме и

суммы ионов натрия и хлора не превышало 66%. Полученные результаты дают возможность предполагать, что концентрация Про была недостаточной для осуществления осморегуляции на стадии специализированной адаптации

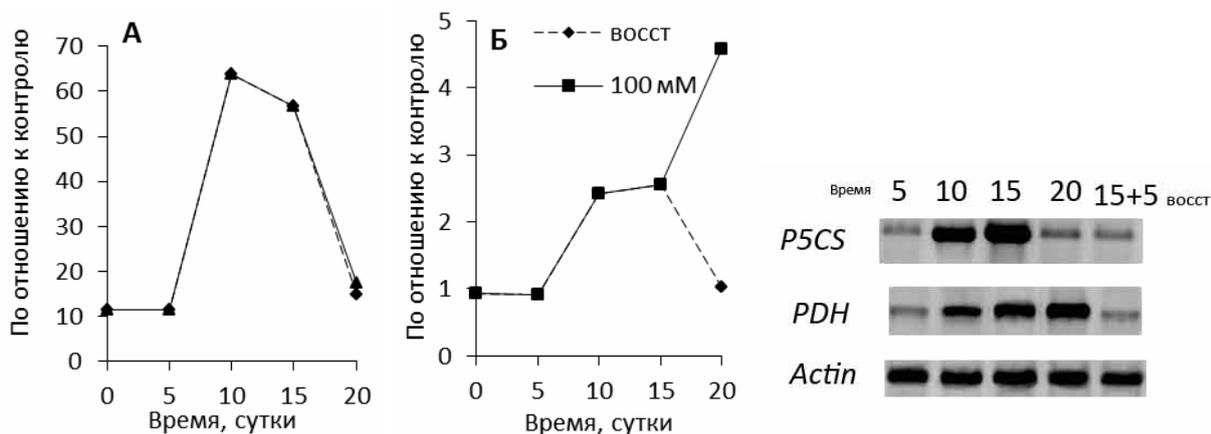
Этап восстановления. Восстановление длилось в течение 5 суток. За данный период наблюдалось незначительное (около 12%) снижение содержания  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  (рис. 16А, Б).



**Рис. 16.** Содержание  $\text{Na}^+$  (А),  $\text{Cl}^-$  (Б),  $\text{K}^+$ , Про (Г) и величина осмотического потенциала (Д) в листьях растений на этапе восстановления: □ – контроль; ■ – 100 мМ NaCl; ▨ – восстановление

**На стадии репарации** практически вдвое восстанавливалась концентрация калия (рис. 16-В), осмотический потенциал увеличился на 67% (рис. 16-Д). Содержание Про при переносе растений на среду без NaCl снижалось и через 5 суток было близким к контрольным значениям (рис. 16-Г). Однако нельзя исключать, что это снижение было продолжением процесса падения, наблюдаемого при засолении на 15-е сутки.

Падение содержания Про при восстановлении совпадало со снижением содержания мРНК *P5CS*, схожее сокращение экспрессии было и при продолжительном засолении (рис. 17-А). Более сложная картина наблюдалась с содержанием мРНК *PDH* (рис. 17-Б). При засолении регистрировалось увеличение содержания мРНК в 2,5 раза на 10-е сутки и еще двукратное увеличение на 20-е сутки. При восстановлении содержание мРНК *PDH* понижалось до уровня контроля. Исходя из этого, можно сделать вывод, что природа падения содержания Про при продолжающемся засолении и при восстановлении имеет разнонаправленный характер и реализуется на уровне ПДГ и кодирующей его мРНК.

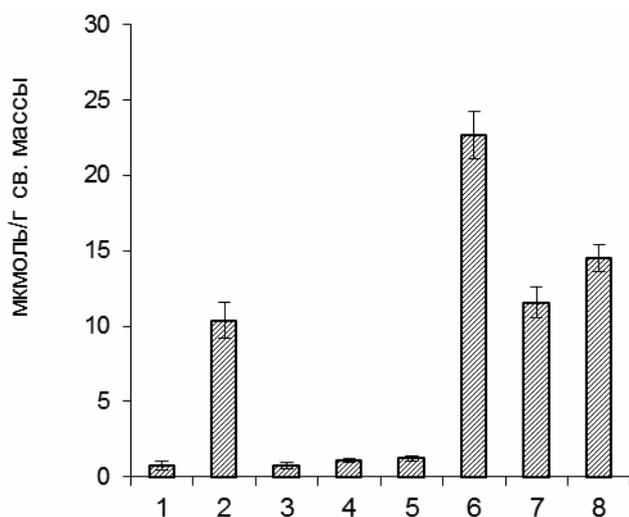


**Рис. 17.** Содержание мРНК: ▲ – *P5CS*; ■ – *PDH*

Корреляции между содержанием  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  и Про была недостоверной ( $R_{\text{Na}^+, \text{Про}} = 0,792$ ;  $R_{\text{Cl}^-, \text{Про}} = 0,626$ ). Зависимость между величиной осмотического потенциала и содержанием Про отсутствовала,  $R_{\text{Na}^+, \text{осм. пот}} = -0,250$ . Полученные данные позволяют заключить, что хотя накопление Про при засолении не соотносилось с осморегуляторной функцией, однако было стрессиндуцируемым и снималось с прекращением действия  $\text{NaCl}$ .

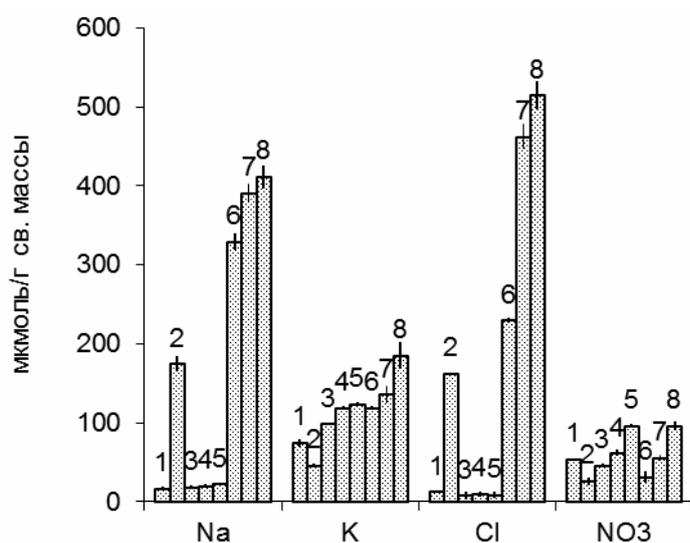
### Регуляция содержания пролина при участии NO

Вопрос о сигнальных молекулах, вовлеченных в регуляцию уровня пролина, остается открытым. В настоящее время в литературе появились данные о регуляции содержания Про при участии оксида азота. В этой связи в листьях растений горчицы, подвергнутых 3-дневному воздействию 100 мМ  $\text{NaCl}$ , а также  $\text{NaCl}$  в определенных сочетаниях с SNP и сРТИО, было проанализировано содержание Про (рис. 18).



**Рис. 18.** Содержание Про в листьях 4-недельных растений горчицы, выращенных на среде Хогланда-Снайдерс (1), при 3-дневном воздействии NaCl 100 мМ (2), SNP 25 мкМ (3), K<sub>3</sub>-ГЦФ 25 мкМ (4), сРТИО 100 мкМ (5), NaCl 100 мМ+SNP 25 мкМ (6), NaCl 100 мМ + K<sub>3</sub>-ГЦФ 25 мкМ (7), NaCl 100 мМ+SNP 25мкМ+ сРТИО 100 мкМ (8)

Полученные результаты показали, что на действие NaCl растения отвечали увеличением концентрации Про с 0,8 мкмоль/г св. массы в листьях контрольного варианта до 10,4 мкмоль, т.е. в 13 раз. Внесение в среду SNP, K<sub>3</sub>-ГЦФ или сРТИО без NaCl сопровождалось небольшими недостоверными изменениями концентрации Про в контрольных растениях. Достоверное влияние NO на аккумуляцию Про проявлялось при совместном действии SNP с 100 мМ NaCl. При этом содержание Про в листьях растений увеличилось в 2,2 раза по сравнению с растениями, подвергнутыми действию NaCl. Однако сРТИО, скэвенджер NO, более чем на 2/3 снижал стимулирующий эффект SNP на аккумуляцию Про при засолении, тогда как K<sub>3</sub>-ГЦФ совместно с NaCl не оказывал достоверного эффекта на уровень свободного Про.



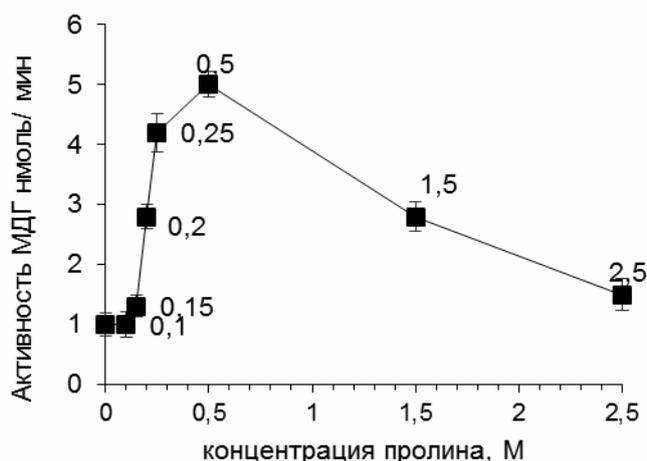
**Рис. 19.** Содержание ионов Na, Cl, K, NO<sub>3</sub> в листьях 4-недельных растений горчицы, выращенных на среде Хогланда – Снайдерс (1), при 3-дневном воздействии NaCl 100 мМ (2), SNP 10 мкМ (3), SNP 25 мкМ (4), SNP 50 мкМ (5), NaCl 100 мМ + SNP 10 мкМ (6), NaCl 100 мМ+ SNP 25 мкМ (7), NaCl 100 мМ + SNP 50

Было установлено, что в листьях молодых растений горчицы концентрация  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$ , увеличившаяся в 7–10 раз за трое суток роста на среде с 100 мМ NaCl, еще более возрастала при воздействии экзогенного NO (рис. 19). Увеличение концентрации  $\text{Na}^+$  при совместном внесении в среду SNP и NaCl зависело от дозы добавленного SNP; максимальный прирост содержания указанных ионов по сравнению с NaCl достигал двукратного значения. При этом SNP в отсутствие соли не изменял содержания  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  в листьях. При засолении концентрация  $\text{K}^+$  в листьях горчицы заметно понижалась, что в целом характерно для гликофитов; в этих условиях еще существеннее падала концентрация  $\text{NO}_3^-$ . В отличие от  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$ , позитивное действие SNP на уровень  $\text{K}^+$  и  $\text{NO}_3^-$  проявлялось не только в условиях засоления, но и при росте на стандартной среде в отсутствие NaCl. В абсолютных величинах эффект SNP мог показаться небольшим, но по сравнению с пониженным уровнем  $\text{K}^+$  и  $\text{NO}_3^-$  при засолении максимальное увеличение концентрации  $\text{K}^+$  под действием SNP достигало 3 раз,  $\text{NO}_3^-$  – 3,7 раза.

Таким образом, впервые было убедительно показано, что экзогенный оксид азота стимулирует NaCl-зависимую аккумуляцию Про. Аккумуляция Про, очевидно, опосредована NO-регулируемым накоплением в клетках неорганических ионов ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) за счет стимуляции функционирования как катионных, так и анионных каналов.

### **Функционирование Про в качестве химического шаперона**

Про является мультифункциональным антистрессорным фактором. Как уже говорилось ранее, в настоящее время в литературе все активнее обсуждается роль Про в качестве химического шаперона. Эта функция особенно важна при засолении, так как высокие концентрации NaCl в клетке ведут к повреждению макромолекул, нарушению ферментативной активности. Полученные данные отсутствия корреляции между осмотическим потенциалом, содержанием ионов и содержанием Про, а также об участии NO в регуляции Про, позволяют говорить о том, что Про при длительном засолении не выполняет осмотической функции. Было предположено и на примере модельных опытов впервые установлено, что Про при засолении способен функционировать в качестве химического шаперона, защищая макромолекулы от повреждения.



**Рис. 20.** Измерение активности МДГ *in vitro*, при засолении

В условиях *in vitro* NaCl сильно (более 50%) ингибировал активность фермента МДГ. Низкие концентрации Про, до 100 мМ, совместно с засолением не оказывали защитного действия на активность фермента. В диапазоне концентраций от 200 до 500 мкМ Про нивелировал негативное действие NaCl (рис. 20). Однако в концентрациях выше 500 мМ Про оказывал отрицательное воздействие на активность МДГ, проявляя при этом четкую концентрационную зависимость. Данный факт позволяет предположить, что падение содержания Про при длительном засолении связано с достижением концентрации, при которой Про нарушает ферментативную активность.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследований было установлено, что содержание NaCl в питательном растворе в концентрациях 100 и 150 мМ вызывало у растений горчицы состояние стресса. Растения по устойчивости к засолению проявляли сортовые различия. Сорт Лера оказался наименее устойчивым, а с. Славянка – наиболее устойчивым к воздействию засоления. Для горчицы как для типичного гликофита, было характерно наличие быстрого транзиторного первичного стрессорного ответа. В ответ на засоление интенсивно накапливался Про, наблюдалось поступление ионов натрия и хлора, происходило снижение осмотического потенциала. Содержание мРНК *P5CS* увеличивалось уже в первые часы засоления, доказывая что синтез Про являлся важным стресс-индуцируемым защитным фактором. В течение 5 суток первичного ответа содержание Про коррелировало с поступлением ионов в листья растений. Это позволяло с высокой долей вероятности утверждать, что Про на данном этапе участвовал в осморегуляторной функции. Однако начиная с 10–15 суток засоления содержание Про в листьях резко падало. При этом его концентрация в

пересчете на объем цитоплазмы составляла всего 1/10 от суммы концентраций ионов натрия и хлора, и была недостаточной для поддержания осмотического равновесия. В ходе специализированной адаптации защитные механизмы стабилизировались, обеспечивая поддержание метаболизма в ранее неблагоприятных условиях. Так, содержание ионов натрия и хлора после 17-20 суток не изменялось, стабилизировался осмотический потенциал, прекратилось снижение концентрации калия. Содержание Про на фоне данной стабилизации претерпевало колебательные изменения. К тому же на этом этапе даже при максимальных концентрациях Про составлял лишь 2/3 суммы концентраций ионов натрия и хлора, что не было достаточным для осуществления осмотической функции. На протяжении всего засоления содержание Про показало четкую взаимозависимость с содержанием мРНК *P5CS* и *PDH*, доказывая регуляцию Про на молекулярном уровне. Активность фермента ПДГ также коррелировала с содержанием Про, свидетельствуя о регуляции на ферментативном уровне. Этап восстановления показал, что регуляция падения содержания Про на молекулярном уровне при длительном засолении отличалась от регуляции при снятии стрессового воздействия. Установленная взаимосвязь содержания Про с влиянием NO при засолении, позволяла предположить, что регуляция уровня Про происходила при участии сигнальных молекул.

Основываясь на результатах модельных опытов с МДГ было предположено, что при засолении Про, находясь в цитоплазме в непосредственной близости с макромолекулами, выполнял функцию химического шаперона. Однако при высоких концентрациях Про негативно влиял на активность ферментов, что, вероятно, становилось сигналом для активации его деградации. Опыты по воздействию NO совместно с NaCl, позволили предположить, что осмотическую функцию в цитоплазме могли выполнять ионы К. Выравнивание осмотического потенциала также могли осуществлять  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$ , негативное действие которых, нивелировалось функционированием Про в качестве химического шаперона.

## ВЫВОДЫ

1. Действие засоления проявлялось на горчице сарептской, как на типичном гликофите, ингибируя рост растений, вызывая осмотический стресс и иницируя реализацию ряда адаптивных стратегий, среди которых – активный синтез Про, обладающего стресс-протекторными свойствами.

2. Выявлены сортовые различия растений горчицы, в основе которых лежала разная способность к регуляции поступления  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  и интенсивность аккумуляции пролина. Сорт Лера оказался наименее устойчивым, а сорт Славянка наиболее устойчивым к воздействию засоления.

3. Впервые достоверно установлено явление резкого падения концентрации Про при длительном засолении, несмотря на стабильное сохранение высокого содержания ионов  $\text{Na}$  и  $\text{Cl}$  в листьях. Достоверность сильного снижения концентрации Про была подтверждена на молекулярном и ферментативном уровне.

4. На протяжении всего действия засоления максимальная концентрация Про в расчете на объем цитоплазмы, составляла не более  $2/3$  а минимальная – не более  $1/10$  от суммарной концентрации ионов  $\text{Na}$  и  $\text{Cl}$ . Судя по величинам корреляции на разных фазах адаптации между содержанием пролина с одной стороны и содержанием ионов  $\text{Na}$ ,  $\text{Cl}$  и величиной осмотического потенциала с другой, Про мог выполнять функцию ведущего совместимого осмолита лишь на этапе стресс-реакции.

5. Впервые показано, что сигнальная функция оксида азота на начальных этапах засоления реализовалась в быстром повышении концентрации  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  и  $\text{K}^+$  в листьях растений горчицы, вероятно, за счет активации ионных каналов, что вызывало дополнительную аккумуляцию Про.

6. На основе модельных опытов впервые установлено, что Про в условиях засоления способен обеспечить поддержание активности фермента МДГ, функционируя в качестве химического шаперона. При этом выравнивание осмотического потенциала основных компартментов клетки – цитозоля и вакуоли – могло осуществляться за счет аккумуляции в цитозоле ионов  $\text{K}$ .

7. Полученные данные позволяют заключить, что в условиях засоления Про у растений горчицы на разных стадиях адаптации и восстановления мог функционировать преимущественно в качестве или совместимого осмолита или химического шаперона.

#### **Список публикаций по теме диссертации**

1. Гринин А. Л., Ралдугина Г.Н., Кузнецов. Вл.В. (2007) Действие хлоридного засоления на прорастание семян и рост проростков ряда сортов горчицы сарептской // Материалы Международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем». Сыктывкар, 2007. – С. 98.

2. Гринин А. Л., Коршунов И.А., Холодова В.П., Ралдугина Г.Н. (2008) Сортовые различия растений горчицы сарептской по устойчивости к повышенным концентрациям солей меди // Материалы международной научной конференции «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений». Екатеринбург, 2008 - С. 152-153.
3. Гринин А. Л. Башмакова Е.Б., Холодова В.П. (2009) Возможные функции пролина на разных стадиях адаптации растений горчицы сарептской к засолению // Материалы международной конференции «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего севера». Апатиты, 2009. - С. 103 – 104
4. Гринин А. Л., Холодова В.П., Велисар С.Г., Волков К.С., Зарипова Н.Р., Коршунов И.А., Лисник С.С., Стеценко Л.А., Кузнецов Вл.В. (2009) Скрининг растений с целью подбора форм, перспективных для фиторемедиации загрязненных солями меди почв // Материалы Международной конференции «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего севера». Апатиты, 2009. С. 347 – 349.
5. Гринин А. Л., Холодова В.П., Иванова Е.М., Волков К.С., Кузнецов Вл.В. (2009) Участие металлотIONEИНОВ в детоксикации меди и цинка в растениях // Материалы Международной конференции «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего севера». Апатиты, 2009. С. 349 – 350.
6. Kuznetsov V.I.V., Ivanova E.M., Volkov K.S., Grinin A.L., Kholodova V.P. Metallothionein participation in copper and zinc detoxification in plants. FESPB Congress, 2008.
7. Гринин А.Л., Холодова В.П., Кузнецов Вл.В. (2010) Сравнительный анализ физиологических механизмов солеустойчивости различных сортов горчицы. *Вестник Российского университета дружбы народов, серия «Агронимия и животноводство»* №1 2010 С. 27– 38.
8. Гринин А.Л., Холодова В.П., Башмакова Е.Б., Мещеряков А.Б., Кузнецов Вл.В. (2010) Оксид азота предотвращает ингибирование роста растений горчицы при засолении путем усиления поглощения неорганических ионов // *Доклады РАН*. В печати.