

УДК 581.1

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ *Solanum tuberosum* L. К ХЛОРИДНОМУ ЗАСОЛЕНИЮ

© 2018 г. М. В. Ефимова^{1,*}, Л. В. Коломейчук¹, Е. В. Бойко¹, М. К. Малофий¹,
А. Н. Видершпан¹, И. Н. Плюснин¹, И. Ф. Головацкая¹, О. К. Мурган¹, Вл. В. Кузнецов^{1,2}

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева РАН, Москва

Поступила в редакцию 28.07.2017 г.

Изучали механизмы устойчивости растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) к хлоридному засолению на примере районированного в России сорта Луговской. Растения-регенеранты получали из апикальной меристемы в условиях *in vitro* и выращивали их на гидропонной установке на среде Мурашиге и Скуга с половинным содержанием макро- и микроэлементов (0.5 МС) в факторостатных условиях. В возрасте шести недель растения подвергали солевому стрессу (50–150 мМ NaCl, 7 суток). Реакцию растений на солевой стресс оценивали по ростовым (сырая и сухая биомасса надземной и подземной частей растений, линейные размеры побега и корня, площадь листовой поверхности, количество столонов) и физиологическим (уровень фотосинтетических пигментов, накопление ионов натрия, калия и кальция в надземных и подземных частях растений, пролина, антиоксидантных ферментов, оводненность тканей растений, осмотический потенциал, ПОЛ) показателям. Установлено, что растения картофеля с. Луговской отвечали на засоление значительным ингибированием ростовых процессов, снижением содержания хлорофилла *a* и торможением образования столонов, что свидетельствует о достаточно низкой солеустойчивости сорта. Вместе с тем при слабом и умеренном солевом стрессе растения сохраняли водный гомеостаз за счет эффективной осморегуляции, активно накапливали пролин, обладающий стресс-протекторным действием, и практически не обнаруживали развития окислительного стресса. Высказано предположение, что уровень солеустойчивости данного сорта лимитируется, с одной стороны, низкой способностью корневой системы удерживать ионы натрия и обеспечивать избирательный транспорт ионов в надземную часть и, с другой стороны, низкой эффективностью системы компартментации ионов натрия из цитоплазмы клеток листа в центральную вакуоль для снижения их токсического эффекта. Полученные результаты могут быть полезны при разработке технологии повышения солеустойчивости данного сорта молекулярно-генетическими методами.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum* L. – засоление – осмотический потенциал – водный статус – неорганические ионы – пролин

DOI: 10.7868/S001533031803003X

ВВЕДЕНИЕ

Засоление является доминирующим стрессорным фактором, лимитирующим рост и продуктивность сельскохозяйственных культур, прежде всего, в аридных и полуаридных областях. В настоящее время более 800 млн. га почв земного шара

засолено, из которых 32 млн. га подвергнуты вторичному засолению [1]. Засоленными признаются почвы, в которых электропроводность составляет 4 дСм/м или более, что эквивалентно раствору 40 мМ NaCl (или осмотическому давлению около 0.2 МПа) [2]. Значительная часть засоленных территорий возникла естественным путем в зонах с засушливым климатом в результате накопления солей, главным образом, за счет выветривания родительских пород. Другой причиной избыточного засоления почв является интенсивная антропогенная деятельность, в первую очередь, орошение [3]. Наиболее распространено засоление, вызываемое хлоридом натрия; оно же оказывает наибольший негативный эффект на растения [4].

Сокращения: ПОЛ – перекисное окисление липидов; СОД – супероксиддисмутаза.

*Адрес для корреспонденции: Ефимова Марина Васильевна. 634050 Томск, пр. Ленина, 36. Национальный исследовательский Томский государственный университет, Биологический институт, кафедра физиологии растений и биотехнологии. Электронная почта: stevmv555@gmail.com

Интенсивное засоление влияет на протекание всех основных физиологических процессов у растений. В основе негативного действия высоких концентраций солей лежит нарушение осмотического статуса и ионного гомеостаза, а также проявление токсического действия неорганических ионов на клеточный метаболизм [5, 6].

Помимо этого засоление вызывает генерацию активных форм кислорода (АФК) и развитие окислительного стресса [7–9]. АФК приводят к инактивации ферментов, повреждению белков и нуклеиновых кислот, нарушению функционирования мембран. Инициация и развитие осмотического и окислительного стрессов вызывает повреждение структуры фотосинтетического аппарата и, как следствие, снижение продуктивности растений [10].

У растений разных экологических групп функционирует сложная система анатомо-морфологических, физиологических и биохимических механизмов адаптации к условиям засоления. При этом устойчивость галофитов определяется функционированием, прежде всего, конститутивных защитных механизмов, тогда как в основе солеустойчивости гликофитов лежат стресс-индуцируемые протекторные системы [4, 11]. Резкое понижение водного потенциала почвенного раствора в условиях засоления приводит к снижению поступления воды в клетки корня и падению тургора. Для восстановления градиента водного потенциала между почвенным раствором и клетками корня растение, как правило, активно поглощает неорганические ионы, и секвестрирует их в центральной вакуоли. Для выравнивания водного потенциала между основными клеточными компартментами в цитоплазме синтезируются совместимые осмолиты, такие как аминокислоты (пролин), сахароспирты и четвертичные амины [12]. В ответ на развитие окислительного стресса и повреждение метаболизма растение отвечает формированием клеточной антиоксидантной системы, которая включает антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутаза, пероксидаза, каталаза и др.) и низкомолекулярные органические соединения, обладающие антиоксидантными свойствами [8].

Подавляющее большинство сельскохозяйственных культур относится к растениям гликофитам, механизмы солеустойчивости многих из них достаточно хорошо исследованы, чего нельзя сказать о растениях картофеля [4, 13]. В то же самое время картофель является четвертой по значимости продуктовой сельскохозяйственной культурой в мире, производство которой имеет важное значение для обеспечения продовольственной безопасности и социальной стабильности во многих странах [1, 14].

Дикие виды картофеля имеют достаточно высокую стресс-толерантность. Однако интенсивная селекция, направленная на получение высокоурожайных сортов, обладающих высокой лежкостью клубней, повышенной устойчивостью к биопатогенам, оптимальными сроками созревания, привела к тому, что толерантность современных сортов картофеля к абиотическим факторам, в частности к засолению, оказалась значительно ниже, чем у диких форм [13, 15, 16]. Это делает актуальным изучение физиологических механизмов солеустойчивости хозяйственно ценных сортов картофеля для понимания стратегии их адаптации к условиям засоленных местообитаний и разработки эффективных технологий повышения их солетолерантности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на растениях *Solanum tuberosum* L. среднеспелого сорта Луговской (идентификатор 8301891), широко распространенного в Центральном регионе России и в Сибири. Картофель данного сорта дает стабильно высокий урожай, его клубни характеризуются высокой лежкостью и устойчивостью к ряду заболеваний, в том числе, к фитофторозу.

Оздоровленные растения-регенеранты картофеля *in vitro* получали из апикальной меристемы и на протяжении 27 суток культивировали на агаризованной питательной среде МС с половинным содержанием макро- и микроэлементов (0.5 МС). Корни растений отмывали от агаризованной среды и проводили адаптацию микроклонов к жидкой среде МС половинной и условиям воздушной среды под люминесцентными лампами L36W/77 Fluora (“Osram”, Германия) при плотности потока квантов ФАР 200–250 мкмоль м²с⁻¹ в фитотроне с 16-часовым фотопериодом и температурой 20 ± 3 °С. После 2-недельного роста растений на гидропонной установке в среде 0.5 МС 6-недельные растения переносили на ту же самую среду с добавлением NaCl в диапазоне концентраций от 50 до 150 мМ (опытные варианты). В качестве контрольного варианта использовали питательную среду 0.5 МС без добавления NaCl. Питательную среду в условиях гидропоники заменяли каждые 3.5 суток.

Через 7 суток опыта растительный материал фиксировали и использовали его для проведения анализов. Оценку морфометрических показателей проводили не менее трех раз на 10 растениях в каждом варианте.

Для анализа пролина и оценки интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) листья 3–5 ярусов фиксировали жидким азотом; для измерения содержания фотосинтетических пигментов

использовали 96% этанол. Для определения величины осмотического потенциала клеточного содержимого листа растений замораживали при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; для определения содержания ионов Na^+ и K^+ надземную и подземную части растения высушивали при $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ до постоянного веса.

Экстракцию и определение свободного пролина проводили так, как описано ранее [17].

Свежую и сухую биомассы растительного материала оценивали гравиметрическим методом. Сухую массу определяли после фиксации материала при $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ и его высушивания при $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ до постоянного веса. Содержание воды (% от сырой массы) рассчитывали, исходя из отношения разности сырой и сухой биомассы, отнесенной к сырой массе.

Для оценки содержания фотосинтетических пигментов листа (15 мг) растирали в 96% этаноле, и полученный гомогенат центрифугировали 10 мин при 8000 об/мин (центрифуга MiniSpin, Eppendorf, Германия). Оптическую плотность спиртового раствора (итоговый объем вытяжки составил 1.5 мл) измеряли на спектрофотометре (Genesys 10S UV-Vis, ThermoScientific, США). Концентрацию пигментов в спиртовом экстракте рассчитывали по формулам, приведенным Lichtenthaler [18].

Содержание ионов Na^+ и K^+ определяли на пламенном спектрофотометре Formula FM400 (LABIST, Russia).

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

Оценку способности растений к избирательному транспорту ионов ($\text{S}_{\text{K,Na}}^{++}$, $\text{S}_{\text{Ca,Na}}^{2++}$) рассчитывали по формулам [19]:

$$\text{S}_{\text{K,Na}}^{++} = (\text{K}^+/\text{Na}^+ \text{ в побегах}) / (\text{K}^+/\text{Na}^+ \text{ в корнях}), \quad (1)$$

$$\text{S}_{\text{Ca,Na}}^{2++} = (\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+ \text{ в побегах}) / (\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+ \text{ в корнях}). \quad (2)$$

Интенсивность ПОЛ оценивали спектрофотометрическим методом, основанным на образовании окрашенного комплекса – продукта малонового диальдегида (МДА) в реакции с тиобарбитуровой кислотой при нагревании [20].

Для оценки активности супероксиддисмутазы (СОД) (ЕС 1.15.1.1) и пероксидазы (ПО) (ЕС 1.11.1.7) образцы растений растирали в жидком азоте с нерастворимым поливинилпирролидоном, экстрагировали 0.066 М калий-фосфатным буфером (рН 7.4), содержащим 0.5 М дитиотрейтола, 0.1 М фенилметилсульфонилфторида

в диметилсульфоксиде, затем центрифугировали 20 минут при 8000 об/мин и температуре $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Eppendorf 5430R, Германия). Из полученного супернатанта отбирали аликвоты для определения активности СОД и ПО. Общую активность СОД определяли по методу, описанному *Beauchamp* и *Fridovich* [21]. Реакционная смесь объемом 2 мл содержала: 10 мкл супернатанта, 1.75 мл 50 мМ Трис-НСI-буфера (рН 7.8), 0.2 мл 0.1 М DL-метионина, 0.063 мл 1.7 мМ нитросинего тетразолия (Fermentas, США), 0.047 мл 1% Тритона X-100 и 0.060 мл 0.004% рибофлавина. Реакцию проводили при освещении светодиодными лампами ($I = 232\text{ мкмоль м}^2\text{ с}^{-1}$) в течение 30 минут. Поглощение раствора измеряли при 560 нм на спектрофотометре (Genesys 10S UV-Vis, ThermoScientific, США).

Активность ПО определяли так, как описано ранее [22]. Реакционная смесь содержала 50 мкл супернатанта, 1.95 мл 0.066 М калий-фосфатного буфера (рН 7.4), 200 мкл 7 мМ гваякола, 250 мкл 0.01 М H_2O_2 . Поглощение раствора измеряли при 470 нм на спектрофотометре (Genesys 10S UV-Vis, ThermoScientific, США).

Для оценки активности каталазы (ЕС 1.11.1.6) по методу Chance и Maehly [23] образцы растений растирали в жидком азоте с нерастворимым поливинилпирролидоном, экстрагировали 0.066 М калий-фосфатным буфером (рН 7.8), содержащим 0.5 М дитиотрейтола, 0.1 М фенилметилсульфонилфторида в диметилсульфоксиде, затем центрифугировали 20 минут при 10000 об/мин и температуре $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Eppendorf 5430R, Германия). Реакционная смесь содержала 50 мкл супернатанта, 1.9 мл 0.066 М калий-фосфатного буфера (рН 7.8), 50 мкл 0.05 М H_2O_2 . Поглощение раствора измеряли при 240 нм на спектрофотометре (Genesys 10S UV-Vis, ThermoScientific, США).

Концентрацию белка в полученных ферментных препаратах оценивали по методу Esen [24].

Все эксперименты повторяли не менее трех раз. Полученные результаты представлены на рисунках в виде средней арифметической величины со стандартной ошибкой. Для сравнения независимых выборок, подчиняющихся закону нормального распределения, использовали параметрический критерий Стьюдента. Значения t -критерия находили для 95% уровня значимости ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние NaCl на рост растений

Полученные экспериментальные данные показали, что растения сорта Луговской проявляли достаточно высокую чувствительность к хлоридному засолению (рис. 1). Самая низкая из

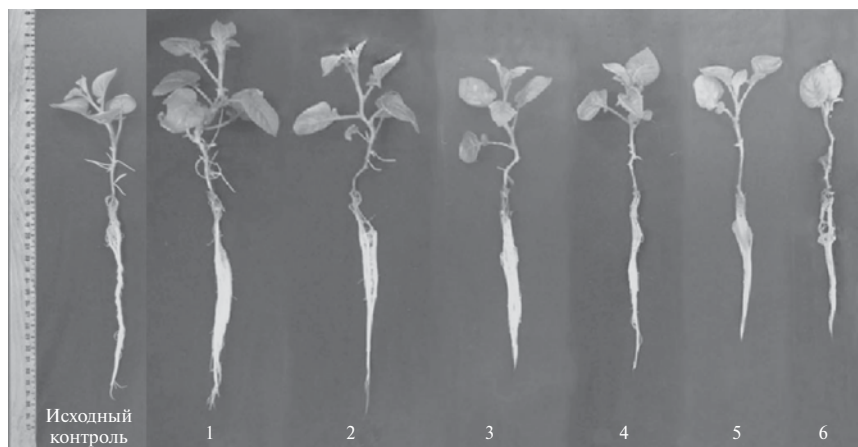


Рис. 1. Внешний вид растений *Solanum tuberosum*, подвергнутых хлоридному засолению различной интенсивности в течение семи дней. Концентрации NaCl в питательной среде: 1–0 мМ (контроль), 2–50 мМ, 3–75 мМ, 4–100 мМ, 5–125 мМ, 6–150 мМ. Исходный контроль – растение в возрасте шести недель.

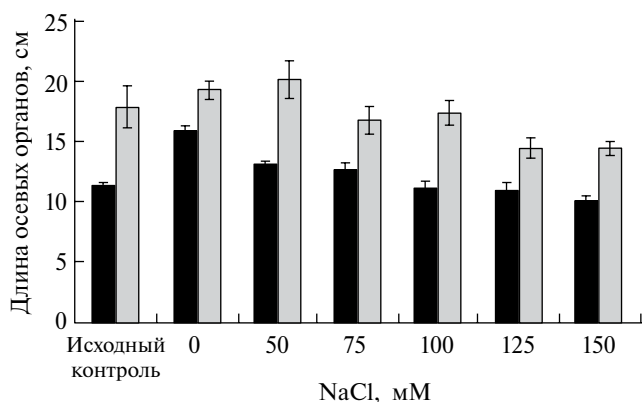


Рис. 2. Влияние NaCl (50–150 мМ, 7 дней), добавленного в питательную среду, на длину осевых органов *Solanum tuberosum*. Исходный контроль – растения картофеля в возрасте 6 недель. Столбики черного цвета – побеги, серого цвета – корни.

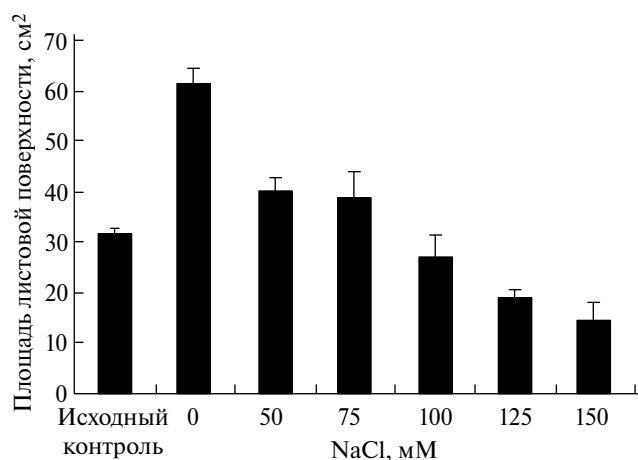


Рис. 3. Влияние NaCl (50–150 мМ, 7 дней), добавленного в питательную среду, на площадь листовой поверхности *Solanum tuberosum*. Исходный контроль – растения картофеля в возрасте 6 недель.

анализируемых нами концентраций соли (50 мМ NaCl) приводила к подавлению роста побега на 17.5% по сравнению с контролем (рис. 2), но не влияла на рост корня. Листовая поверхность при 50 мМ NaCl уменьшалась на 35% (рис. 3), количество столонов сокращалось в 2.3 раза, тогда как число ярусов не изменялось (табл. 1). Увеличение интенсивности засоления до 75–100 мМ NaCl не сопровождалось дальнейшим достоверным ингибированием ростовых реакций и сокращением числа столонов по сравнению с действием 50 мМ NaCl (рис. 2, табл. 1), за исключением площади

ассимилирующих органов, которая при 100 мМ NaCl была на 56.5% меньше листовой поверхности контрольных растений (рис. 3). Самые высокие из анализируемых нами концентраций NaCl (125 и 150 мМ) вызывали максимальное подавление роста картофеля. Длина побега и корня снижалась на 37 и 25%, а суммарная площадь листовой поверхности и количество столонов – в 4.3 и 2.9 раз соответственно (рис. 3, табл. 1).

Масса одного растения при 50 и 75 мМ NaCl в сравнении с контрольным вариантом снижалась на 30–31%, максимальный ингибирующий

Таблица 1. Влияние NaCl (50–150 мМ, 7 дней) на биомассу, число столонов и ярусов у растений *Solanum tuberosum*

Вариант	Масса растения, г	Число, шт	
		столонов	ярусов
Исходный контроль*	2.44 ± 0.15	3.00 ± 0.77	9.60 ± 0.60
NaCl, мМ			
0	4.98 ± 0.30	13.80 ± 0.66	10.17 ± 0.87
50	3.43 ± 0.17	6.00 ± 0.77	10.67 ± 0.33
75	3.47 ± 0.37	6.40 ± 1.08	11.50 ± 0.56
100	2.15 ± 0.29	5.20 ± 0.58	10.83 ± 0.31
125	1.73 ± 0.23	4.83 ± 0.48	9.00 ± 0.26
150	1.49 ± 0.13	4.80 ± 0.20	9.67 ± 0.42

*Примечание: исходный контроль – растения картофеля в возрасте 6 недель.

эффект был отмечен при 150 мМ соли, при которой средняя масса растения уменьшилась в 3.3 раза (табл. 1).

Влияние NaCl на содержание фотосинтетических пигментов

Негативное воздействие NaCl проявлялось не только на ростовых характеристиках растений *S. tuberosum*, но и на содержании фотосинтетических пигментов. В условиях самой низкой из используемых нами интенсивностей засоления (50 мМ NaCl) наблюдалось снижение уровней хлорофилла *a* (Хл *a*), хлорофилла *b* (Хл *b*) и каротиноидов в листьях растений на 33, 25 и 15% соответственно (рис. 4). Двукратное падение

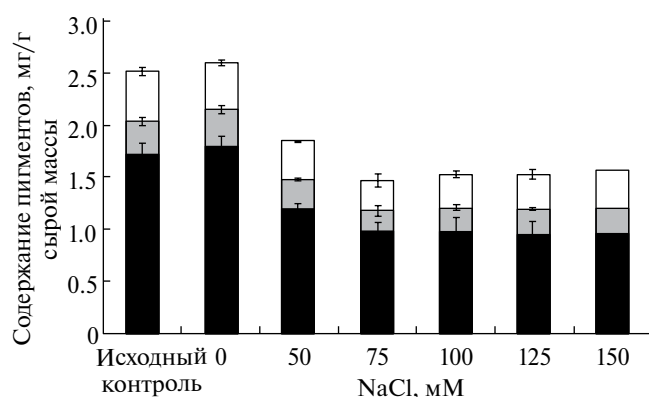


Рис. 4. Влияние засоления различной интенсивности (50–150 мМ NaCl) на содержание фотосинтетических пигментов в листьях *Solanum tuberosum*. Исходный контроль – растения картофеля в возрасте 6 недель. Столбики черного цвета – хлорофилл *a*, серого цвета – хлорофилл *b*, белого цвета – каротиноиды.

содержания Хл *a* достигалось при увеличении концентрации NaCl с 75 до 150 мМ. В отличие от Хл *a* меньшим изменениям были подвержены уровни Хл *b* и каротиноидов, содержание которых снижалось примерно на 20–30% в ответ на засоление (рис. 4). Величина отношения суммарного содержания хлорофиллов к каротиноидам в контрольных растениях составляла 4.7. В условиях засоления значения этого показателя понижались на 20 и 30% при концентрациях NaCl 50–100 и 150 мМ в среде соответственно.

Влияние NaCl на водный статус и осмотический потенциал растений картофеля

Одним из основных параметров, отражающих способность растения противостоять осмотическому действию соли, является оводненность его тканей. Содержание воды в побегах и корнях контрольных растений различалось; в подземной части растений картофеля данный показатель достигал 94.6%, тогда как в надземной части – 88.5% (табл. 2). Повышение концентрации NaCl в питательном растворе до 100 мМ не вызывало изменения оводненности тканей. С увеличением концентрации соли до 125 мМ и выше наблюдалась тенденция к снижению оводненности тканей надземной части растений картофеля, но не корней, о чем судили по уменьшению содержания воды в единице сырой массы (табл. 2).

Принципиально важным для сохранения водного статуса тканей растений при засолении является понижение их осмотического потенциала до уровня, способного восстановить направление градиента водного потенциала и обеспечить поток воды из среды в клетки корня [9]. Как следует из данных, представленных на рисунке 5, осмотический потенциал клеточного экссудата листьев картофеля в контрольном варианте составлял –0.63 МПа. При

Таблица 2. Влияние 50–150 мМ NaCl в питательном растворе на содержание воды в надземных и подземных частях растений *Solanum tuberosum*

Вариант	Содержание воды, %	
	побеги	корни
Исходный контроль*	89.70 ± 0.46	96.13 ± 0.26
NaCl, мМ		
0	88.45 ± 0.40	94.55 ± 0.53
50	88.13 ± 0.92	95.25 ± 0.58
75	88.44 ± 0.56	95.08 ± 0.42
100	88.31 ± 0.80	95.28 ± 0.37
125	86.74 ± 0.55	93.32 ± 0.90
150	84.76 ± 0.80	93.99 ± 1.00

*Примечание: исходный контроль – растения картофеля в возрасте 6 недель.

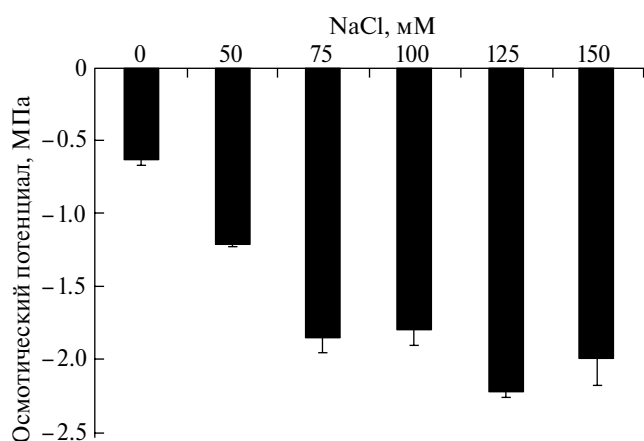


Рис. 5. Влияние хлоридного засоления различной интенсивности (NaCl 50–150 мМ, 7 дней) на осмотический потенциал клеточного содержимого растений картофеля.

слабой интенсивности засоления (50 мМ) осмотический потенциал клеточного содержимого листьев снижался почти в два раза, увеличение концентрации NaCl в среде до 75–150 мМ сопровождалось падением осмотического потенциала примерно в три раза по сравнению с контрольными растениями (рис. 5).

Влияние солевого стресса на содержание ионов натрия, калия и кальция в корнях и побегах растений картофеля

Решающую роль в формировании осмотического потенциала клеточного содержимого играют неорганические ионы, прежде всего ионы калия, хотя

в условиях засоления важная роль принадлежит также и ионам натрия. Нами было проанализировано содержание ионов натрия и калия в побегах (надземная часть) и корнях (подземная часть) растений картофеля. Как следует из полученных данных (табл. 3), в отсутствие стрессора содержание натрия в подземной части растений практически в два раза превышало его содержание в надземной части. В ответ на воздействие NaCl на корневую систему, вне зависимости от используемой нами концентрации соли, соотношение ионов натрия в надземной и подземной частях растения принципиально изменялось – уровень натрия в побегах в 1.5 раза превышал его содержание в корнях при 75–125 мМ NaCl в среде и в 2.3 раза – при 150 мМ NaCl (табл. 3).

Представленные в таблице 3 результаты свидетельствуют о том, что при 50 мМ NaCl в питательной среде содержание натрия в надземной части растений увеличивалось в 78 раз, при 75 мМ NaCl – в 114 раз по сравнению с контролем, тогда как последующее повышение интенсивности засоления не приводило к дальнейшим изменениям содержания натрия. При этом содержания натрия в корнях возрастало в 25–45 раз при солевом стрессе различной интенсивности (50–150 мМ NaCl).

Содержание K⁺ в корнях контрольных растений картофеля было на 30% выше его уровня в надземной части (табл. 3). Распределение калия по частям растений в некоторой степени определялось интенсивностью хлоридного засоления. При низких и умеренных концентрациях NaCl (50–100 мМ) в питательной среде различий между побегами и корнями по содержанию калия практически не было. При 125 и 150 мМ NaCl в среде уровень калия в надземной части растений был в 1.7 и 3 раза выше, чем в корнях соответственно. Содержание ионов калия в надземной части растений в ответ на действие 50 мМ NaCl снижалось в 1.7 раза и сохранялось на этом уровне до 100 мМ NaCl в среде; при 125 и 150 мМ NaCl содержание калия незначительно восстанавливалось. В отличие от надземной части, содержание калия в корневой системе снижалось в 1.5 и 2.5 раза при концентрации NaCl в среде 125 и 150 мМ соответственно (табл. 3).

Содержание ионов кальция в побегах *S. tuberosum* в 1.7 раз превышало аналогичный показатель в подземной части растений. Засоление, вне зависимости от действующей концентрации, не вызывало достоверных изменений содержания ионов кальция в надземной части, хотя в корнях содержание кальция увеличивалось на 45–50% при максимальной интенсивности засоления (табл. 3).

Таблица 3. Влияние NaCl (50–150 мМ) на содержание ионов натрия, калия и кальция в побегах и корнях растений *Solanum tuberosum*

NaCl, мМ	Na ⁺ , мг/г		K ⁺ , мг/г		Ca ²⁺ , мг/г	
	Побеги	Корни	Побеги	Корни	Побеги	Корни
0	0.42 ± 0.11	0.82 ± 0.23	35.49 ± 1.23	27.35 ± 1.06	2.91 ± 0.33	1.72 ± 0.12
50	33.50 ± 3.50	22.41 ± 2.00	20.90 ± 3.94	29.69 ± 1.66	2.00 ± 0.59	1.61 ± 0.13
75	48.09 ± 2.56	27.58 ± 1.32	26.91 ± 1.76	30.17 ± 0.64	2.12 ± 0.13	1.52 ± 0.14
100	53.45 ± 9.30	36.17 ± 1.56	25.65 ± 3.43	31.08 ± 2.37	2.14 ± 0.34	1.75 ± 0.20
125	57.30 ± 2.69	37.89 ± 1.90	30.79 ± 1.34	17.94 ± 1.62	2.29 ± 0.37	2.49 ± 0.02
150	60.45 ± 1.95	36.14 ± 0.56	31.60 ± 5.30	10.67 ± 1.22	2.98 ± 0.58	2.54 ± 0.28

Влияние NaCl на аккумуляцию пролина в надземной и подземной частях растений картофеля

При адаптации растений к нарушению водного статуса и к токсическому действию избытка неорганических ионов, прежде всего натрия, важная роль принадлежит совместимым осмолитам, обладающим свойствами химических шаперонов. Нами была выявлена органоспецифичность в накоплении универсального совместимого осмолита пролина в растениях картофеля. Как видно из результатов таблицы 4, содержание данного осмолита в надземной части растений многократно превышало его содержание в подземной части. Содержание пролина в листьях картофеля в нормальных условиях составляло 6.7 мкмоль/г

сырой массы, что почти в 3 раза выше аналогичного показателя в стеблях и в 4.4 раза выше, чем в корнях.

В ответ на слабое засоление (50 мМ NaCl) растения отвечали пятикратным увеличением содержания пролина в листьях и девятикратным увеличением в стеблях. Более интенсивное засоление (NaCl 75 мМ) приводило к увеличению уровня пролина в листьях и стеблях в 11 раз, тогда как повышение интенсивности засоления с 100 до 150 мМ NaCl вызывало увеличение содержания пролина в листьях и стеблях в 18 и 21–32 раза соответственно. Уровень пролина в корнях в ответ на хлоридное засоление изменялся не значительно и, например, при 125 мМ NaCl был в 19 раз ниже, чем в стеблях, и в 38 ниже, чем в листьях (табл. 4).

Таблица 4. Влияние хлоридного засоления различной интенсивности (NaCl 50–150 мМ, 7 дней) на содержание пролина в листьях, стеблях и корнях *Solanum tuberosum*

Вариант	Листья		Стебли		Корни	
	мкМ/г сырой массы	% от контрольного значения	мкМ/г сырой массы	% от контрольного значения	мкМ/г сырой массы	% от контрольного значения
Исходный контроль* NaCl, мМ	5.25 ± 2.25		3.34 ± 0.35		1.54 ± 0.18	
0	6.71 ± 1.04	100	2.35 ± 0.82	100	1.52 ± 0.20	100
50	33.79 ± 3.77	504	20.81 ± 3.64	886	1.23 ± 0.18	81
75	74.91 ± 8.46	1116	26.89 ± 2.16	1144	2.78 ± 0.49	183
100	121.93 ± 9.44	1817	49.23 ± 4.82	2095	3.06 ± 0.41	201
125	124.29 ± 13.07	1852	62.44 ± 9.57	2657	3.29 ± 0.23	217
150	115.98 ± 14.75	1728	77.17 ± 2.44	3284	2.13 ± 0.52	140

*Примечание: исходный контроль – растения картофеля в возрасте 6 недель.

Таблица 5. Влияние засоления различной интенсивности (NaCl, 50–150 мМ, 7 дней) на активность каталазы, пероксидазы и супероксиддисмутазы в растениях *Solanum tuberosum*

NaCl, мМ	Активность супероксиддисмутазы, усл. ед./мг белка	Активность каталазы, мкмоль H ₂ O ₂ /мг белка в мин.	Активность пероксидазы, ммоль гваякола/мг белка в мин
0	61.86 ± 0.81	229.61 ± 11.42	1.76 ± 1.25
50	56.92 ± 3.22	242.45 ± 47.13	3.75 ± 1.32
75	71.13 ± 6.97	245.52 ± 7.61	5.40 ± 3.82
100	81.70 ± 9.95	125.50 ± 8.01	6.66 ± 3.71
125	79.35 ± 1.41	—	2.49 ± 0.91
150	64.22 ± 4.86	—	4.40 ± 2.24

Влияние NaCl на активность антиоксидантных ферментов

Оценка ПОЛ в растениях картофеля показала, что в ответ на засоление (NaCl, 50–150 мМ) интенсивность этого процесса, измеряемая по содержанию малонового диальдегида (МДА) в реакции с тиобарбитуровой кислотой, в листьях возрастала лишь на 20–25% от контроля (данные не приведены).

Слабое увеличение интенсивности окислительного стресса в растениях картофеля при засолении не сопровождалось достоверными изменениями активностей ряда антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза и пероксидаза). Так, суммарная активность СОД была на 15 и 30% выше контрольных значений при 75 мМ и 100–125 мМ NaCl соответственно (табл. 5), хотя четких достоверных различий в активности СОД между вариантами обнаружено не было. Активность каталазы в листьях картофеля в отсутствие стрессора составляла 230 H₂O₂/мг белка в минуту. При слабом засолении (50 и 75 мМ NaCl) она не изменялась, тогда как умеренное засоление (100 мМ) приводило к снижению активности в два раза. Активность гваякол-зависимой пероксидазы имела тенденцию к некоторому увеличению в ответ на действие засоления, но достоверные различия, как и в случае с СОД, отсутствовали (табл. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Совокупность полученных нами экспериментальных данных позволяет обсудить механизмы устойчивости растений картофеля к условиям хлоридного засоления. Как известно, в основе солеустойчивости растений лежит их способность сохранять при засолении водный и ионный гомеостаз, избегать токсического действия высоких концентраций неорганических ионов, прежде всего натрия, и предотвращать развитие окислительного стресса, в основе которого лежит генерация АФК [4, 6].

Растения картофеля с. Луговской обладали выраженной способностью поддерживать водный баланс, о чем свидетельствует сохранение оводненности тканей корня и побега при всех исследованных интенсивностях засоления, хотя при 125 и 150 мМ NaCl в среде, тем не менее, намечалась некоторая тенденция к снижению содержания воды в листьях (табл. 2). Аналогичные результаты были получены на растениях рапса при 175 мМ [9] и злаке ветивере при 300 мМ NaCl [19]. Сохранять водный статус в условиях засоления растение может почти исключительно за счет эффективного функционирования системы осморегуляции. Как следует из полученных нами данных, в ответ на засоление растения картофеля сильно понижали осмотический потенциал клеточного содержимого, который при 50 мМ NaCl в питательной среде снижался в два раза и достигал трехкратного падения при дальнейшем возрастании интенсивности засоления по сравнению с контролем (рис. 5). Это позволяло растению восстанавливать направление градиента водного потенциала между питательной средой и клетками растения и поглощать воду из среды с низким водным потенциалом.

В основе понижения осмотического потенциала клеточного содержимого при засолении лежит способность растения поглощать, прежде всего, ионы натрия и калия из питательной среды [6]. Полученные данные свидетельствуют о том, что в ответ на засоление в корневой системе растений картофеля содержание натрия возрастало в 25–45 раз, тогда как в надземной части в 78–114 раз (табл. 3). Существенно отметить тот факт, что если в контрольных растениях содержание натрия в подземной части в два раза превышало его содержание в надземной, то при солевом стрессе уровень ионов натрия в листьях в 1.5–1.8 раза превосходил его содержание в корнях (табл. 3). Способность гликофитов, в отличие от галофитов, накапливать большое содержание натрия в ассимилирующих органах считается признаком слабой солеустойчивости вида [4, 15], хотя при эффективном функционировании

Таблица 6. Влияние NaCl (50–150 мМ) на способность растений *Solanum tuberosum* к избирательному межорганному транспорту ионов

NaCl, мМ	$S_{K, Na}^{+, +}$ (K^+/Na^+ в побегах)/(K^+/Na^+ в корнях)	$S_{Ca, Na}^{2+, +}$ (Ca^{2+}/Na^+ в побегах)/(Ca^{2+}/Na^+ в корнях)
0	2.92 ± 0.47	8.02 ± 1.57
50	0.38 ± 0.07	0.17 ± 0.05
75	0.52 ± 0.07	0.25 ± 0.05
100	0.97 ± 0.05	1.44 ± 0.25
125	0.81 ± 0.02	0.81 ± 0.19
150	1.09 ± 0.08	1.85 ± 0.38

системы секвестрации ионов натрия из цитоплазмы в центральную вакуоль растения могли бы этим самым предотвращать токсическое действие высокого содержания ионов натрия.

Одной из стратегий адаптации гликофитов к условиям засоления является способность их корневой системы выполнять барьерную функцию на пути поступления ионов натрия в ассимилирующие органы и обеспечивать избирательный транспорт ионов в надземную часть, о чем свидетельствуют показатели $S_{K, Na}^{+, +}$ и $S_{Ca, Na}^{2+, +}$ [19]. Как видно из таблицы 6, при действии 50 и 75 мМ NaCl на растения картофеля значения $S_{K, Na}^{+, +}$ значительно снижались. В отличие от калия, гомеостаз которого не столь сильно нарушался в условиях, по меньшей мере слабого и умеренного засоления, отношение Ca^{2+} к Na^+ в побеге к отношению этих ионов в корне значительно снижалось при всех использованных нами интенсивностях засоления (табл. 6). Это свидетельствует о том, что барьерные механизмы корневой системы растений картофеля, препятствующие поступлению ионов натрия в надземную часть на фоне хлоридного засоления, функционируют в растениях данного сорта не достаточно эффективно.

Способность организма поддерживать гомеостаз ионов калия в условиях солевого стресса считается важным критерием солеустойчивости вида [4, 5]. Вместе с тем многие сорта картофеля вне зависимости от степени устойчивости в ответ на низкие концентрации NaCl (50–75 мМ) снижали уровень ионов калия в листьях и стеблях [15, 16]. Нами показано, что при слабом и среднем засолении (50–100 мМ) содержание ионов калия в побегах снижается, в то время как в подземной части растений их содержание остается на уровне контрольных значений (табл. 3). Высокие концентрации NaCl (125 и 150 мМ) вызывали смещение соотношения ионов калия в надземных и подземных частях растений. При этом уровень K^+ в корнях снижался примерно в три раза, хотя его содержание в побегах соответствовало контрольным значениям (табл. 3).

Следует отметить, что у растений картофеля с Луговской уровень калия в подземных и надземных органах достоверно не отличался, по меньшей мере, в условиях слабого и среднего засоления (табл. 3). Отсутствие значительных различий между содержанием ионов калия в надземной и подземной частях растений отмечено и на некоторых других сортах картофеля [15].

Не смотря на то, что растения картофеля с Луговской не способны эффективно регулировать поступление ионов натрия в ассимилирующие органы, они отвечали на засоление интенсивной органоспецифичной аккумуляцией пролина, прежде всего, в листьях. Так, например, уровень пролина в корнях в ответ на хлоридное засоление изменялся не значительно и, например, при 125 мМ NaCl был в 19 раз ниже, чем в стеблях и в 38 ниже, чем в листьях (табл. 4). Интересно, что не только при стрессе, но и в контрольных условиях содержание пролина в листьях картофеля было в 2.9 раза выше, чем в стеблях и в 4.4 раз выше, чем в корнях (табл. 4). В то же самое время в отличие от растений сорта Луговской, растения с Кеннебек в условиях засоления больше накапливали пролина не в надземной, а в подземной части [25]. Не смотря на то, что способность растений картофеля отвечать на засоление интенсивной аккумуляцией пролина не всегда коррелирует с уровнем его солетолерантности, не вызывает сомнения то, что накопление содержания пролина при стрессе способствует сохранению клеточного гомеостаза. Об этом свидетельствует тот факт, что пролин при стрессе выполняет роль не только осморегулятора, хотя при засолении это крайне важно, но и реализует целый ряд других стресс-протекторных функций, таких как функции химического шаперона, антиоксиданта, регулятора экспрессии стресс-регулируемых генов, источника углерода, азота и восстановительных эквивалентов, вовлекается в регуляцию внутриклеточного рН-стата и т.д.) [26, 27].

Одним из последствий действия засоления на растения является окислительный стресс, связанный,

прежде всего, с нарушениями процессов фотосинтеза и дыхания [8]. Типичным синдромом последнего является снижение уровня хлорофиллов, вызванное увеличением активности хлорофиллазы, что, в свою очередь, вызывает нарушение структуры хлоропласта и дестабилизацию пигмент–белкового комплекса. Показано, что засуха способствует увеличению образования АФК, вызывающих повреждение растений за счет окисления фотосинтетических пигментов [28].

Можно полагать, что интенсивная NaCl-индуцируемая аккумуляция пролина, обладающего выраженными антиоксидантными свойствами, является одной из причин слабого развития окислительного стресса в растениях картофеля. Этим же можно объяснить отсутствие стресс-зависимой активации некоторых антиоксидантных ферментов (табл. 5). Нельзя, тем не менее, исключать, что данный сорт картофеля утратил способность отвечать на солевой стресс активацией антиоксидантных ферментов. В пользу подобного предположения говорит тот факт, что у культивируемого сорта томата при солевом стрессе хлоропластная антиоксидантная система практически не функционировала, тогда как у дикого вида окислительный стресс снимался избирательной активацией компонентов антиоксидантной системы хлоропластов [29].

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что растения картофеля с Луговской обнаруживали при засолении сильное ингибирование ростовых процессов, падение содержания Хл *a* и торможение образования столонов, что свидетельствует о достаточно низкой солеустойчивости сорта. Вместе с тем при слабом и среднем солевом стрессе растения данного сорта сохраняли водный гомеостаз за счет эффективной осморегуляции, активно накапливали пролин, обладающий стресс-протекторным действием, и практически не обнаруживали развития окислительного стресса, что говорит о функционировании важных стресс-индуцируемых защитных механизмов. Анализ полученных нами данных позволяет предположить, что уровень солеустойчивости растений картофеля с Луговской лимитируется по меньшей мере двумя основными причинами (1) недостаточной способностью корневой системы удерживать ионы натрия и обеспечивать избирательный транспорт ионов в надземную часть и (2) низкой эффективностью системы загрузки ионов натрия из цитоплазмы клеток листа в центральную вакуоль с целью внутриклеточной компартментации ионов натрия и снижения их токсического эффекта. В пользу этого свидетельствуют данные Queiroz с соавт. [30], согласно которым активности вакуолярной помпы и Na⁺/H⁺ антипортера были выше в везикулах тонопласта более солеустойчивой

линии картофеля. Отмеченная выше недостаточная эффективность функционирования систем ионного гомеостатирования у растений картофеля с Луговской при солевом стрессе может оказаться в центре внимания молекулярных генетиков, предпринимающих попытки повысить солеустойчивость районированных сортов картофеля.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-16-04057).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. FAO. 2008. FAO Land and Plant Nutrition Management Service. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>
2. USDA-ARS. 2008. Research Databases. Bibliography on Salt Tolerance. *George E. Brown, Jr. Salinity Lab. US Dep. Agric., Agric. Res. Serv. Riverside, CA.* <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8908>
3. *Shahid S.A., Rahman K.* Soil salinity development, classification, assessment, and management in irrigated agriculture // *Handbook of Plant and Crop Stress / Ed. Pessarakli M. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group. 2011. P. 23–38.*
4. *Munns R., Tester M.* Mechanisms of Salinity Tolerance // *Annual Review of Plant Biology. 2008. V. 59. P. 651–681.*
5. *Zhang J.L., Shi H.* Physiological and molecular mechanisms of plant salt tolerance // *Photosynth. Res. 2013. V. 115. P. 1–22.*
6. *Gupta B., Huang B.* Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization // *Int. J. Genom. 2014. P. 1–18.*
7. *Chawla S., Jain S., Jain V.J.* Salinity induced oxidative stress and antioxidant system in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of rice (*Oryza sativa* L.) // *Plant Biochem. Biotechnol. 2013. V. 22. P. 27–34.*
8. *Schmitt Fr.J., Renger G., Friedrich T., Kreslavski V.D., Zharmukhamedov S.K., Los D.A., Kuznetsov V.I., Al-lakhverdiev S.I.* Reactive oxygen species: re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-signaling in phototrophic organisms // *Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1837. P. 835–848.*
9. *Ефимова М.В., Савчук А.Л., Хасан Дж.А.К., Литвиновская Р.П., Хрипач В.А., Холодова В.П., Кузнецов Вл.В.* Физиологические механизмы повышения солеустойчивости растений рапса брассиностероидами // *Физиология растений. 2014. Т. 61. С. 778–789.*
10. *Gao H.-J., Yang H.-Y., Bai J.-P., Liang X.-Y., Lou Y., Zhang J.-L., Wang D., Zhang J.-L., Niu S.-Q., Chen Y.-L.* Ultrastructural and physiological responses of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets to gradient saline stress // *Front. Plant Sci. 2015. V. 5. P. 1–14.*
11. *Кузнецов Вл.В.* Физиологические механизмы адаптации и создание стресс-толерантных трансгенных растений. VII Купревичские чтения “Проблемы экспериментальной ботаники”, отв. редактор

- Н.А. Ламан, НАН Беларуси, Минск: “Тэхналогія”, 2009. С. 5–78.
12. *Ali F., Bano A., Fazal A.* Recent methods of drought stress tolerance in plants // *Plant Growth Regul.* 2017. V. 82. P. 363–375.
 13. *Levy D., Veilleux R.E.* Adaptation of Potato to High Temperatures and Salinity – A Review // *Amer. F. of Potato Res.* 2007. V. 84. P. 487–506.
 14. *Aksoy E., Demirel U., Öztürk Z.N., Çalışkan S., Çalışkan M.E.* Recent advances in potato genomics, transcriptomics, and transgenics under drought and heat stresses // *Turk. J. Bot.* 2015. V. 39. P. 920–940.
 15. *Jaarsma R., de Vries R.S.M., de Boer A.H.* Effect of salt stress on growth, Na⁺ accumulation and proline metabolism in potato (*Solanum tuberosum*) cultivars // *PLOS ONE.* 2013. V. 8. I. 3. e60183.
 16. *Faried H.F., Ayub C.M., Amjad M., Ahmed R.* Salinity impacts ionic, physiological and biochemical attributes in potato // *Pak. J. Agri. Sci.* 2016. V. 53. P. 17–25.
 17. *Ефимова М.В., Мануйлова А.В., Малофий М.К., Карташов А.В., Кузнецов Вл.В.* Защитная роль брассиностероидов при засолении проростков *Brassica napus* L. // *Вестник Томского государственного университета. Биология.* 2013. № 1 (21). С. 118–129.
 18. *Lichtenthaler H.K.* Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // *Methods Enzymol.* 1987. V. 148. P. 350–382.
 19. *Чжоу К., Юй Б. Дж.* Накопление неорганических и органических осмолитов и их роль в осмотической регуляции у проростков *Vetiveria zizanioides* при действии NaCl // *Физиология растений.* 2009. Т. 56. С. 751–758.
 20. *Buege J.A., Aust S.D.* Microsomal lipid peroxidation // *Methods Enzymol.* 1978. V. 52. P. 302–310.
 21. *Beauchamp Ch., Fridovich I.* Superoxide dismutase improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // *Anal. Biochem.* 1971. V. 44. P. 276–287.
 22. *Шевякова Н.И., Стеценко Л.А., Мецержков А.Б., Кузнецов Вл.В.* Изменение активности пероксидазной системы в процессе стресс-индуцированного формирования САМ // *Физиология растений.* 2002. Т. 49. С. 670–677.
 23. *Chance B., Maehly A.C.* Assay of catalase and peroxidases // *Methods Enzymol.* 1955. V. 2. P. 764–775.
 24. *Esen A.* A simple method for quantitative, semiquantitative, and qualitative assay of protein // *Anal. Biochem.* 1978. V. 89. P. 264–273.
 25. *Aghaei K., Ehsanpour A.A., Komatsu S.* Proteome analysis of potato under salt stress // *J. Proteome Res.* 2008. V. 7. P. 4858–4868.
 26. *Кузнецов Вл.В., Шевякова Н.И.* Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // *Физиология растений.* 1999. Т. 46. С. 234–243.
 27. *Szabados L., Savoure A.* Proline: a multifunctional amino acid // *Trends in Plant Sci.* 2009. V. 15. P. 89–97.
 28. *Lotfi R., Gharavi-Kouchebagh P., Khoshvaghti H.* Biochemical and physiological responses of *Brassica napus* plants to humic acid and under water stress // *Rus. J. Plant Physiol.* 2015. V. 62. P. 480–486.
 29. *Mittova V., Tal M., Volokita V., Guy M.* Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species // *Physiologia Plantarum.* 2002. V. 115. P. 393–400.
 30. *Queiros F., Fontes N, Almeida D., Maeshima M., Gerós H., Fidalgo F.* Activity of tonoplast proton pumps and Na⁺/H⁺ exchange in potato cell cultures is modulated by salt // *J. Exp. Bot.* 2009. V. 60. P. 1363–1374.