

На правах рукописи



Карташов Александр Валерьевич

**Значение морфофизиологических особенностей растений
подорожника большого и подорожника приморского
для поддержания водно-солевого баланса при засолении**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Радюкина Наталия Львовна

Официальные оппоненты:

Балнокин Юрий Владимирович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, лаборатория солевого обмена и солеустойчивости, заведующий лабораторией.

Пильщикова Наталия Владимировна, кандидат биологических наук, доцент, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, кафедра физиологии растений, доцент.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Вологодский государственный педагогический университет, естественно-географический факультет.

Защита состоится «22» января 2013 г. в 11:00 ч. на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 002.210.01 по специальности 03.01.05 – “Физиология и биохимия растений” (Биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: (499) 977-80-18, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук.

Автореферат разослан « 21 » декабря 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Глобальные климатические изменения и усиление антропогенной нагрузки делают засоление почв экономической и экологической проблемой многих стран. В условиях высокой потребности в сельскохозяйственной продукции, снижения качества и доступности плодородных земель, изучение устойчивости растений к засолению становится особо важным направлением в современной физиологии растений.

Растения – галофиты не обладают значительной биохимической устойчивостью к высоким концентрациям солей, то есть их белки также легко теряют свои свойства при увеличении концентрации NaCl, как и у гликофитов (Osmond, Greenway, 1972; Greenway, Osmond, 1972; Richharia *et al.*, 1997). Высокая чувствительность макромолекул к нарушению ионного состава цитоплазмы клеток, делает противостояние дефициту воды и токсическому действию избытка ионов главными условиями выживания любого растения при действии засоления (Chinnusamy, Zhu, 2003). Данные особенности определяют важность изучения молекулярных и физиологических механизмов поддержания водного и ионного гомеостаза в растениях при засолении. Исследования в этом направлении установили важность совместимых осмолитов и белков водных каналов растений (аквапоринов) для поддержания осмотического баланса и транспорта воды в клетках (Kuznetsov, Shevyakova, 2010; Maurel *et al.*, 2008). При изучении процессов поглощения, транспорта и компартментации избыточных ионов были установлены функции транспортных белков, таких как Na⁺/H⁺-антипортеры (Shi *et al.*, 2000; Blumwald *et al.*, 2000), Cl⁻/H⁺-антипортеры (Isayenkov *et al.*, 2010; Mian *et al.*, 2011), H⁺-АТФазы (Fuglsang *et al.*, 2011; Kluge *et al.*, 2003) и др., а также механизмы их регуляции в растительной клетке (Zhu, 2003; Janicka-Russak, 2011; Conde *et al.*, 2011). Исходя из того, что функционирование всех этих механизмов обнаружено как у устойчивых, так и у неустойчивых видов, многие исследователи считают, что основное отличие галофитов от остальных растений следует искать именно в принципах регуляции этих защитных механизмов при засолении. Определенные успехи в этом направлении достигнуты благодаря сравнительному изучению контрастных по устой-

чивости представителей одного семейства, рода или даже вида, что значительно облегчает выявление различий у генетически близких объектов (Inan *et al.*, 2004). В связи с этим, продолжается поиск новых модельных объектов, которые позволят более детально раскрыть различия в регуляции адаптационного процесса (Amtmann *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2012; Reginato *et al.*, 2012).

С этой точки зрения, можно считать перспективным изучение растений из рода *Plantago*, которые существенно различаются по экологической валентности. Значительный научный интерес к представителям рода *Plantago* объясняется большим морфологическим разнообразием этих растений, их экологической «пластичностью» и высокой лекарственной ценностью. Различные виды подорожников используются в качестве модельных объектов для сравнительного анализа особенностей адаптации растений к неблагоприятным условиям внешней среды, в том числе и к засолению (Шипунов, 1998). Наиболее популярными видами для физиологов стали подорожник большой, подорожник средний, подорожник приморский и подорожник толстолистный (Ahmad *et al.*, 1979; Konigshofer, 1983; Pommerrenig *et al.*, 2006; Nadwodnik, Lohaus, 2008; Beara *et al.*, 2009; Reidel *et al.*, 2009; Sekmen *et al.*, 2007; Vicente *et al.*, 2004; Boscaiu *et al.*, 2005; Gil *et al.*, 2011 и др.). В некоторых исследованиях представителей рода *Plantago* делается вывод о важности механизмов, участвующих в обеспечении водного и ионного гомеостаза у галофитных подорожников для их адаптации и выживания в условиях засоления.

Цель и задачи исследования. Цель работы заключалась в изучении влияния хлоридного засоления на водный и ионный гомеостаз двух видов подорожника: гликофита – подорожника большого (*Plantago major* L.) и галофита – подорожника приморского (*Plantago maritima* L.) и выявлении механизмов, определяющих различие в устойчивости данных видов растений к солевому стрессу.

Задачи исследования:

1. Выявить различия анатомо-морфологического строения растений подорожников, важные для поддержания водного и ионного гомеостаза в условиях засоления.

2. Исследовать влияние хлорида натрия в различных концентрациях в питательной среде на осмотический потенциал, содержание воды, натрия и калия в листьях исследуемых растений.

3. Изучить динамику показателей водного режима, содержания ионов натрия, хлора и совместимых осмолитов в листьях исследуемых растений при засолении и в последующий восстановительный период.

4. Исследовать влияние засоления на уровень перекисного окисления липидов мембран и антиоксидантной способности экстрактов из листьев подорожников – как показателей антиоксидантного статуса растений.

5. Выяснить влияние продолжительного засоления на активности H^+ -АТФазы и Na^+/H^+ -антипортера в плазмалемме из корней и листьев подорожников большого и приморского.

Научная новизна. В работе впервые проведено комплексное сравнительное исследование действия засоления на растения подорожника большого и подорожника приморского. Дана оценка вклада защитных механизмов в солеустойчивость исследуемых растений на уровне их морфологии и физиологии. Получены новые данные о динамике важнейших физиологических процессов, вовлеченных в обеспечение водно-ионного гомеостаза у подорожников, различающихся устойчивостью к засолению. В частности, показана способность подорожника приморского противостоять развитию водного дефицита, а также наличие у этого вида строгого контроля содержания ионов натрия в листьях. Впервые сделаны выводы об отличии восстановительного процесса подорожников. После снятия засоления контрастные по устойчивости подорожники большой и приморский имели различную динамику маркерных биохимических показателей. Возврат осмотического потенциала клеток, содержания натрия и сорбита к контрольным значениям у листьев подорожника большого проходил медленнее и не всегда полностью, в отличие от подорожника приморского, который отличался большей регенерационной способностью и быстрее восстанавливался после действия засоления. В работе впервые охарактеризовано влияние засоления на активность транспорта H^+ и Na^+ в плазматических мембранах из листьев и корней исследуемых растений.

дуемых видов подорожника. Показано, что наблюдаемые изменения могут быть частью адаптационной стратегии подорожников большого и приморского, заключающейся в разной способности к ограничению транспорта ионов Na^+ в побеги при действии засоления.

Практическая значимость. Полученные данные о различии защитных механизмов галофитного и гликофитного видов подорожников в ответ на действие засоления расширяют представления о процессах адаптации растений к действию неблагоприятных факторов среды. Результаты настоящего исследования могут быть использованы в практике растениеводства, а теоретические обобщения в курсах лекций для студентов биологических специальностей.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на VI Международной конференции молодых учёных «Леса Евразии – Венгерский лес» (Венгрия, Шопрон, 2006); VII Международной конференции молодых учёных «Леса Евразии – Русский север» (Петрозаводск, 2007); VI Съезде ОФР «Современная физиология растений: от молекул до экосистем» (Сыктывкар, 2007 г.); VII съезде ОФР «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (Нижний Новгород, 2011); XI Международной конференции молодых учёных «Леса Евразии – Брянский лес» (Брянск, 2011); Всероссийском симпозиуме «Экология мегаполисов: фундаментальные основы и инновационные технологии» (Москва, 2011); X Международной конференции молодых учёных «Леса Евразии – Белорусское поозерье» (Белоруссия, Браслав, 2012).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, из которых 3 – статьи в рецензируемых журналах.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Материалы диссертации изложены на 123 страницах машинописного текста и содержат 5 таблиц и 33 рисунка. Список цитируемой литературы включает 250 наименований, в т.ч. 232 иностранных.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследований использовали два вида подорожников (семейство *Plantaginaceae* Juss.): гликофит подорожник большой (*Plantago major* L.) и галофит подорожник приморский (*Plantago maritima* L.). Подорожник большой – многолетнее травянистое растение высотой 15-50 см с широким ареалом обитания. Семена подорожника большого любезно предоставлены Проблемной лабораторией ФГБОУ Брянской государственной инженерно-технологической академии (Россия). Подорожник приморский – многолетнее травянистое растение, населяет морские берега, солонцы, солончаки. Семена подорожника приморского любезно предоставлены из коллекции Полярно-альпийского ботанического сада-института им. Н.А. Аврорина КНЦ РАН.

Перед посевом семена стерилизовали 5 минут в 13%-ном растворе перекиси водорода в этаноле и высевали в перлит, увлажненный дистиллированной водой. Начиная с двух недель, растения выращивали в водной культуре в условиях фитотрона при минеральном питании по Кнопу и с микроэлементами по Хогланду (pH = 6,0) с 12 часовым световым периодом под люминесцентными лампами Osram Lumilux L36W/840 (Osram, Германия) при интенсивности светового потока в диапазоне ФАР 300 ± 30 мкмоль/м²·с⁻¹ и при температуре воздуха $25 \pm 3^\circ$ С днем и $20 \pm 3^\circ$ С ночью.

Условия проведения опытов. Эксперименты по засолению проводили на 6-недельных растениях. Для этого в питательный раствор вносили NaCl до достижения концентрации 0, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 мМ. Исследование влияния NaCl в различных концентрациях на растения подорожники выращивали в течение трех суток. Отбор проб листьев растений производили однократно в конце эксперимента. Изучение динамики физиологических показателей (водный режим, содержание натрия, хлора, совместимых осмолитов, уровень перекисного окисления липидов мембран и антиоксидантная способность экстрактов растений) проводили при засолении 300 мМ NaCl. Длительность эксперимента составляла шесть суток. Первые трое суток растения выращивались в присутствии 300 мМ NaCl, затем их переносили на нормальный питательный раствор (без NaCl) и выращивали еще в течение трех суток.

Отбор проб листьев производили каждые 24 часа. Исследование стресс-зависимых изменений активности H^+ -АТФаз и Na^+/H^+ антипортеров мембран плазмалеммы использовали засоление 100 мМ NaCl в течение 7 суток. Отбор проб листьев и корней производили однократно в конце эксперимента. В зависимости от назначения пробы листьев или корней использовали в свежем виде или фиксировали жидким азотом и хранили при температуре $-70^{\circ}C$.

Проведение анатомо-морфологических исследований. Определение общей проективной площади листьев с использованием изображений сканированных свежих листьев подорожников выполняли в программе ArcGIS (Esri, США) 10.1. Показатель склерофильности вычисляли как отношение сухой массы листьев одного растения к их общей проективной площади.

Для подсчета плотности расположения устьиц на листьях растений использовали метод «мгновенных реплик» эпидермиса, полученных с использованием бесцветного лака на основе полиметилметакрилата. Подсчет количества устьиц проводили под световым микроскопом с использованием объект-микрометра.

Для изучения анатомии листьев готовили временные препараты их поперечных срезов. Препараты исследовали под световым микроскопом Imager D1 (Carl Zeiss, Германия) с цифровой фотонасадкой.

Водопоглощающую способность листьев определяли по приросту массы (в процентах от исходной массы) отделенных листьев растений, помещенных в деионизованную воду и выдержанных в насыщенном парами воды камере в течение 24 часов.

Осмотический потенциал клеточного экссудата определяли на криоскопическом осмометре Osmomat 030 (Gonotec, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Клеточный экссудат выжимали из размороженных образцов листьев растений.

Определение содержания Na, K и Cl в листьях. Анализ содержания натрия и калия в образцах, подготовленных методом мокрого озоления, проводили на атомно-адсорбционном спектрофотометре Hitachi 207 (Hitachi, Япония). Содержание ионов

хлора определяли в водных экстрактах из листьев потенциметрическим методом на потенциометре Expandable ionAnalyzer EA 940 (Orion Research, США) с использованием комбинированного хлоридного электрода 96-17-00 (Orion Research, США).

Анализ растворимых углеводов и сахароспиртов в водных экстрактах из листьев растений проводили совместно с лабораторией механизмов роста растительных клеток Казанского института биохимии и биофизики КНЦ РАН (зав. лаб.-д.б.н., проф. Горшкова Т.А.). Разделение и идентификацию свободных углеводов и сахароспиртов в препаратах проводили при помощи высокоэффективной анионообменной хроматографии в системе DX-500 (Dionex, США) на колонке CarboPac PA-1, 4x250 мм (Dionex, США) с использованием пульс-амперометрического детектора ED 40 (Dionex, США) (Gurjanov *et al.*, 2007; Микшина и др., 2009).

Определение содержания сорбита в листьях растений. Анализ сорбита в водных, депротеинизированных экстрактах из листьев растений выполняли ферментативным методом с использованием набора KSORB02/04 (Megazyme, Ирландия) в соответствии с инструкцией производителя.

Определение содержания свободного пролина в листьях растений проводили по методу Bates с соавт. (Bates *et al.*, 1973).

Оценка содержания МДА в листьях растений. Содержание МДА оценивали спектрофотометрическим методом, основанном на образовании окрашенного комплекса МДА с тиобарбитуровой кислотой при нагревании (Buege, Aust, 1978).

Активность низкомолекулярных антиоксидантов в этанольных экстрактах из листьев растений оценивали по способности их обезвреживать катион-радикал АВТС^{•+} (2,2'-азинобис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты)) по методу, адаптированному для растительного материала (Re *et al.*, 1999), и выражали в эквивалентном количестве вещества Тролокса – ТЕАС (Trolox equivalent antioxidant capacity).

Выделение, очистку и исследование мембран плазмалеммы проводили совместно с лабораторией мембран растительных клеток ИФР РАН (зав. лаб.-д.б.н., Трофимова М.С.). Препараты плазмалеммы получали методом разделения микросо-

мальных мембран в водной двухфазной полимерной системе (Трофимова и др., 2011).

Определение содержания белка в препаратах мембран. Содержание белка в препаратах определяли по методу Bradford (Bradford, 1976).

Определение АТФазной активности плазмалеммы. Активность H^+ -АТФаз оценивали спектрофотометрически при 340 нм по количеству окисленного НАДН в сопряженной АТФ-регенерирующей системе (Palmgren, 1990).

Определение АТФ-зависимой H^+ -транслоцирующей активности и оценка скорости Na^+/H^+ обмена мембран плазмалеммы. H^+ -транслоцирующую активность определяли по скорости генерации ΔpH инвертированными везикулами, который регистрировали по изменению оптической плотности среды в присутствии индикатора ΔpH – акридинового оранжевого (Palmgren, 1990). Для оценки скорости Na^+/H^+ обмена сравнивали H^+ -транслоцирующую активность везикул при наличии и в отсутствие ионов Na^+ .

Представленные данные являются результатом трех независимых экспериментов и получены не менее чем в 3-кратной биологической и аналитической повторностях. Результаты, представляющие собою малые выборочные совокупности, обрабатывали статистически в среде Microsoft Excel 2007 и выражали как среднюю арифметическую величину \pm основная ошибка средней величины.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Анатомо-морфологическая характеристика побегов подорожников

Основным физиологическим процессом, при котором растения расходуют воду, является транспирация (Kramer, Boyer, 1995). По этой причине, многие растения галофиты обладают малой площадью и большой толщиной листьев, что позволяет не только экономить воду, но и запасать ее в тканях. Для количественной оценки различий в строении листьев двух видов подорожника была определена общая проективная площадь их листьев и вычислен показатель склерофильности (ПС), позволяющий оценивать толщину листьев растений (табл. 1) и выражающейся как отношение сухой массы листа к площади его поверхности. Суммарная проективная площадь поверхности листьев подорожника большого была в 3,5 раза больше, чем таковая у подорож-

ника приморского. Листья подорожника приморского имели большую сухую массу на единицу проективной площади, что характеризует их как более суккулентные. Листья подорожника большого, напротив, отличались меньшим значением ПС, что указывало на их большую склерофильность.

Таблица 1 – Общая площадь листьев растений и показатель склерофильности

Вид подорожника	Среднее значение сухой массы листьев, г	Среднее значение общей проективной площади листьев, см ²	Показатель склерофильности, кг/м ²
П. большой	0,5530 ± 0,0898	171,18 ± 22,250	0,031 ± 0,0011
П. приморский	0,2312 ± 0,0328	48,08 ± 6,550	0,048 ± 0,0013

Для количественной оценки плотности расположения устьиц – важного морфологического признака, суккулентности или ксероморфности растения - были получены и проанализированы реплики эпидермиса поверхностей листьев контрольных растений подорожников. У листьев подорожника приморского число устьиц на квадратный миллиметр было в 1,6 раза выше, чем у П. большого (табл. 2).

Таблица 2 – Плотность расположения устьиц на листьях подорожников

Вид подорожника	Адаксиальная сторона листа, шт/мм ²	Абаксиальная сторона листа, шт/мм ²
П. большой	135±13,8	133±8,0
П. приморский	222±32,5	214±27,0

Анатомическое строение листа подорожника большого (рис. 2А) в целом было типично для травянистых растений. Через лист проходило 7 главных жилок с одним коллатеральным проводящим пучком (рис. 2Б). Листья подорожника приморского характеризовались изолатеральным строением (рис. 2В). Центральное положение в листе занимала водозапасающая паренхима. Наличие водозапасающих тканей считается признаком суккулентности. Некоторые авторы определяют подорожник приморский как суккулентный эугалофит (Breckle, 2002; Османова, 2009). Однако суккулентность подорожника приморского может быть связана не столько с приспособлением к засухе, сколько с необходимостью депонирования избытка солей при засолении. Более того, с учетом плотности расположения устьиц, нельзя говорить о классической суккулентной организации листа подорожника приморского, т.к. у классических суккулентов минимальная плотность расположения устьиц составляет 3 – 93 шт./мм², а у не

суккулентных растений – 82 – 222 шт./мм² (von Willert *et al.*, 1992). Размер проводящих пучков в листьях подорожника приморского был меньше, чем у подорожника большого, однако общее число самих пучков было выше.

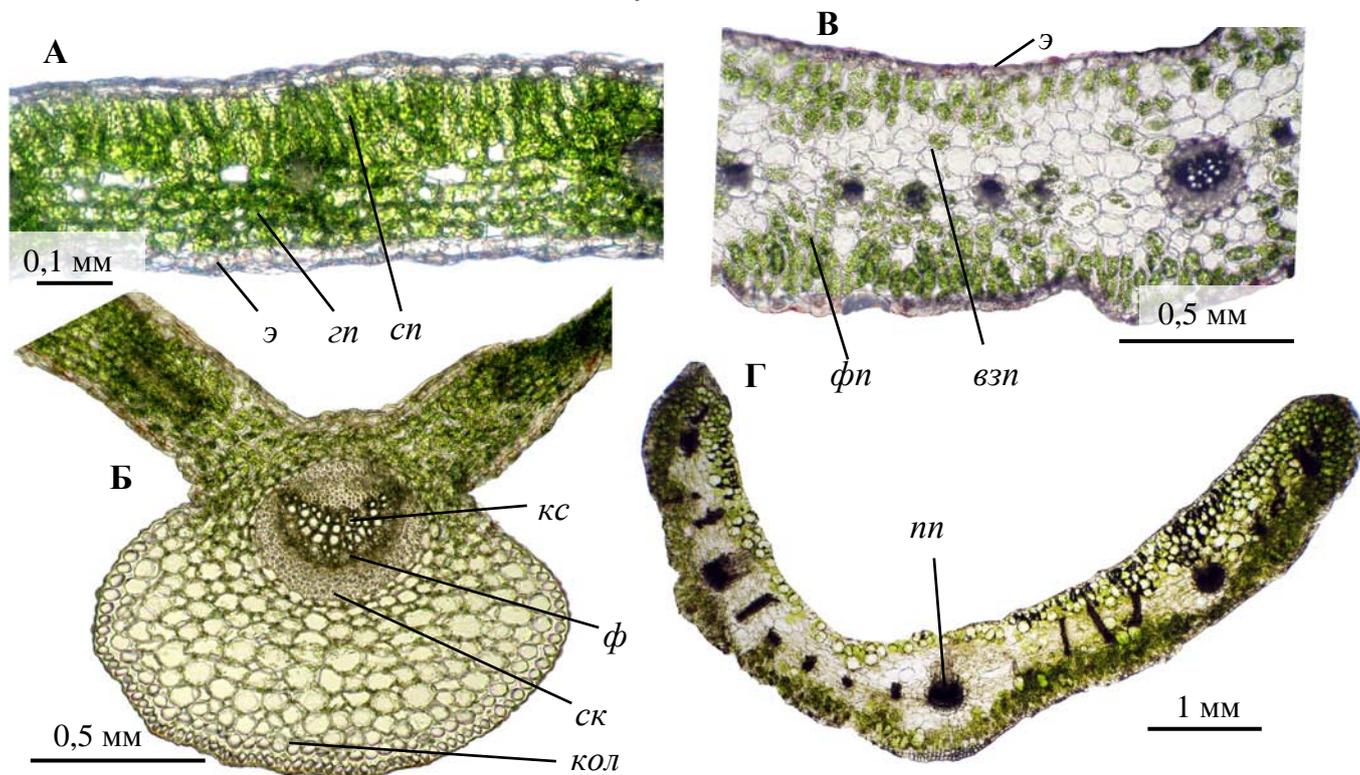


Рисунок 2 – Анатомическое строение листьев подорожника большого (А-Б) и подорожника приморского (В-Г): А – фрагмент мезофилла листа, Б – срез через центральную жилку листа, В – фрагмент мезофилла листа, Г – общий план среза.

взп – водозапасающая паренхима; *гп* – губчатая паренхима; *кол* – колленхима; *кк* – ксилема; *пп* – проводящий пучок; *ск* – склеренхима; *сп* – столбчатая (палисадная) паренхима; *фп* – фотосинтезирующая паренхима; *э* – эпидерма; *ф* – флоэма.

2. Оценка устойчивости растений подорожников к хлоридному засолению

Подорожники различались по степени выраженности реакции на присутствие NaCl в концентрациях от 50 до 500 мМ в питательной среде. Подорожник большой начинал терять тургор при действии 100 мМ NaCl, в отличие от подорожника приморского, у которого визуально наблюдаемая реакция на засоление начиналась при концентрациях NaCl более 200 мМ. Поскольку реакция растений на NaCl связана с нарушением водного баланса и токсическим действием ионов натрия, было важно определить содержание воды, осмотический потенциал и содержание ионов натрия в листьях исследуемых растений при действии NaCl в различной концентрации.

В листьях подорожника большого снижение содержания воды сильно зависело от концентрации NaCl в среде (рис. 3а). В листьях подорожника приморского, имев-

ших конститутивно бóльшую оводненность, потери воды при максимальной концентрации NaCl не превышали 9% от исходного ее содержания и были менее значительными, чем у подорожника большого.

Осмотический потенциал клеточного экссудата листьев сильнее понижался у подорожника большого, и при засолении от 200 до 500 мМ NaCl был в 4-5 раз ниже, чем у контрольных растений. Значения осмотического потенциала для подорожника приморского, наоборот, были близки к осмотическому потенциалу питательного раствора во всех опытных вариантах, и были ниже его, в среднем, на -0,4 МПа (рис. 3б).

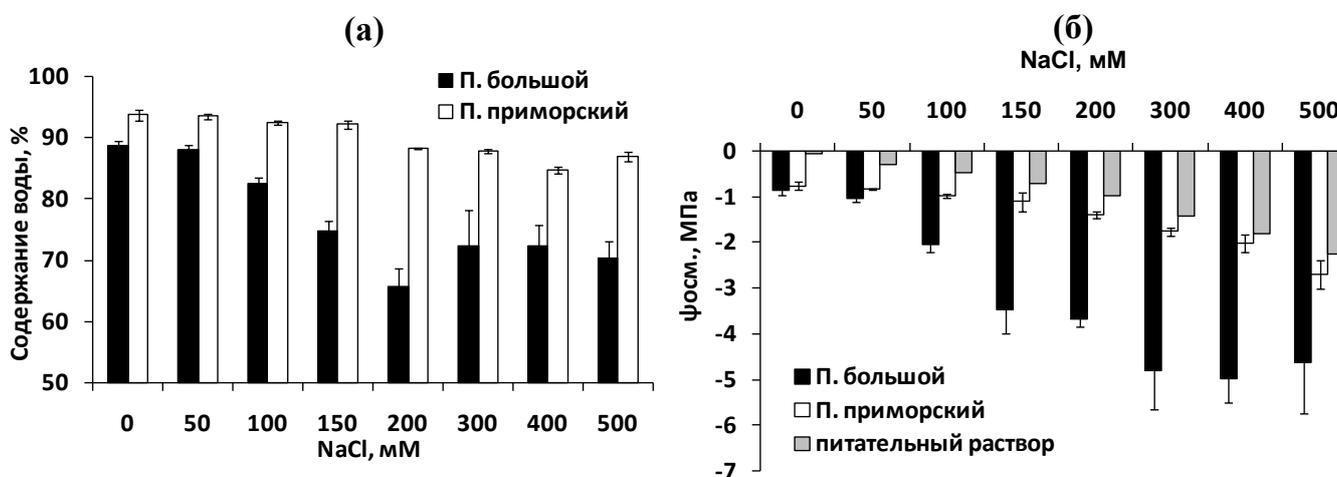


Рисунок 3 – Содержание воды (а) и осмотический потенциал (б) в листьях растений на трети сутки действия NaCl в различных концентрациях.

Значительное снижение осмотического потенциала и увеличивающийся осмотический градиент между растением и средой не приводили к усилению поступления воды в листья подорожника большого. Вместе с этим, способность отделенных листьев подорожника большого к поглощению воды не утрачивалась при засолении и была сопоставима с водопоглощающей способностью листьев подорожника приморского. Можно предполагать, что, вызванное засолением, нарушение поступления воды в листья подорожника большого связано с повреждением корневой системы.

В листьях растений подорожника большого наблюдалось дозозависимое накопление натрия (рис. 4а). Содержание ионов натрия в листьях подорожника приморского достигало максимума (примерно 4-5 ммоль/г сухой массы) при засолении 50 мМ и слабо изменялось с увеличением концентрации NaCl в среде.

Анализ содержания калия в листьях опытных растений показал, что в подорожнике приморском его уровень при сильном засолении (400 и 500 мМ NaCl) превышал контрольные значения. В листьях подорожника большого содержание калия изменялось незначительно (рис. 4б).

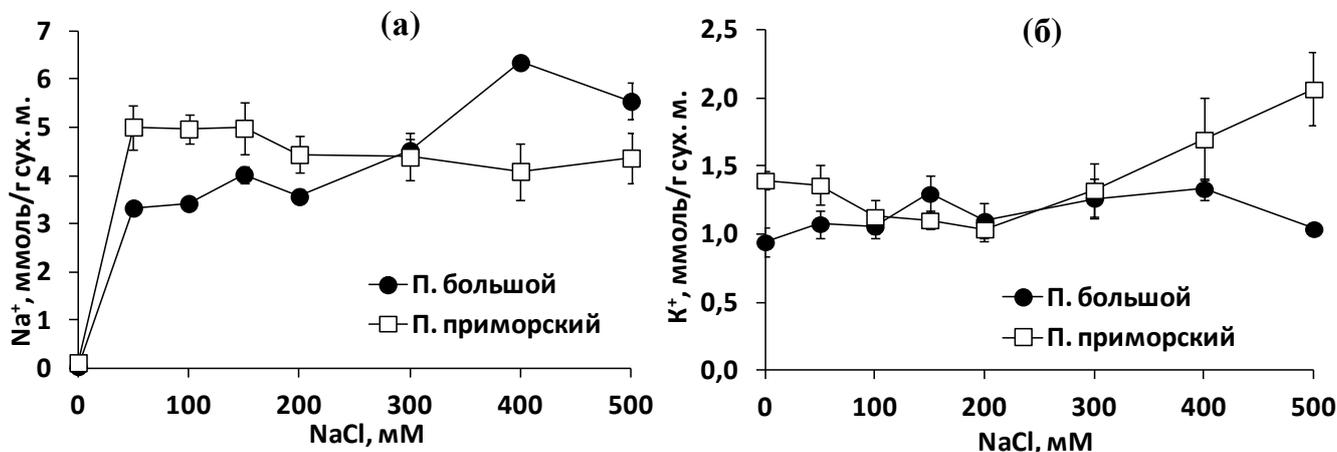


Рисунок 4 – Влияние различных концентраций NaCl на содержание Na⁺ (а) и K⁺ (б) в листьях растений на третьи сутки эксперимента.

Таким образом, различная устойчивость двух видов подорожников к засолению была связана с их разной способностью противостоять развитию водного дефицита, поддерживать осмотический потенциал клеток и контролировать содержание ионов натрия в клетках.

Исходя из полученных результатов, для изучения динамики показателей водного режима, содержания натрия, хлора и совместимых осмолитов в листьях исследуемых растений было выбрано воздействие 300 мМ NaCl в питательном растворе в течение трех суток. Для сравнительного исследования динамики восстановительных процессов у растений, после засоления их переносили питательную среду контрольного состава и выращивали в течение еще трех суток.

Динамика содержания воды, осмотического потенциала, содержания натрия и хлора в листьях исследуемых растений при засолении 300 мМ NaCl и в восстановительный период

Содержание воды в листьях подорожника большого заметно уменьшалась при действии 300 мМ NaCl. В листьях подорожника приморского, наоборот, колебания содержания воды были минимальны и не превышали 1,8% к третьим суткам опыта

(рис. 5а). Осмотический потенциал в листьях подорожника большого на третьей сутки эксперимента был ниже, чем у подорожника приморского в 1,4 раза.

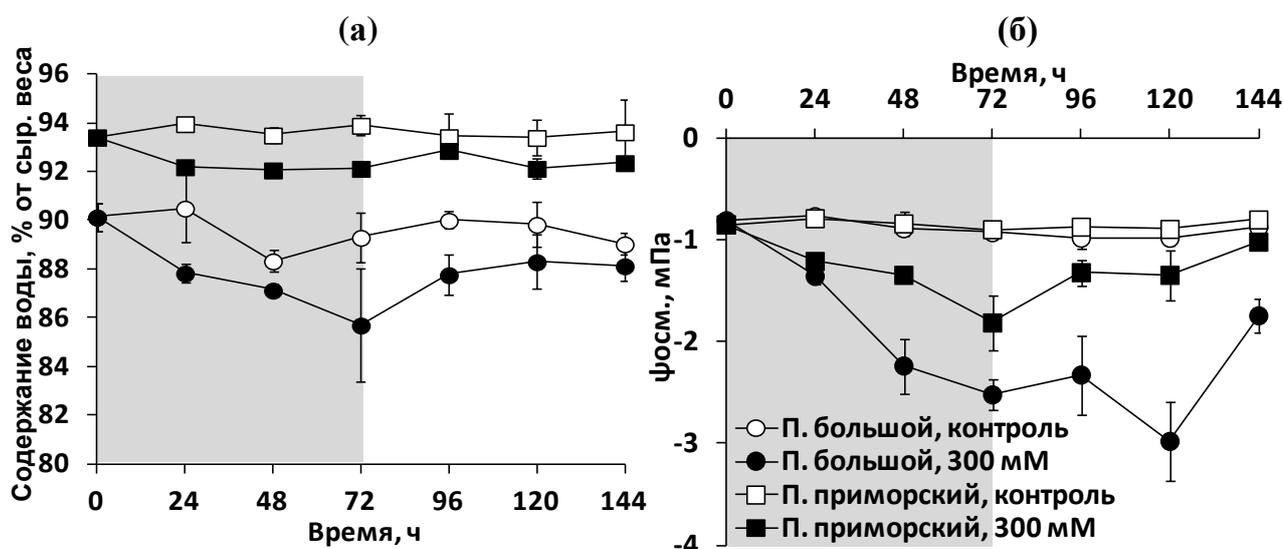


Рисунок 5 – Содержание воды (а) и динамика осмотического потенциала (б) в листьях растений при засолении и в восстановительный период. Затемненная область графика соответствует периоду засоления.

Принимая во внимание тот факт, что в питательной среде осмотический потенциал был равен примерно -1,4 мПа, то столь значительное снижение его в листьях подорожника большого может рассматриваться не как осмотическая регуляция, а как неспособность к поддержанию водного баланса в условиях засоления.

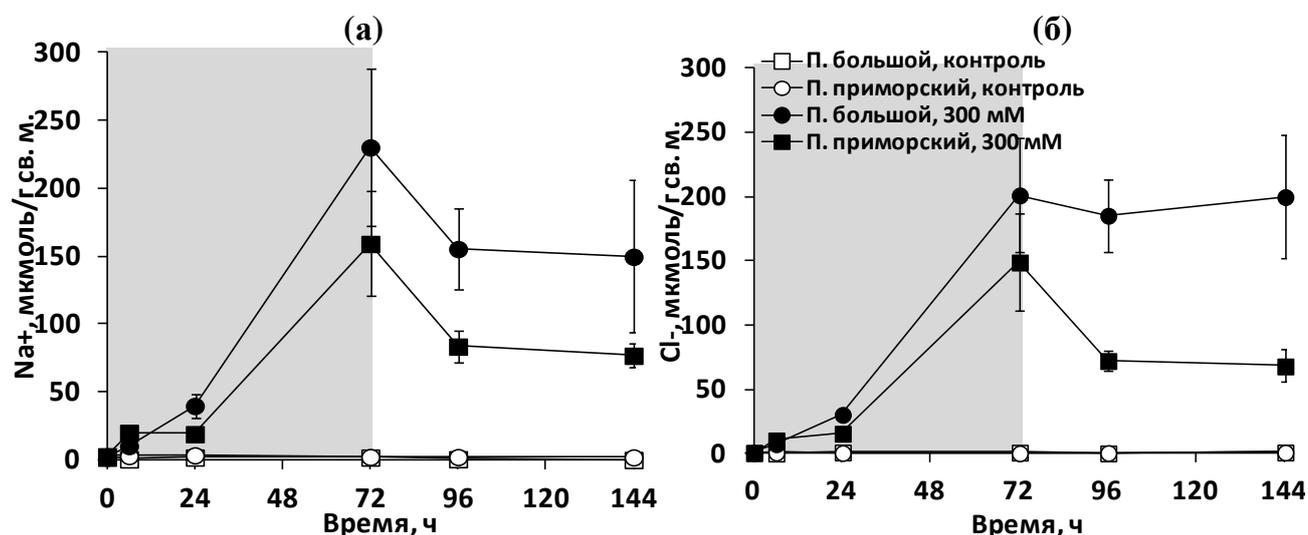


Рисунок 6 – Динамика содержания натрия (а) и хлора (б) в листьях растений при засолении и в восстановительный период. Затемненная область графика соответствует периоду засоления.

Как видно из рисунка 6, содержание ионов натрия и хлора в течение всего эксперимента у подорожника большого был выше, чем у подорожника приморского.

Расчет средней концентрации натрия в клетках листьев подорожника большого на третьей сутки эксперимента показал, что она должна была приближаться к 270 мМ, против 170 мМ в листьях подорожника приморского. Быстрое и значительное накопление натрия и хлора в листьях подорожника – гликофита могло быть еще одной причиной существенного снижения осмотического потенциала в клетках.

В большей степени уровень осмотического потенциала был зависим от содержания ионов натрия у подорожника большого ($r = -0,96$ при $p = 0,01$) и в меньшей степени у подорожника приморского ($r = -0,86$ при $p = 0,05$).

Таким образом, можно предполагать, что подорожник большой был неспособен поддерживать низкое содержание натрия и хлора в клетках, что может свидетельствовать о низкой эффективности барьерных систем клеток корня и механизмов активного транспорта этих ионов против их электрохимических градиентов.

Анализ динамики изученных параметров на этапе восстановления показал, что восстановление у подорожника большого проходило медленнее. Малая скорость снижения содержания натрия, а также отсутствие снижения содержания хлора в листьях подорожника большого после снятия засоления, возможно, были причинами сохранения более низких значений осмотического потенциала у восстанавливающихся растений. Растения подорожника приморского, напротив, восстанавливали осмотический потенциал до контрольных значений за 72 часа.

Динамика содержания совместимых осмолитов в листьях исследуемых растений при засолении 300 мМ NaCl и в период восстановления

Одновременно с повышением содержания ионов и их компартментацией в вакуоли растения защищают цитоплазму клеток от потерь воды за счет синтеза совместимых осмолитов (Tuteja, 2009).

Проведенный нами анализ содержания растворимых углеводов и сахароспиртов в экстрактах из корней и листьев подорожников методом ВЭЖХ показал, что концентрация сорбита в листьях подорожника большого и подорожника приморского сопоставима с концентрацией важнейших углеводов растений – глюкозы и сахарозы, что подтверждается литературными данными (Ahmad, Larhner, 1979; Nadwodnik, Lohaus,

2008). Поэтому нами было изучено влияние засоления на содержание сорбита, а также на содержание пролина – распространенного осмотически активного и стресс-протекторного метаболита - в листьях подорожников.

В листьях обоих исследованных растений происходило увеличение содержания сорбита через 48 ч после засоления (рис. 7а). Однако в дальнейшем, увеличение содержания сорбита было характерно только для листьев менее устойчивого подорожника большого. У подорожника приморского содержание сорбита после 48 часов снижалось.

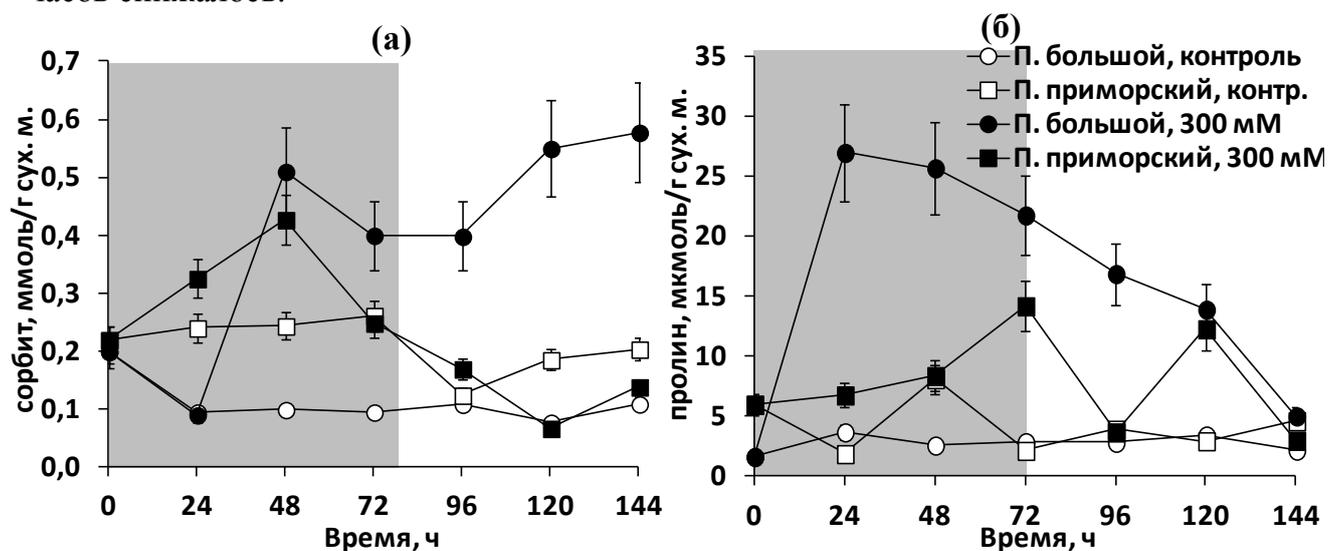


Рисунок 7 – Динамика содержания сорбита (а) и пролина (б) в листьях растений при засолении и в восстановительный период. Затемненная область графика соответствует периоду засоления.

Полученные данные свидетельствуют о сходной NaCl-индуцированной стимуляции синтеза сорбита у обоих растений. Различие содержания сорбита при засолении и в восстановительный период у исследуемых растений, возможно, связано с разным осмотическим потенциалом в листьях подорожников. Более низкий осмотический потенциал в листьях подорожника большого из-за обезвоживания и сохраняющегося высокого содержания натрия, мог быть причиной поддержания синтеза сорбита на значительном уровне даже после перенесении этого растения в контрольные условия.

Анализ содержания пролина (рис. 7б) выявил значительно меньший, в сравнении с сорбитом, уровень его в листьях у обоих видов контрольных и опытных растений (примерно в 30-60 раз). Количество пролина существенно повышалось при засолении

только в листьях подорожника большого, что, возможно, связано не столько с осморегуляторной, сколько с его антиоксидантной и белок-стабилизирующей ролью.

Антиоксидантный статус растений при засолении (300 мМ NaCl в течение трех суток) и при последующем восстановлении

Одним из последствий действия засоления на растения является окислительный стресс, связанный с нарушениями структуры мембран, процессов фотосинтеза и дыхания (Shao *et al.*, 2008; Gill, Tuteja, 2010; Suzuki *et al.*, 2012). Для оценки степени окислительных повреждений была изучена динамика содержания МДА в листьях двух видов подорожников. В ходе эксперимента уровень МДА у обоих видов мало различался и достигал максимума на третьи сутки засоления (рис. 8а). Таким образом, изменение содержания МДА в листьях указывает на развитие окислительного стресса у обоих видов растений при засолении, независимо от их устойчивости к засолению.

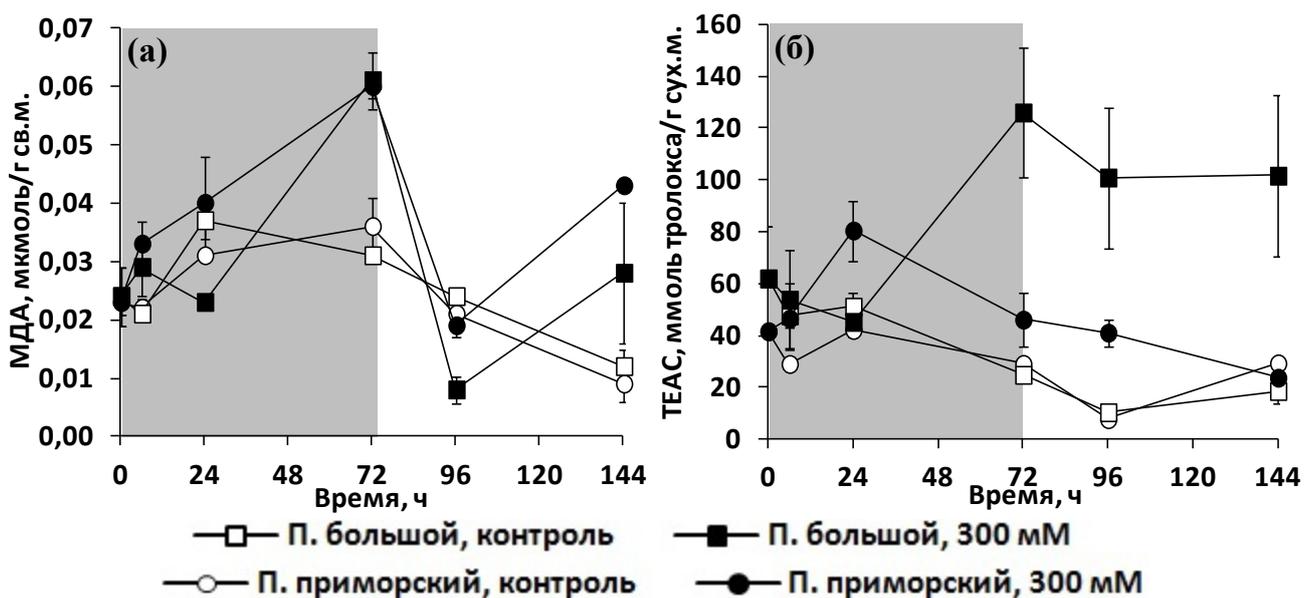


Рисунок 8 – Влияние 300 мМ NaCl в питательной среде на содержание МДА в листьях растений (а) и на антиоксидантную емкость этанольных экстрактов из листьев подорожников (б). Затемненная область графика соответствует периоду засоления

Рост МДА, наблюдавшийся к концу восстановительного периода, мог свидетельствовать о повторном развитии окислительного стресса, который вероятно возникал вследствие гипоосмотического шока из-за резкого снижения осмотического потенциала в среде (Cazale *et al.*, 1998; Hernandez, Almansa, 2002; Liu *et al.*, 2012).

В литературе представлено значительное число доказательств высокой антиоксидантной активности экстрактов листьев различных видов подорожника (Samuelson, 2000; Glvez *et al.*, 2005; Pogacnik, Ulrich, 2011; Amakura, 2012 и др.), но мало сведений о возможном участии низкомолекулярных антиоксидантов в защитном ответе подорожников на стресс.

Для оценки активности низкомолекулярных антиоксидантов использовали метод определения тролокс-эквивалента антиоксидантной способности экстрактов из листьев растений, который позволил оценить суммарное содержание ABTS^{•-}-активных низкомолекулярных гидрофильных и липофильных антиоксидантов, включая флавоноиды, фенилпропаноиды, каротиноиды и др. Антиоксидантная емкость в листьях подорожника приморского в условиях засоления увеличивалась значительно больше, чем у подорожника большого, и оставалась на высоком уровне до конца эксперимента (рис. 8б). Подорожник приморский проявлял большую способность к повышению содержания низкомолекулярных антиоксидантов в условиях засоления, чем его родственник-гликофит. Возможно, эта способность данного галофита к лучшему обезвреживанию свободных радикалов является одной из причин большей солеустойчивости подорожника приморского.

Влияние засоления на активности H^+ -АТФазы и Na^+/H^+ антипортера в плазмалемме из корней и листьев подорожников

Известно, что важную роль в поддержании водно-солевого баланса клеток растений при засолении играют H^+ -АТФазы, необходимые для вторично-энергизованного транспорта ионов и метаболитов через клеточные мембраны.

Факт того, что содержание натрия в листьях опытных растений подорожника приморского, в отличие от подорожника большого, не зависело от степени засоления (рис. 4а), и определялось лишь наличием или отсутствием NaCl в питательной среде, может объясняться различиями в регуляции процессов активного транспорта ионов H^+ и Na^+ у этих растений. С целью проверки справедливости данной гипотезы нами были проведены исследования стресс-индуцированных изменений каталитической и

транспортной активностей H^+ -АТФазы, а также активности Na^+/H^+ антипортера в плазмалемме, выделенной из корней и листьев исследуемых растений.

Поскольку для выполнения поставленной задачи необходимо было смоделировать «насыщение» листьев растений ионами натрия, длительность эксперимента была увеличена до 7 суток, а уровень засоления снижен до 100 мМ NaCl. Такая схема эксперимента, с одной стороны, не приводила к гибели менее устойчивого подорожника большого, а, с другой стороны гарантировала стабилизацию уровня ионов Na^+ в листьях обоих растений (эффект «насыщения»).

АТФазная активность плазмалеммы, выделенной из корней и листьев контрольных растений, имела близкие значения, в то время как действие 100 мМ NaCl приводило к увеличению активности данного фермента в 1,7 и 2,3 раза в листьях подорожника большого и подорожника приморского соответственно, а также к слабому снижению активности в корнях. Важно было понять, сопровождается ли обнаруженное нами увеличение АТФазной активности под действием засоления соответствующей стимуляцией АТФ-зависимой H^+ -транслоцирующей активности выделенных везикулярных мембран. Как показано на рисунке 9, активация этого процесса действительно наблюдалась, но только для плазмалеммы, выделенной из листьев растений.

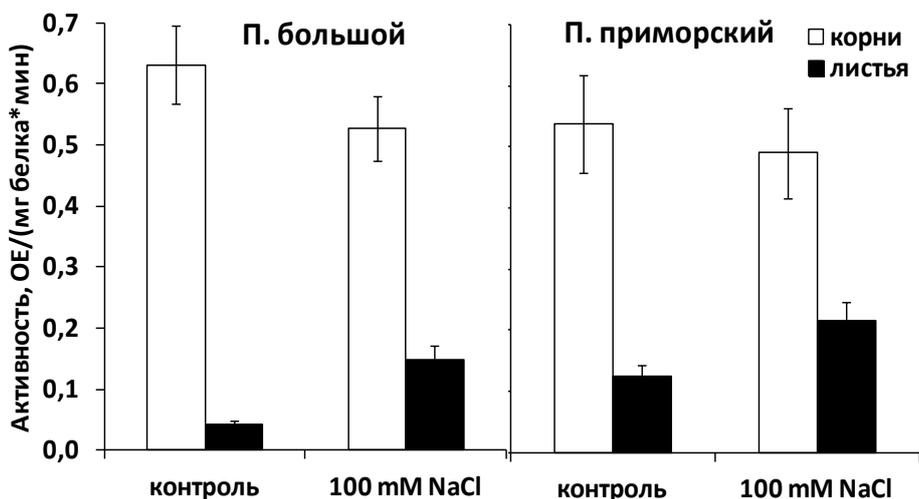


Рисунок 9 – Влияние засоления 100 мМ NaCl на H^+ -транслоцирующую активность мембран из корней и листьев растений подорожника большого приморского на 7 сутки.

Отмеченное выше стимулирующее действие засоления на транспортную активность H^+ -АТФазы плазмалеммы подорожников может активировать вторично-энергизуемые процессы транспорта, в том числе транспорт Na^+ через Na^+/H^+ антипорт.

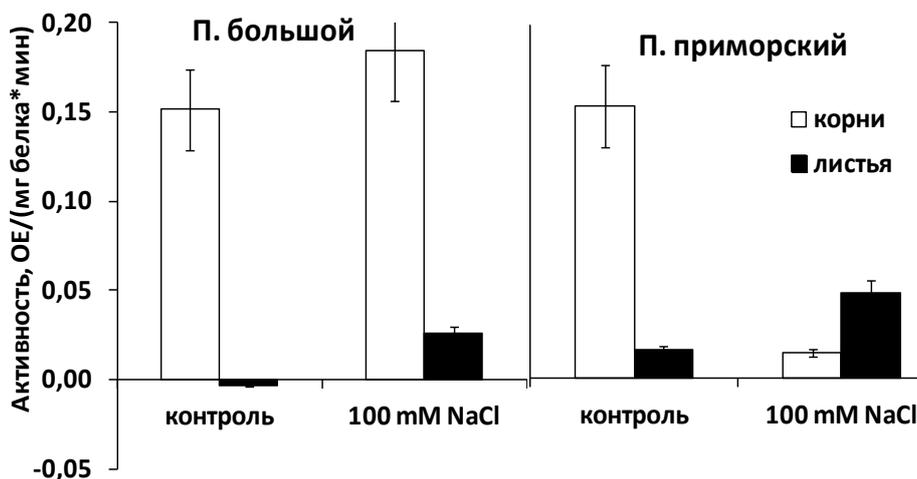


Рисунок 10 – Влияние засоления 100 мМ NaCl на скорость Na^+/H^+ обмена в препаратах плазмалеммы из корней и листьев растений подорожника большого и приморского на 7 сутки.

Как следует из данных, представленных на рисунке 10, в мембранах из корней подорожника большого не наблюдалось каких-либо существенных изменений в скоростях Na^+/H^+ обмена по сравнению с контролем. Напротив, в мембранах из корней подорожника приморского, в условиях засоления, скорость Na^+/H^+ обмена снижалась в несколько раз. Вместе с тем в мембранах, выделенных из листьев опытных растений обоих видов, наблюдалась существенная стимуляция процесса Na^+/H^+ обмена по сравнению с контролем.

Скорость Na^+/H^+ обмена может в определенной степени характеризовать способность клеток корня или листа к активному, опосредованному протонным градиентом, выведению натрия в апопласт. Поэтому, изменение активности этого вида транспорта в паренхиме ксилемы корня, позволяет снижать содержание Na^+ в ксилеме и, следовательно, темпы его поступления в надземные органы.

Таким образом, можно предположить, что, наблюдаемое при засолении снижение скорости Na^+/H^+ обмена в плазмалемме, выделенной из корней подорожника приморского, позволяло в условиях целого растения ограничивать поступление ионов натрия в ксилему и надземные органы и стабилизировать тем самым уровень натрия в листьях независимо от интенсивности засоления. Наблюдавшаяся в условиях засоления стимуляция H^+ -транслоцирующей и Na^+/H^+ обменной активности плазмалеммы листьев, возможно, позволяла растениям усиливать энергозависимый транспорт ионов Na^+ из клеток листа, а также, возможно, интенсифицировать загрузку флоэмы фотоассимилятами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Адаптация растений к действию засоления должна заключаться в восстановлении водного режима клеток и ионного баланса их цитоплазмы, направленном как на уменьшение степени взаимодействия ионов солей с чувствительными компонентами клетки, так и на нормализацию минерального питания. Одним из способов защиты у растений-галофитов может быть наличие специализированных морфологических и анатомических приспособлений.

Полученные данные о различиях строения контрастных по устойчивости к засолению подорожника большого и подорожника приморского показывают значение анатомо-морфологических особенностей для процесса адаптации этих растений к засолению. Подорожник приморский характеризовался меньшей площадью листьев (в 3,5 меньше, чем у подорожника большого), что характерно также для некоторых других засухо- и солеустойчивых представителей рода *Plantago* (Vicente *et al.*, 2004; Voscainu *et al.*, 2005; Koyro, 2006; Rahimi *et al.*, 2006; Afsharmanesh *et al.*, 2010). Таким образом, форма листовой пластинки подорожников в значительной степени зависит от экологической принадлежности вида и, несомненно, влияет на водный режим растения. В отличие от подорожника большого листья подорожника приморского характеризовались изолатеральным строением, характерным для многих суккулентов (Fisher *et al.*, 1997), и обладали хорошо развитой водозапасающей тканью, которая занимала большой объем листа. При этом, водозапасающая паренхима листьев подорожника приморского может быть предназначена не столько для приспособления к засухе, сколько для депонирования избытка солей. Таким образом, полученные данные сравнительного анатомо-морфологического исследования растений свидетельствуют о наличии ряда особенностей в строении подорожника приморского, которые имеют значение для сохранения водного баланса при засолении.

Сравнительный анализ действия различных концентраций NaCl на растения подорожника большого и подорожника приморского позволил выявить четкие границы адаптационных возможностей данных растений к засолению. Для подорожника большого токсическим было воздействие хлорида натрия в концентрации выше 100

мМ, в то время как подорожник приморский не имел признаков повреждения при выращивании на растворе с концентрацией до 200 мМ NaCl.

При засолении, в условиях физиологической засухи, растения способны регулировать осмотический потенциал и сохранять его в физиологически допустимых пределах, что может рассматриваться, как один из адаптационных механизмов. Исследованные растения различались по способности противостоять развитию водного дефицита. Содержание воды в листьях подорожника приморского, в отличие от подорожника большого, изменялось в узких пределах, а осмотический потенциал клеток не опускался ниже 0,4 МПа относительно осмотического потенциала среды, что сохраняло возможность поступления воды в растение. У подорожника большого при действии засоления значительное снижение осмотического потенциала клеточного экссудата листьев не приводило к усилению транспорта воды в направлении действующего осмотического градиента, возможно из-за повреждения корневой системы.

Важной особенностью и, возможно, центральным звеном в солеустойчивости подорожника приморского была способность к контролю накопления натрия в листьях. У исследуемого галофита содержание натрия поддерживалось на постоянном уровне (в пределах 5 ммоль/г сухой массы), даже при значительных уровнях засоления, что отличало его от подорожника большого.

Значительная роль в стабилизации содержания натрия в листьях подорожника приморского могла принадлежать механизмам активного транспорта ионов через мембраны клеток. Для предотвращения поступления ионов натрия в листья, подорожнику-галофиту необходимо было ограничивать их загрузку в ксилему на уровне клеток ксилемной паренхимы. Как показали исследования на инвертированных везикулах мембран выделенных из корней и листьев подорожника, этот механизм действительно функционировал. Везикулы плазмалеммы, выделенные из корня подорожника приморского, подвергнувшегося засолению, характеризовались сильно сниженной скоростью Na^+/H^+ обмена по сравнению с везикулами, выделенными из корней контрольных растений. В то время как для везикул из корней растений подорожника большого в условиях засоления таких изменений отмечено не было. Вместе с этим, в

листьях обоих растений при действии засоления происходило усиление как протон-транслоцирующей, так и Na^+/H^+ обменной активности мембран. Исходя из полученных нами данных, можно предположить, что наблюдаемое при засолении снижение скорости Na^+/H^+ обмена в плазмалемме, выделенной из корней, позволяло в условиях целого растения подорожника приморского ограничивать поступление ионов натрия в ксилему и надземные органы.

ВЫВОДЫ

1. В поддержании водного гомеостаза растений подорожника приморского значительный вклад вносило анатомо-морфологическое строение листьев, имеющих меньшую, в сравнении с подорожником большим, транспирационную поверхность, выраженный суккулентный характер внутренней организации и наличие водозапасающих тканей.
2. Основными отличиями подорожника большого от подорожника приморского в реакции их на засоление были более выраженный водный дефицит, и малоэффективный контроль накопления ионов натрия и хлора в листьях растений.
3. Стимуляция накопления совместимых осмолитов сорбита и пролина имела большее значение в защитном ответе менее устойчивого к засолению подорожника большого, который сильнее испытывал водный дефицит.
4. Подорожник большой и подорожник приморский испытывали окислительный стресс при засолении, однако, подорожник приморский был способен к более эффективному обезвреживанию свободных радикалов, что является одной из причин его большей солеустойчивости.
5. Подорожник приморский обладал более высоким регенерационным потенциалом по сравнению с подорожником большим, что проявлялось в большей степени восстановления исследованных параметров (содержание воды, осмотический потенциал, содержание ионов натрия и хлора в листьях) при перенесении растений из засоления в контрольные условия.

6. В листьях растений обоих видов подорожников, наблюдаемая при засолении индукция АТФазной активности плазмалеммы, вероятно, была причиной усиления АТФ-зависимого транспорта, что может рассматриваться как стресс-зависимая регуляция вторично-энергизованного транспорта.

7. В отличие от подорожника большого, подорожник приморский, был способен при засолении ограничивать поступление ионов натрия в ксилему и надземные органы за счет уменьшения скорости Na^+/H^+ обмена в плазмалемме клеток корня.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Иванов Ю.В., Карташов А.В., Радюкина Н.Л., Шевякова Н.И.** (2006) Функционирование NaCl- индуцированной защитной системы в растениях галофитного и гликофитного типов. В сб.: *Пушчинская школа-конференция молодых учёных*, Пушкино, с. 75-76.

2. **Иванов Ю.В., Карташов А.В., Радюкина Н.Л., Шевякова Н.И., Кузнецов Вл.В.** (2006) Действие различных концентраций NaCl на дикорастущие травянистые растения средней полосы России. В сб.: *Международная конференция молодых учёных «Леса Евразии – Венгерский лес»*, Шопрон, с. 67-68.

3. **Карташов А.В., Иванов Ю.В., Пашковский П.П., Радюкина Н.Л., Кузнецов Вл.В.** (2007) Исследование ранней индукции защитных систем растений подорожника большого (*Plantago major* L.) под действием NaCl. В сб.: *VI Съезд Общества физиологов растений России*, Сыктывкар, с. 176-177.

4. **Карташов А.В., Иванов Ю.В., Радюкина Н.Л.** (2007) Системы стресс-толерантности подорожника большого. В сб.: *Международная конференция молодых учёных «Леса Евразии – Русский север»*, Петрозаводск, с. 100-101.

5. **Радюкина Н.Л., Карташов А.В., Иванов Ю.В., Шевякова Н.И., Кузнецов В.В.** (2007) Сравнительный анализ функционирования защитных систем у представителей галофитной и гликофитной флоры в условиях засоления. *Физиология растений*, **54**, 902-912.

6. Radukina N.L., Ivanov Y.V., Kartashov A.V., Kuznetsov V.V. (2007) The Free Polyamines in Glycophyte *Plantago major* and Halophyte *Thellungiella halophila* under Salt Stress. In: *Book of Abstr., International Symposium "Plant Growth Substances: Intracellular Hormonal Signaling and Applying In Agriculture"*, Kyiv, P109.
7. Карташов А.В., Радюкина Н.Л., Иванов Ю.В., Пашковский П.П., Шевякова Н.И., Кузнецов В.В. (2008) Роль систем антиоксидантной защиты при адаптации дикорастущих видов растений к солевому стрессу. *Физиология растений*, **55**, 516-522.
8. Mapelli S., Brambilla I. M., Radyukina N. L., Ivanov Yu. V., Kartashov A. V., Reggiani R., Kuznetsov V. V. (2008) Free and bound polyamines changes in different plants as a consequence of UV-B light irradiation. *Gen. Appl. Plant Physiology*, **34**, 55-66.
9. Радюкина Н.Л., Мапелли С., Иванов Ю.В., Карташов А.В., Брамбилла И., Кузнецов В.В. (2009) Гомеостаз полиаминов и антиоксидантные системы корней и листьев *Plantago major* L. при солевом стрессе. *Физиология растений*, **56**, 359-368.
10. Карташов А.В., Иванов Ю.В., Пашковский П.П., Радюкина Н.Л. (2011) Солеустойчивость как критерий оценки перспективности использования растений для городского озеленения. В сб.: «*Экология мегаполисов: фундаментальные основы и инновационные технологии*» и *Школа для молодых ученых по экологической физиологии растений. Материалы докладов*, Москва, с. 70.
11. Карташов А.В., Иванов Ю.В. (2011) Постстрессовое состояние выявляет разнонаправленную продолжительную активацию защитной системы дикорастущих травянистых растений. В сб.: *VII Съезд Общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» Материалы докладов Часть I.*, Нижний Новгород, с. 317 – 318.
12. Карташов А.В., Радюкина Н.Л. (2011) Исследование солевого стресса у подорожника большого и подорожника приморского – представителей «контрастных» экологических групп. В сб.: *Международная конференция молодых учёных «Леса Евразии» (тезисы докладов)*, Брянск, с. 145.