Министерство науки и высшего образования
Российской Федерации
Томский государственный педагогический университет
Томский государственный университет

ГУМИНОВЫЕ ВЕЩЕСТВА В ВОДАХ БАССЕЙНА РЕКИ УЛУ-ЮЛ. ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ НА РАСТЕНИЯ

КОЛЛЕКТИВНАЯ МОНОГРАФИЯ

Под редакцией

А.В. Куровского и В.Н. Куровского

ВЫПУСК ПЕРВЫЙ

АЛЛОМЕТРИЯ В СИСТЕМЕ КОРЕНЬ/ПОБЕГ

Томск – 2019

Влияние вод рек Улу-Юл и Илиндук на аллометрические соотношения Корень/Побег у пшеницы и томатов

А.В. Куровский, Ю.В. Андреева, Д.В. Брейт, А.С. Шептор, Д.Е. Ромашова, А.Е. Стародубцев, К.А. Петроченко, Ю.Е. Якимов

Аллометрия и аллокация являются понятиями, используемыми в современной экологии для оценки различных стратегий жизнедеятельности и выживания организмов в экстремальных условиях, включая растительные организмы. Аллометрия у растений подразумевает процессы, ведущие к изменению пропорций морфологических и физиологических параметров, а также процессы, обусловленные изменением этих пропорций. С этой точки зрения, растения могут по максимуму использовать ресурсы (в конкретный момент времени) для одних органов, при этом сокращая ресурсы, выделяемые другим органам. Наиболее выразительным примером аллометрии является изменение соотношения между корневой и надземной частью растений [Weiner, 2004]. Отношение длины корня к длине побега далее везде мы обозначаем как «отношение Корень/Побег». Массовое и метрическое соотношение Корень/Побег является чувствительным показателем, отражающим, в том числе, изменения широкого спектра параметров среды. К таким параметрам относятся условия минерального питания растений, количество солнечной радиации, pH почвы и т.д. [Bravo Avila, 2013]. В целом, диапазон возможных аллометрических соотношений в системе корень–побег является одним из показателей экологической пластичности того или иного вида растений. Растения адаптируют свои стратегии распределения биомассы органов к эдафическим и климатическим изменениям в соответствии с гипотезой функционального равновесия [Brassard, 2009]. Уже несколько десятков лет существуют данные о том, что некоторые гуминовые препараты, а также те или иные фракции гуминовых веществ стимулируют корнеобразование у растений. Такие результаты были показаны в экспериментах (включая гидропонные) на огурцах, томатах, герани, бархатцах [Rauthan, 1981 ; The effect of commercial humic acid … , 1998 ; Hartwigsen, 2000].

Целью работы было исследование влияние гуматно-минеральных компонентов вод рек Улу-Юл и Илиндук на соотношение Корень/Побег у пшеницы и томатов в олиготрофных условиях минерального питания.

Методика

Объектами исследования послужили проростки пшеницы сорта Ирень и проростки томата сорта Дачник.

Пшеница яровая сорт Ирень (*Triticum aestivum* L.) урожай 2014 и 2017 гг., полученная из хозяйства ИП Орищенко В.П.

Раннеспелый и урожайный сорт, вегетационный период которого составляет 70–80 дней. По результатам конкурсного сортоиспытания сорт пшеницы яровой Ирень включен в Государственный реестр с 1998 г. Районирован по регионам: Северный, Северо-Западный, Центральный, Волго-Вятский, Уральский, Западносибирский, Восточносибирский. Среднеустойчив к мучнистой росе, восприимчив к септориозу, корневым гнилям, стеблевой ржавчине. Сильно восприимчив к пыльной и твердой головне, бурой ржавчине. Требуются протравливание семян, фунгицидные обработки в период вегетации. Масса 1000 зерен 35–42 г. Средняя урожайность 38–23,6 ц/га.

Томат (*Lycopersicon esculentum* Mill.) – наиболее технологичный и приспособленный для культивирования вид.

Сорт Дачник. Год включения в реестр допущенных: 1999. Включен в Госреестр по Северокавказскому региону для выращивания в открытом грунте. Рекомендуется для использования в свежем виде. Раннеспелый. Растение детерминантное, полураскидистое, средневетвистое, среднеоблиственное. Лист среднего размера, зеленый. Соцветие простое. Плодоножка с сочленением. Плод плоскоокруглый, красный. Число гнезд более 4-х. Масса плода 55–93 г. Вкусовые качества свежих плодов хорошие. Содержание сухого вещества в соке 5,6 %, общего сахара 3,3 %, аскорбиновой кислоты 17,1 мг на 100 г сырого вещества. Урожайность товарных плодов 251–347 ц/га, у стандартов Агата и Непрядва 222–346 ц/га, урожайность за первую декаду плодоношения 50–134 ц/га, на уровне, или на 19 ц/га выше стандартов. Максимальная урожайность 358 ц/га, на 70 ц/га выше стандарта Агата (Краснодарский край). Выход товарной продукции 74–100 %. Устойчив к фузариозу и вершинной гнили. Ценность сорта: раннеспелость, стабильная урожайность, отличные вкусовые качества, устойчивость к болезням [Госсорткомиссия, 2019].

В стеклянные чашки Петри диаметром 90 мм закладывали по 25 семян пшеницы на фильтровальную бумагу, которую смачивали 7-ю миллилитрами среды прорастания. Для контрольной группы средой прорастания была дистиллированная вода, для опытных групп – соответствующие объемы проб воды, отобранной из рек Улу-Юл и

Илиндук. Такие среды прорастания использовались и для пшеницы, и для томата. Закрытые крышками чашки Петри с семенами пшеницы заворачивали в пищевую пленку, помещали в суховоздушный термостат и инкубировали в течение 48 часов при температуре 25±0,1 °С. По окончании двухсуточного экспозиции в термостате из каждого образца (чашки Петри) отбирали по 10 визуально близких по размеру и средних по размеру проростков. Далее проростки помещали в специальные вегетационные сосуды, состоящие из 2-х частей: внешнего стакана и внутреннего стакана меньшего размера с 10-ю отверстиями (2 мм в диаметре) по окружности дна (Рисунок 3.1).

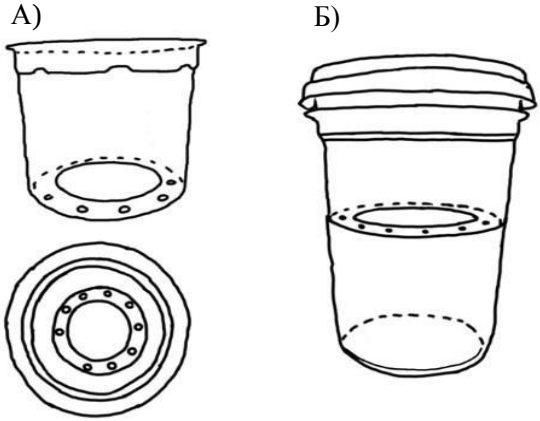

Рисунок 3.1 – Схема вегетационного сосуда для гидропонного культивирования проростков пшеницы (выполнено А.Е. Стародубцевым)
Примечания: А) – внутренний стакан в двух проекциях; Б) – вегетационный сосуд в сборе

Большой стакан заполняли питательным раствором. Уровень раствора подбирался так, чтобы отверстия на дне внутреннего стакана были заполнены жидкостью. Обычно объем раствора в подготовленном для высадки растений сосуде варьировал в диапазоне 290–310 мл. Между отверстиями поочередно выкладывали проростки пшеницы. При этом корешки проростков лежали на дне внутреннего стакана, непосредственно контактируя с питательным раствором, про-

ступающим через отверстия (Рисунок 3.2). Корешки в отверстия искусственно не направляли, процесс проникновения корешков в отверстия и дальнейшее прорастание в глубь раствора осуществлялись естественным образом.

Семена томата сорта Дачник проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной 10 мл среды прорастания. Семена равномерно раскладывали на фильтровальную бумагу, уложенную на дно чашки Петри. Количество семян в каждой чашке Петри – 25 шт., количество чашек Петри (повторностей) – 4. Все чашки Петри закрывались крышками, снабженными отметками о варианте опыта, его дате и времени постановки.

Рисунок 3.2 – Двухсуточные проростки семян пшеницы сорта Ирень уложенные на дно вегетационного сосуда (фото Д.Е. Ромашовой)

Чашки Петри заматывались в пищевую пленку или целлофановые пакеты для предотвращения потери влаги и ставились в термостат при 25±0,1℃ на 96 часов.

По окончании первоначальной четырехсуточной экспозиции проросшие семена томата подвергались первоначальному визуальному отбору: для дальнейшего культивирования брали проростки с доста-

точно хорошо развитыми первичными корешками длиной около полутора см. Отобранные таким образом проростки высаживали в гидропонные сосуды, на так называемые плотики (плавающие пенопластовые пластины с отверстиями диаметром 2 мм для корней). Полный объем гидропонного сосуда составлял 220 мл, объем питательного раствора под плотиком – 150 мл (Рисунки 3.3, 3.4).

Гидропонные сосуды с двухсуточными проростками пшеницы и четырехсуточными проростками томата помещали в малогабаритную фитокамеру для гидропонного культивирования. Культивирование проростков пшеницы и томата осуществлялось в течение 14 суток, после чего растения извлекали из сосудов для последующей морфометрии.

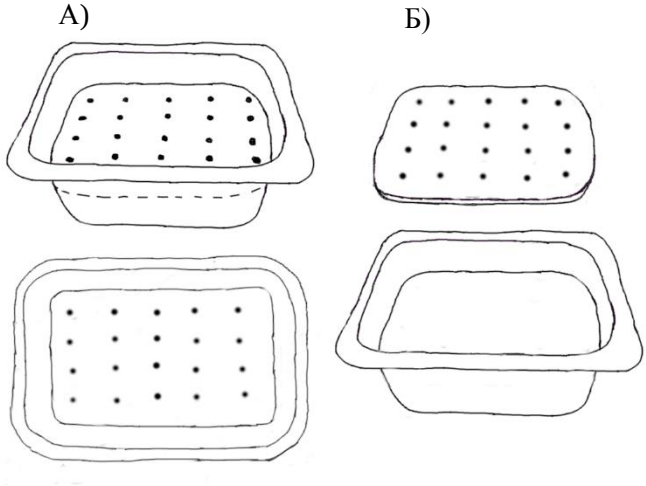

Рисунок 3.3 – Схема вегетационного сосуда для гидропонного культивирования проростков томата (выполнено А.Е. Стародубцевым)
Примечания: А) – сосуд в сборе в двух проекциях; Б) – сосуд и плотик по отдельности

Малогабаритная фитокамера представляла собой металлическую площадку на лабораторном столе площадью 1 м^2, по периметру которой были установлены шесть эбонитовых светильников со светодиодными лампами. Каждая лампа имела мощность 15 Вт, что соответствует мощности лампы накаливания 135 Вт. Световой поток одной лампы – 1350 лм. Таким образом общий световой поток установки составлял 8100 лм.

Цветовая температура ламп – 3000 К. Светоустановка была снабжена механическим таймером, обеспечивающим постоянство режима день/ночь – 16 часов/8 часов. Температура в помещении с установленной фотокамерой поддерживалась в пределах 20–22°С посредством регулирования системы климат-контроля.

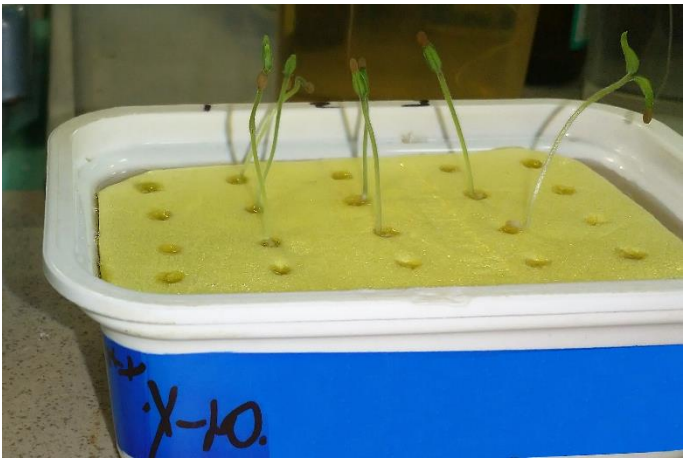

Рисунок 3.4 – Вегетационный сосуд в фитокамере с культивируемыми проростками томата (фото А.В. Куровского)

Схемы экспериментов для пшеницы и томата отличались.

Проростки пшеницы в серии экспериментов, проводимых на протяжении четырех лет (2015–2018 гг.) культивировались на четырех типах сред: пробы воды р. Улу-Юл, пробы воды р. Илиндук, дистиллированная вода (контроль 1), разбавленный раствор Хьюитта (контроль 2). Разбавление раствора Хьюитта производили до выравнивания электропроводности исследуемой речной воды и самого раствора Хьюитта. Например, если весенняя вода рек Улу-Юли и Илиндук имела электропроводность на уровне 25 μS/см, то в питательный раствор Хьюитта доливали дистиллированную воду до тех пор, пока его электропроводность не становилась такой-же. С учетом обычной электропроводности раствора Хьюитта (1700 μS/см), степень разведения в приведенном примере была почти 70-ти кратной.

Главная цель экспериментов на пшенице заключалась в получении массива феноменологических результатов относительно общих

аллометрических эффектов воздействия исследуемых вод. Поэтому в монографии приводятся усредненные статистические данные измерений соотношения Корень/Побег, без учета сезонности забора проб воды. Результаты с учетом сезонности и некоторых других факторов будут представлены в последующих публикациях.

В экспериментах на растениях томата, кроме выявления общих закономерностей, мы преследовали цели, связанные с выяснением сезонной динамики воздействия гуминово-минеральных компонентов исследуемых речных вод на проростки и сравнения зафиксированных эффектов с эффектами известных гуминовых препаратов (на примере Гумостима). Исходя из этого, в 2018 г. было проведено 4 серии культивирования проростков томата на водах рек Улу-Юл и Илиндук. Каждая серия соответствовала определенным срокам отбора проб речной воды, – от весеннего половодья до конца летней межени. Для изучения эффектов Гумостима семена томата замачивались (согласно прилагаемой инструкции) на 24 часа в 0,001%-м растворе Гумостима. После замачивания и прорастания проростки культивировались в гидропонных сосудах с раствором Хьюитта, выровненным по электропроводности с исследуемой речной водой.

После окончания культивирования были проведены измерения длины побегов и длины корней для каждого проростка пшеницы и томата. Эта процедура была выполнена посредством метода компьютерной морфометрии с использованием цифровой фотографии проростков, выложенных на темную ткань и популярного программного обеспечения ImageJ [ImageJ, 2019]. Для калибровки изображений использовалась линейка точностью 0,5 мм.

ImageJ – программа с открытым исходным кодом для анализа и обработки изображений. Написана на языке Java сотрудниками National Institutes of Health и распространяется без лицензионных ограничений как общественное достояние. Программа может отображать, анализировать, обрабатывать, печатать 8, 16, 32-битные изображения. Распознает распространенные форматы изображений включая TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS. Есть возможность калибровки, поэтому широко применяется в биомедицинских исследованиях, астрономии, географии и других дисциплинах, связанных с анализом изображений. Позволяет выполнять геометрические преобразования, такие, как масштабирование (от 32:1 и до 1:32), поворот. Все функции анализа и обработки доступны с любым коэффициентом увеличения. Программа поддерживает любое количество окон (изображений) одновременно,

ограниченное только доступной оперативной памятью. Используется в качестве альтернативы платному ПО. В мировой практике в научных исследованиях ПО ImageJ используется для компьютерной морфометрии в области физиологии и экотоксикологии растений [Antibiotic effects on seed ... , 2018 ; Involvement of glutathione ... , 2016 ; Identification and characterization … , 2015].

Несмотря на то, что существует возможность установки плагинов, для расширения возможностей программы, связанных, прежде всего, с автоматизацией процессов измерения, один из самых простых алгоритмов компьютерной морфометрии макрообъектов (в том числе, – растений) реализуется штатными возможностями ImageJ. Этот алгоритм в краткой форме приводится ниже и иллюстрируется рисунками 3.5–3.7.

1. Для начала работы командами File – Open находили нужное изображение (фотографию группы проростков на темном фоне с калибровочной линейкой) и открывали его в программе (Рисунок 3.5).

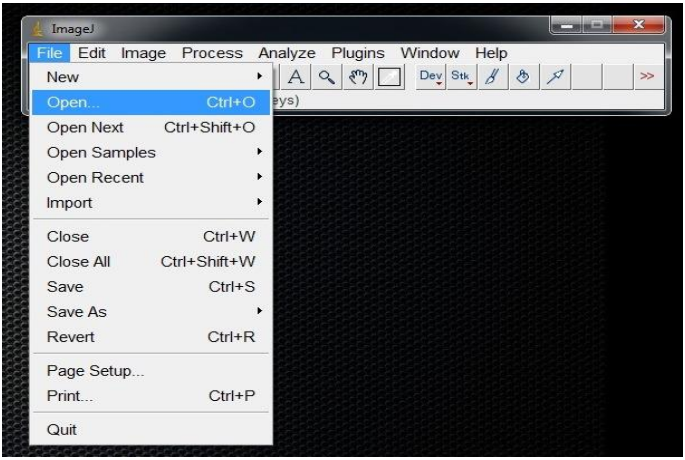

Рисунок 3.5 – Интерфейс программы Image J и команды меню для выбора и открытия анализируемого изображения

2. Для калибровки масштаба снимка правой кнопкой мыши выбирали инструмент Straight line, и желтым вектором с помощью левой кнопки мыши выделяли отрезок длиной 10 сантиметров на калибровочной линейке (Рисунок 3.6). Далее

в верхней строке меню выбирали команды Analyze и (в раскрывающемся списке) Set Scale и устанавливали масштаб шкалы. В поле Known distance вводили значение 10, а в поле Unit of length – обозначение «cm» (последнее необязательно). Нажатием на кнопку OK завершали процесс установки шкалы и калибровки изображения.

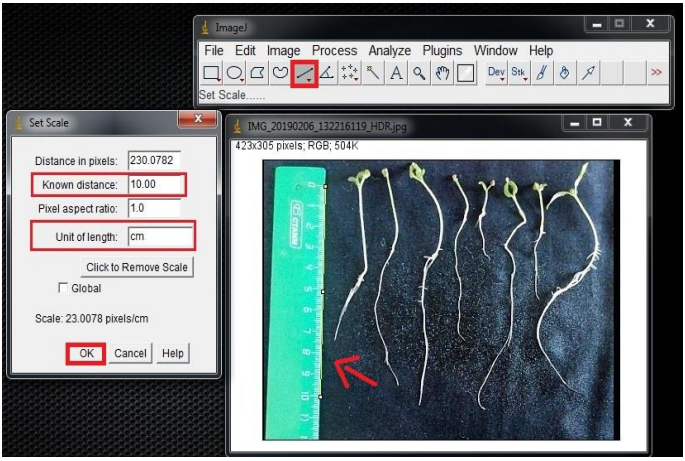

Рисунок 3.6 – Калибровка масштаба изображения в программе ImageJ с помощью инструмента установки шкалы в диалоговом окне Set scale

Примечания: красным квадратом в меню (верхний блок интерфейса) выделена пиктограмма Line с выбранным инструментом Straight line – прямая линия; красной стрелкой отмечен фрагмент изображения калибровочной линейки (калибровочный отрезок) с нанесенным векторным выделением

3. Для измерения длин корней и побегов растений (в данном примере – это проростки томата) во вкладке Line в раскрывающемся списке правой кнопкой мыши выбирали инструмент Segmented line (Рисунок 3.7). Данный инструмент позволяет сегментировано измерять длину, учитывая все изгибы криволинейных объектов. С помощью элементов векторной графики (линии на прямых отрезках и маркеры на изломах) выделяли необходимый элемент (корень или побег проростка)

на изображении. Результат измерения фиксировали с помощью сочетания клавиш Ctrl+M, либо в строке каскадом команд Analyze – Measure. Результат каждого одиночного измерения автоматически сохранялся в таблицу данных, которая, в свою очередь, автоматически дополнялась по мере набора измерений.

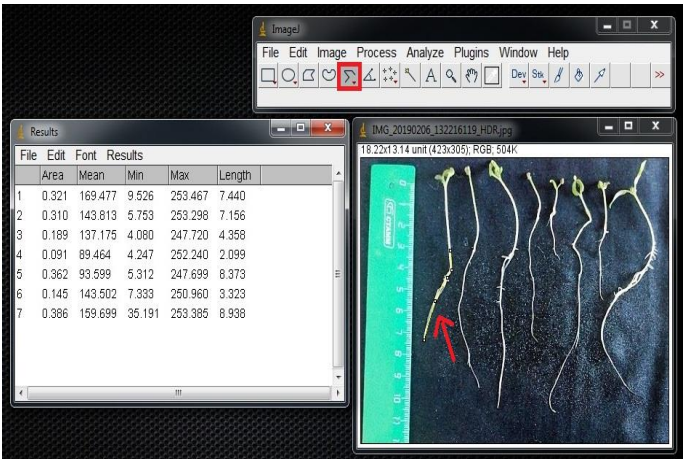

Рисунок 3.7 – Измерение длины корня растения с помощью инструмента Segmented line и таблица с результатами измерений

Примечания: красным прямоугольником в меню (верхний блок интерфейса) выделена пиктограмма Line с выбранным инструментом Segmented line – сегментированная линия; красной стрелкой отмечен фрагмент изображения проростка томата с нанесенным векторным выделением

4. По окончании измерений всех объектов на анализируемом изображении таблицу с данными сохраняли для дальнейшей обработки результатов с помощью стандартной процедуры: File – Save as – выбор имени файла.
5. По умолчанию таблица данных сохранялась с расширением .xls, но, при этом представляла собой текстовый файл с разделителями (CSV-файл). Поскольку первичную статисти-

ческую обработку данных мы осуществляли в табличном редакторе MS Excel, исходный файл преобразовывали в формат Excel. Это осуществлялось открытием исходного CSV-файла в редакторе MS Excel (предупреждение программы о несоответствии типа открываемой таблицы данным Excel игнорировали) и сохранением его в формате книги MS Excel.

6. Доработка сохраненной книги Excel заключалась в удалении ненужных для анализа полей (столбцов). Оставляли только столбец Length, (Рисунок 3.7). Кроме того, разделители десятичных чисел, присутствующие в таблице по умолчанию, – точки, заменяли на разделители, свойственные русскоязычным интерфейсам электронных таблиц, – запятые. Эта процедура осуществлялась автоматически с использованием команд меню Найти и Заменить.
7. В подготовленной таблице осуществляли первичную статистическую обработку данных – вычисление средних арифметических и описательных статистик.

С целью выяснения природы зафиксированных аллометрических эффектов, связанных с удлинением корней, было решено провести анализ митотической активности клеток корневой меристемы проростков томата. Это должно было, хотя-бы частично, пролить свет на то, по какому механизму идёт это удлинение. Для определения митотического индекса в клетках корневой меристемы томата использовалась методика Смирнова Ю.А. [1968]. Семена томата проращивались в контрольных и экспериментальных средах, как было описано выше. По истечении 96 часов проростки фиксировались в холодном растворе Карнуа для остановки митоза. Для приготовления препаратов корешки, обсушенные на фильтровальной бумаге, погружали на 20 минут в 4% раствор железоаммонийных квасцов, затем снова обсушивали на фильтровальной бумаге и погружали в краситель ацетогематоксилин. Раствор красителя с корешками разогревали на газовой горелке до кипения. Корешки вынимали и погружали в дистиллированную воду. На предметном стекле в капле насыщенного раствора хлоралгидрата отсоединяли апикальную часть корня. Делили ее на 2–3 кусочка и, накрыв покровным стеклом, аккуратно раздавливали их так, чтобы клетки легли в один слой. Таким образом получали давленный препарат (Рисунок 3.8). Препараты исследовали при помощи светового микроскопа Primo Star (Carl Zeiss, Германия) при увеличении 100х с иммерсией.

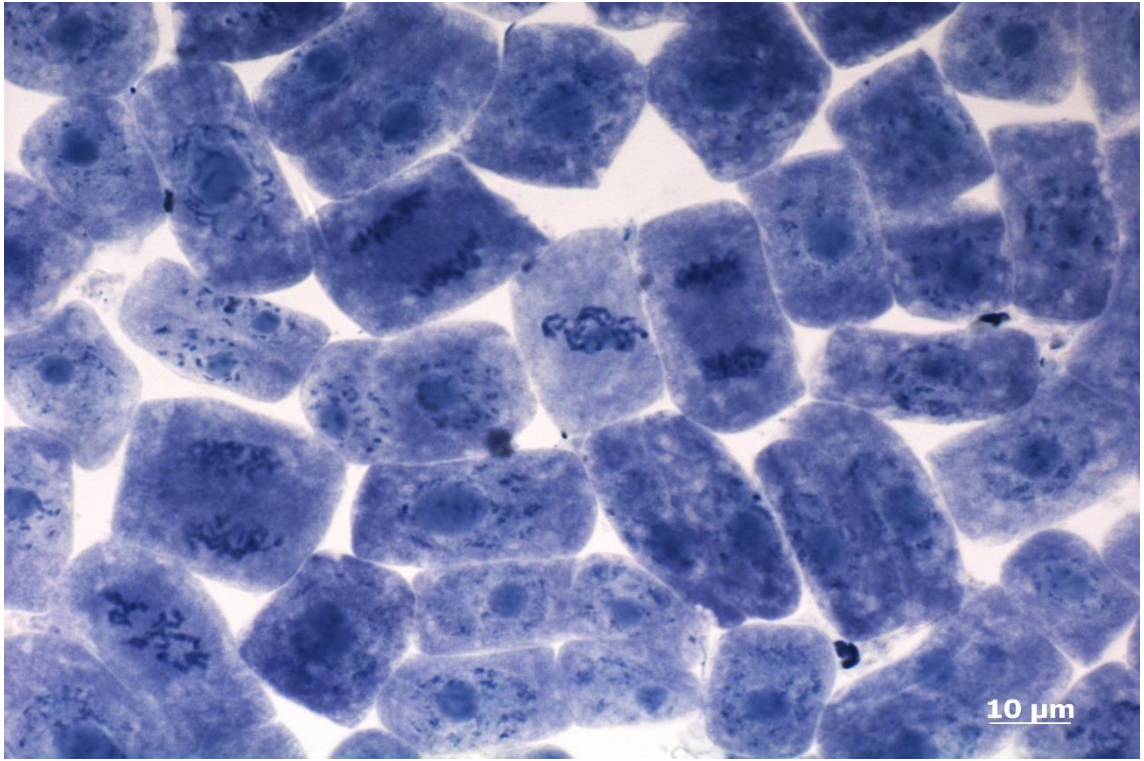

Рисунок 3.8 – Давленный препарат клеток корневой меристемы 96-часового проростка томата для определения митотического индекса (фото Ю.В. Андреевой)

Производился подсчет делящихся и неделящихся клеток, не менее 500 на препарат. Рассчитывали митотический индекс (MI, %) по формуле: $MI = \frac{P+M+A+T}{N} * 100,$

где $P + M + A + T$ — сумма клеток, находящихся на стадии профазы, метафазы, анафазы и телофазы, соответственно, N – общее число проанализированных клеток [Паушева, 1988].

Объем каждой из всех анализируемых выборок был не менее 10 единичных наблюдений. Все эксперименты были проведены в 4–7 повторностях, исходя из минимальных требований к объёму выборок, анализируемых методами параметрической статистики. Анализ на нормальность всех исследуемых выборок, проведенный по модифицированному критерию Шапиро-Уилка [Лемешко, 2005], не противоречил применению параметрических критериев статистики.

Совокупность, использованных в работе статистических методов включала в себя:

1. Вычисление средних арифметических и 95-% доверительных интервалов для среднего арифметического.

2. Сравнение двух средних арифметических с использованием критерия Стьюдента для независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

3. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Влияние фактора считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

4. Корреляционный анализ.

На всех диаграммах данные представлены в виде средних арифметических и 95-% доверительных интервалов.

Все указанные статистические процедуры проводились в табличном редакторе Microsoft Excel 2013, и прикладном пакете программ STATISTICA, сетевая версия 7.0.

Результаты и обсуждение

На рисунках 3.9–3.11 отображены результаты анализа морфометрических характеристик 14-суточных проростков пшеницы, выращенных на воде малых рек западной Сибири Илиндук и Улу-Юл, за весь период отбора воды в 2018 г. (5 мая – 26 октября). Для сравнения на все графики (для пшеницы и томата) добавлены показатели проростков, выращенных на контрольных растворах. На рисунке 3.9 видно, что длина корней проростков, культивируемых на питательном растворе Хьюитта и речных водах статистически значимо больше, чем длина корней в варианте с дистиллированной водой (здесь и далее обозначение данного варианта – «Дист. вода»).

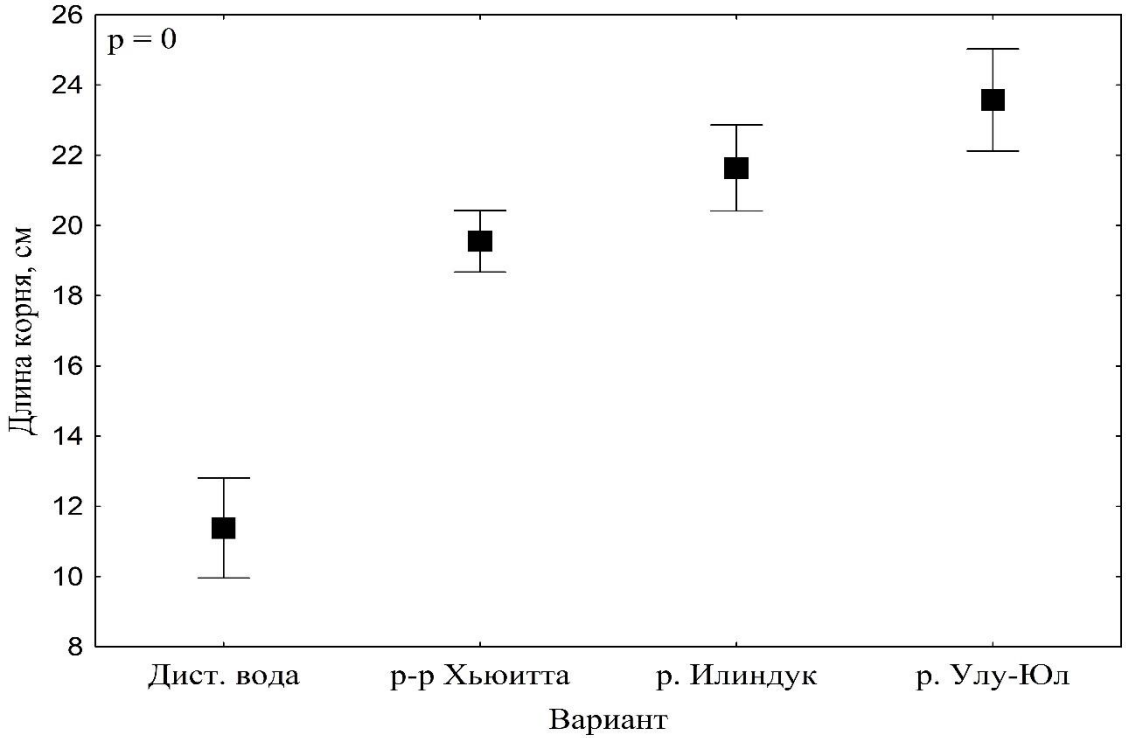

Рисунок 3.9 – Длина корней 14-суточных проростков пшеницы сорта Ирень при культивировании на контрольных растворах и воде рек Илиндук и Улу-Юл

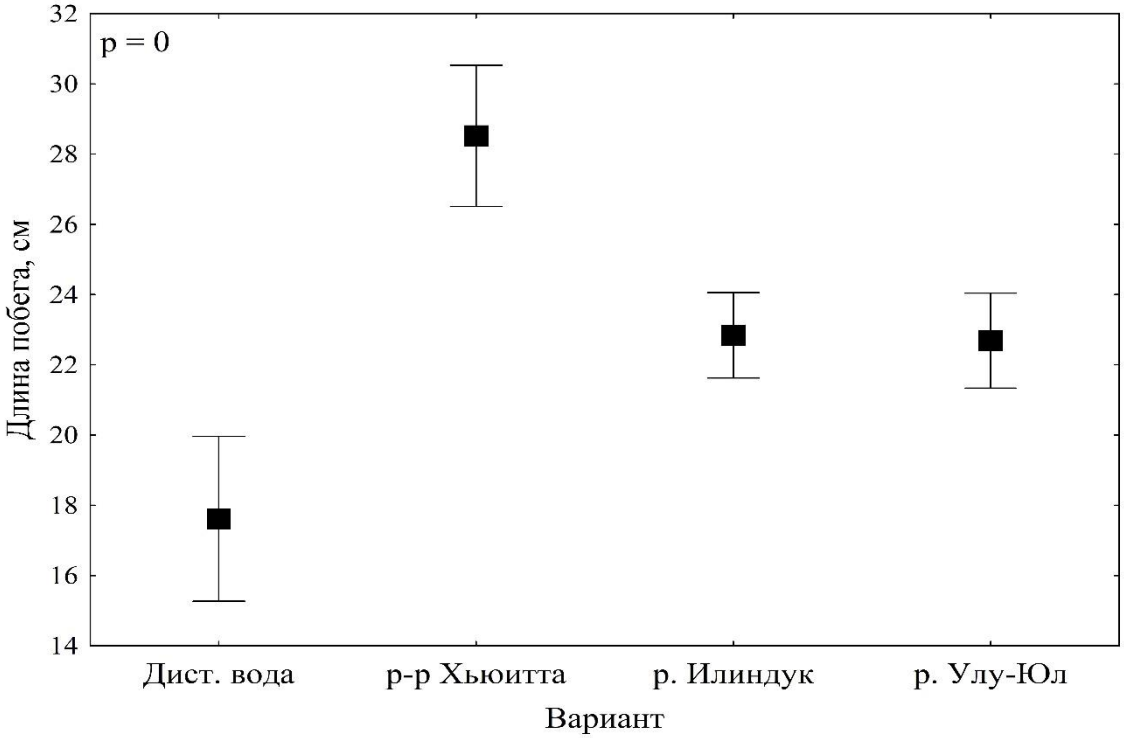

Рисунок 3.10 – Длина побегов 14-суточных проростков пшеницы сорта Ирень при культивировании на контрольных растворах и воде рек Илиндук и Улу-Юл

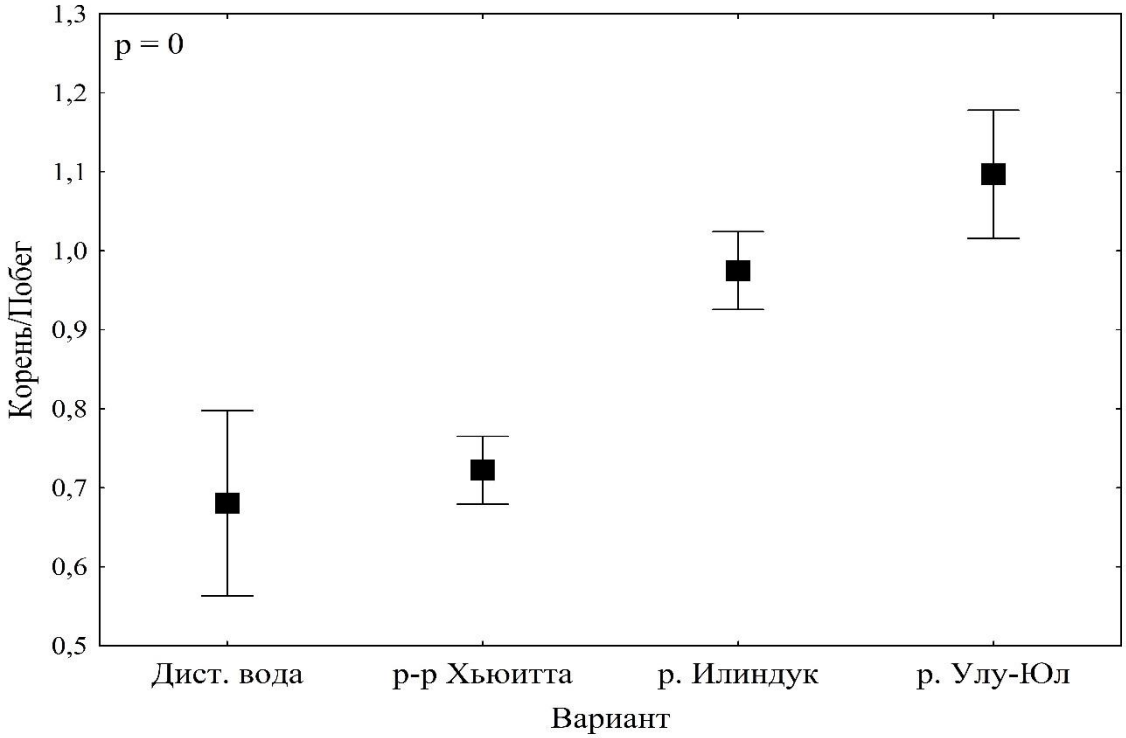

Рисунок 3.11 – Отношение Корень/Побег у 14-суточных проростков пшеницы сорта Ирень при культивировании на контрольных растворах и воде рек Илиндук и Улу-Юл

При этом образцы, полученные после культивирования проростков на речной воде, по исследуемому показателю превосходили проростки контрольных вариантов. Средняя длина корней проростков пшеницы, культивируемых на пробах воды р. Илиндук составила 21,64 см, для проростков, культивируемых на пробах воды реки Улу-Юл – 23,57 см. Оба значения достоверно отличались от значения показателя для вариантов с питательным раствором Хьюитта (19,55 см) и дистиллированной водой (11,38 см).

Длина побегов пшеницы, выращенных на дистиллированной воде, характеризовалась наименьшим средним значением, – 17,61 см (Рисунок 3.10). Средняя длина побегов у проростков, культивируемых на водах рек Илиндук и Улу-Юл была практически одинаковой, – 22,84 и 22,69 см, соответственно. Наибольшим значением исследуемого показателя характеризовались проростки пшеницы, культивируемые на питательном растворе Хьюитта – 28,52 см.

По показателю Корень/Побег 14-суточные проростки пшеницы сорта Ирень в вариантах с контрольными растворами показали практически одинаковые результаты: 0,68 в варианте с водой р. Илиндук и 0,72 в варианте с водой р. Улу-Юл (Рисунок 3.11). В свою очередь и опытные варианты характеризовались очень близкими значениями отношения Корень/Побег у проростков: 0,97 в варианте с водой р. Илиндук и 1,1 в варианте с водой р. Улу-Юл. Значение исследуемого показателя было статистически значимо выше в группе опытных вариантов по сравнению с группой контрольных вариантов (Рисунок 3.11).

Таким образом, исследуемая речная вода способствовала росту корней у проростков пшеницы. В контрольных вариантах аллометрическое соотношение Корень/Побег для пшеницы исследуемого сорта характеризовалось доминированием побегов по отношению к корням. Культивирование проростков пшеницы на пробах вод рек Илиндук и Улу-Юл приводило к исчезновению такого доминирования, что выражалось в практически одинаковых значениях средней длины корней и побегов в обоих опытных вариантах. Здесь следует отметить, что аллометрия в пользу побега у пшеницы возможно усиливается по мере улучшения условий минерального питания. Это наглядно демонстрирует фотография 5-суточных проростков пшеницы из серии экспериментов, проведенных в 2015 г. (Рисунок 3.12). На тех, первоначальных, этапах нашей работы в качестве второго контроля использовался не разбавленный, а полноценный раствор Хьюитта.

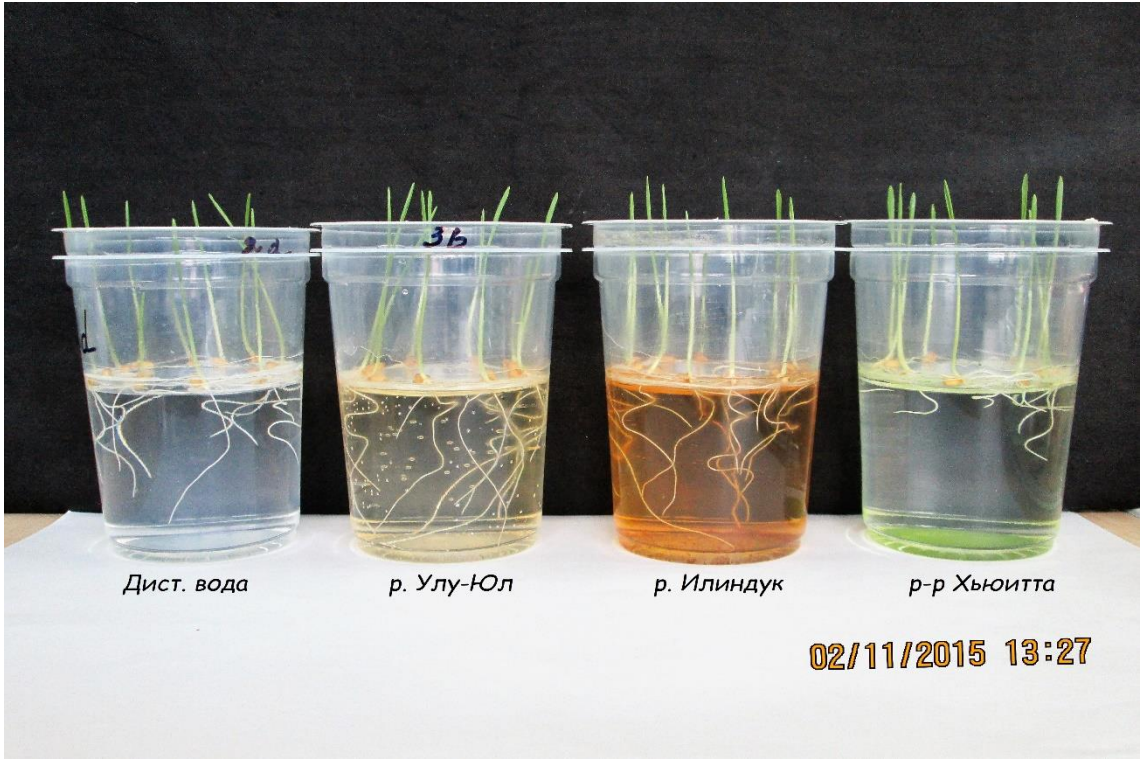

Рисунок 3.12 – 5-суточные проростки пшеницы сорта Ирень при культивировании на контрольных растворах и воде рек Илиндук и Улу-Юл (фото А.В. Куровского)

В экспериментах на проростках томата по выявлению сезонной динамики эффектов гуминово-минеральных компонентов исследуемых речных вод были использованы пробы воды рек Илиндук и Улу-Юл, отобранные 2 мая, 27 мая, 15 июля и 23 августа 2018 г, что соответствовало пику и спаду весеннего половодья, середине и окончанию летней межени.

На рисунках 3.13 – 3.24 представлены результаты анализа морфометрических показателей 14-суточных проростков томата по окончании культивирования на исследуемых образцах речной воды и контрольных средах.

Из рисунка 3.13 видно, что средняя длина корней растений томата, культивируемых в течение 14 суток на разных питательных растворах для вариантов выращенных на первых весенних образцах вод рек Илиндук и Улу-Юл составила 15,61 см и 15,64 см, соответственно, что можно считать абсолютно одинаковыми значениями. Средняя длина корней проростков, выращенных на дистиллированной воде, была почти в 2 раза меньше (8,21 см), а на питательном растворе Хьюитта еще меньше – около 6 см. Таким образом, средняя длина образовавшихся корней проростков томата, выращенных на речной воде статистически значимо, двукратно превышала значения аналогичного показателя для контрольных вариантов.

На длину побегов исследуемая вода не оказывала значимого влияния (Рисунок 3.14). Во всех вариантах этот параметр характеризовался близкими значениями и варьировал в диапазоне 4,5–5,5 см.

Аллометрическое соотношение Корень/Побег (Рисунок 3.15) для растений томата, выращенных на образцах речной воды, характеризовалось средними значениями от 3 до 3,5. В варианте с дистиллированной водой этот показатель составил 1,7, а в варианте с низко концентрированным раствором Хьюитта – около 1. Различия между опытом и контролем статистически значимы.

При выращивании исследуемых растений на образцах воды, собранных в фазу завершения весеннего половодья (конец мая 2018 г.), наблюдалось существенное изменение в соотношении морфометрических показателей между опытными и контрольными вариантами (Рисунок 3.16). Так длина корней 14-суточных проростков томата не обнаружила статистически значимых отличий от контрольного варианта на дистиллированной воде.

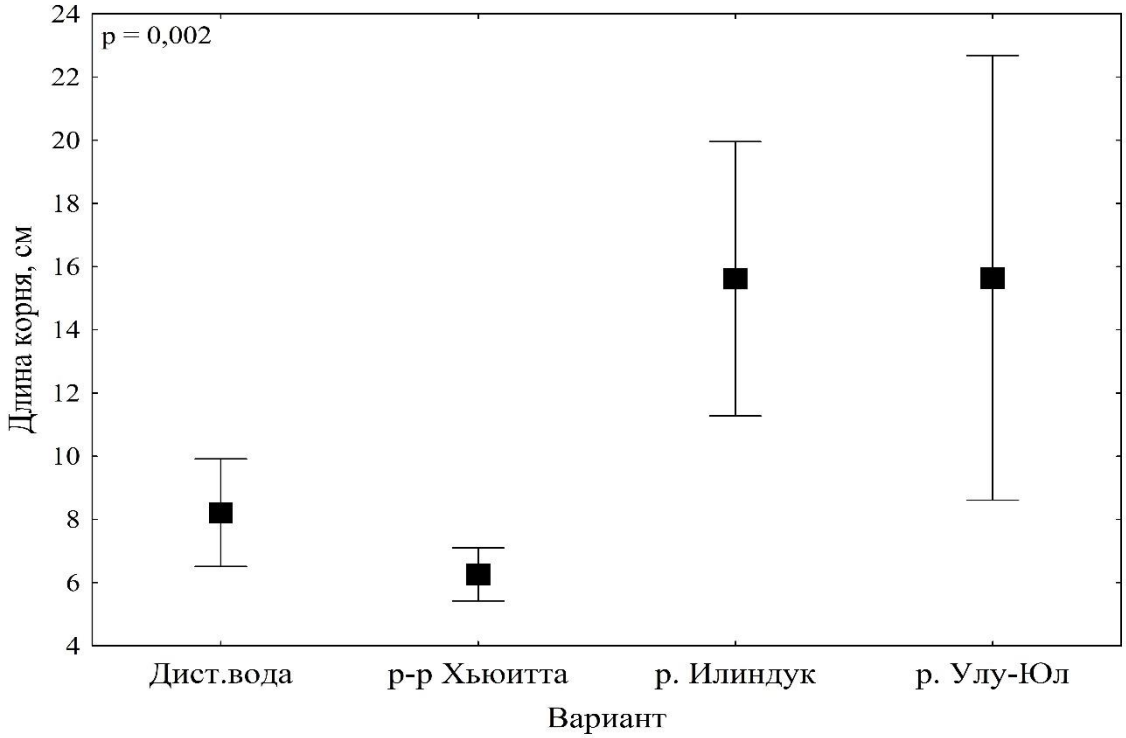

Рисунок 3.13 – Длина корней 14-суточных проростков томата сорта Дачник при культивировании на контрольных растворах и воде рек Илиндук и Улу-Юл (пробы от 2 мая 2018 г.)

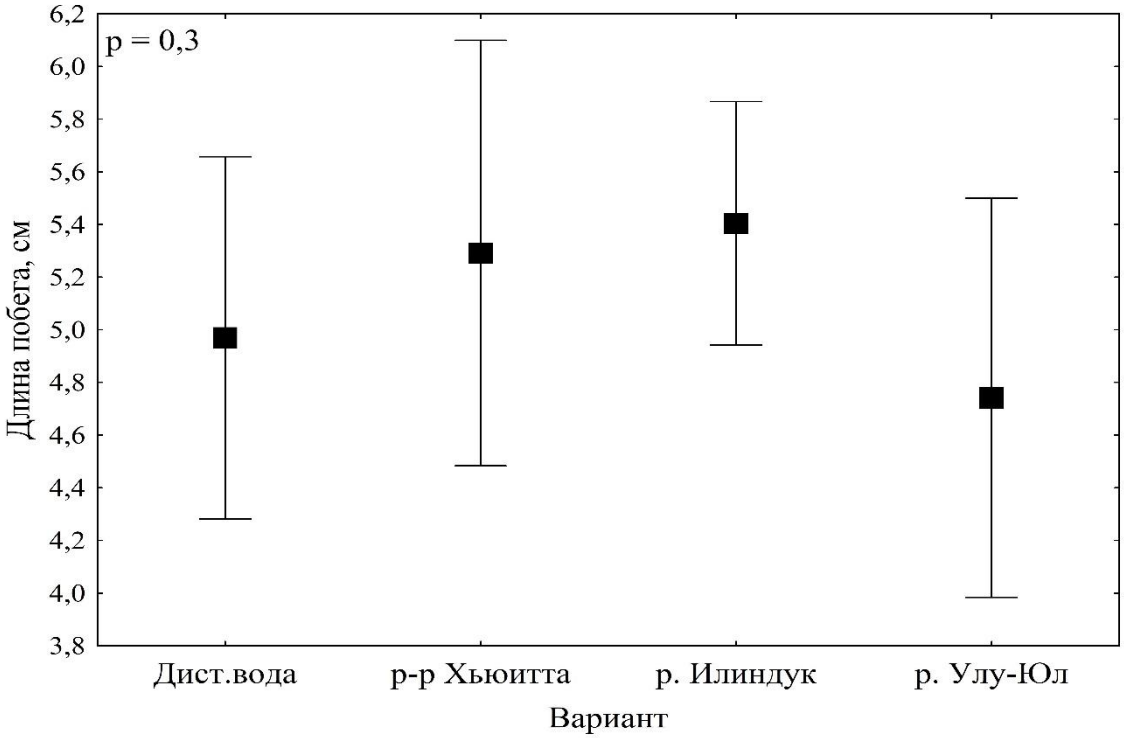

Рисунок 3.14 – Длина побегов 14-суточных проростков томата сорта Дачник при культивировании на контрольных растворах и воде рек Илиндук и Улу-Юл (пробы от 2 мая 2018 г.)

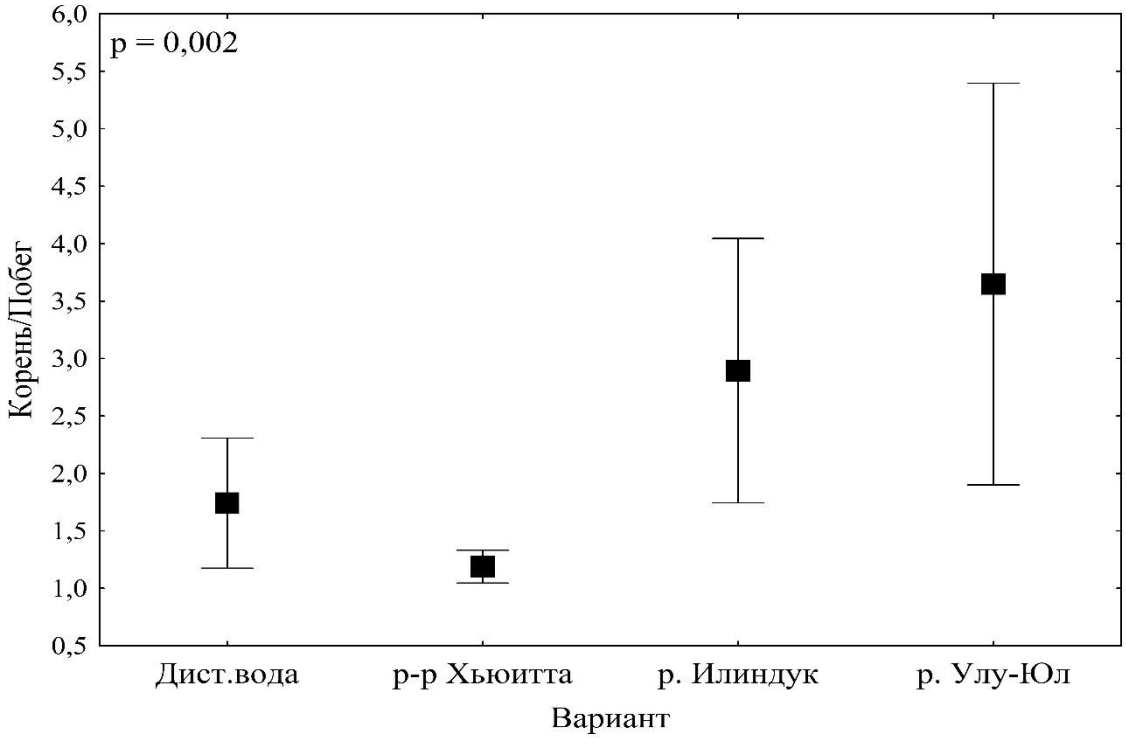

Рисунок 3.15 – Отношение Корень/Побег у 14-суточных проростков томата сорта Дачник при культивировании на контрольных растворах и воде рек Илиндук и Улу-Юл (пробы от 2 мая 2018 г.)

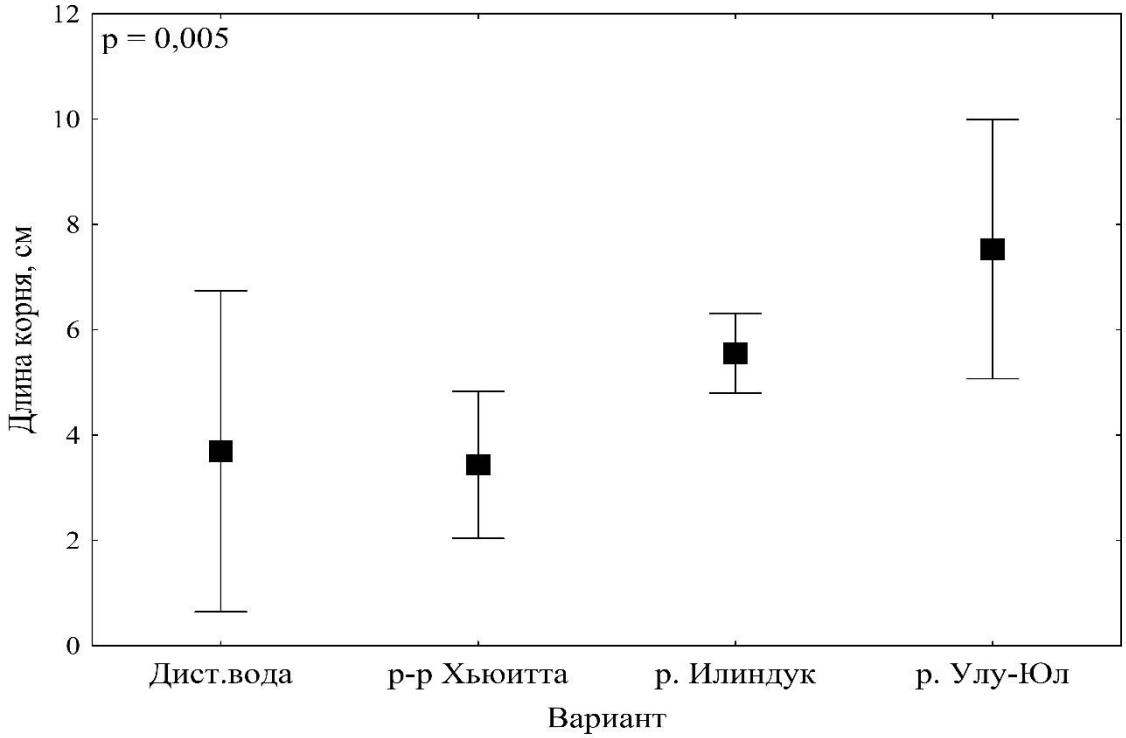

Рисунок 3.16 – Длина корней 14-суточных проростков томата сорта Дачник при культивировании на контрольных растворах и воде рек Илиндук и Улу-Юл (пробы от 27 мая 2018 г.)

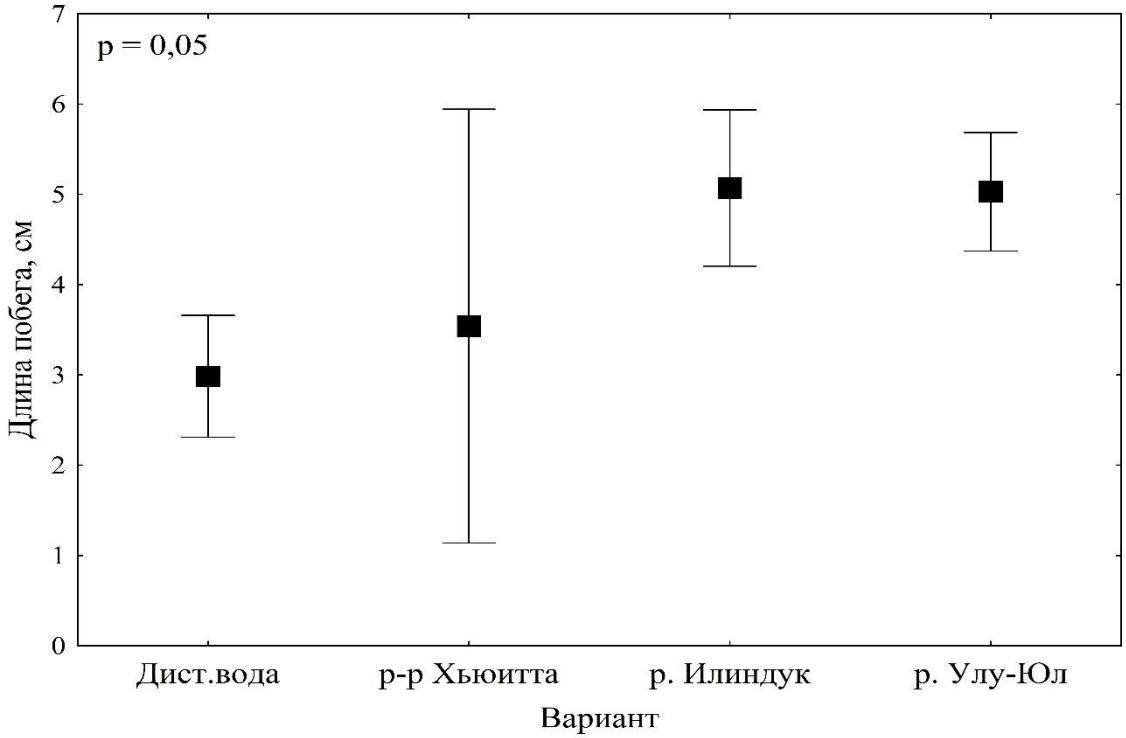

Рисунок 3.17 – Длина побегов 14-суточных проростков томата сорта Дачник при культивировании на контрольных растворах и воде рек Илиндук и Улу-Юл (пробы от 27 мая 2018 г.)

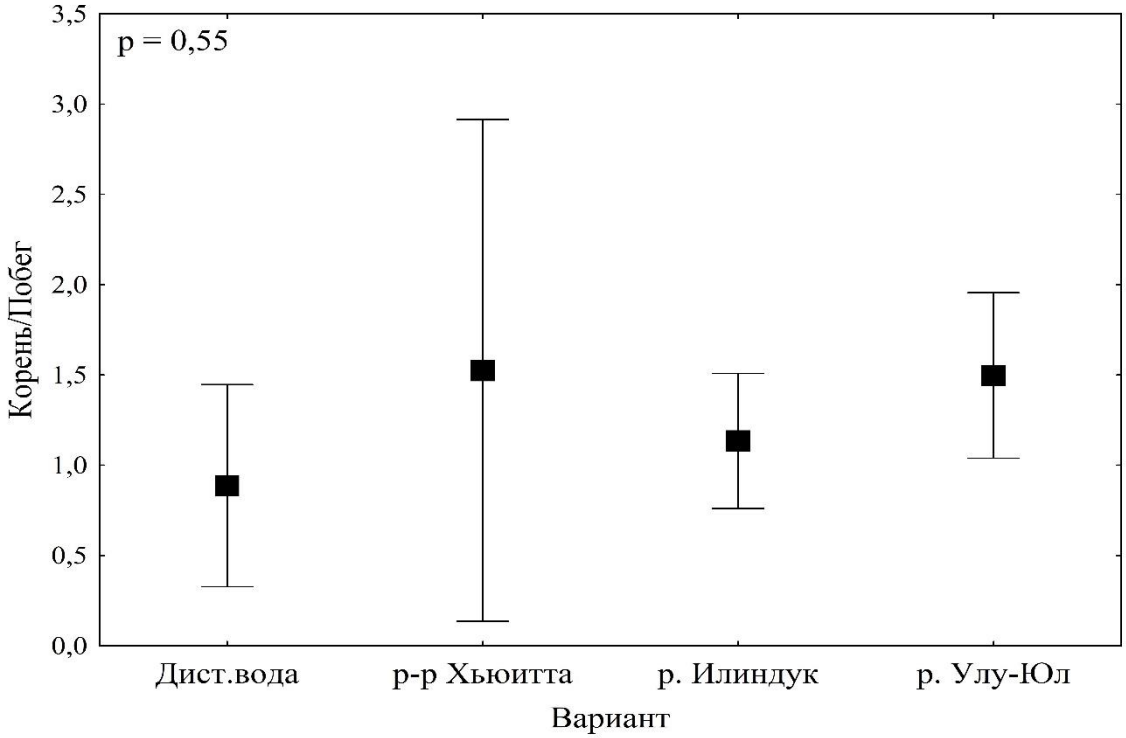

Рисунок 3.18 – Отношение Корень/Побег у 14-суточных проростков томата сорта Дачник при культивировании на контрольных растворах и воде рек Илиндук и Улу-Юл (пробы от 27 мая 2018 г.)

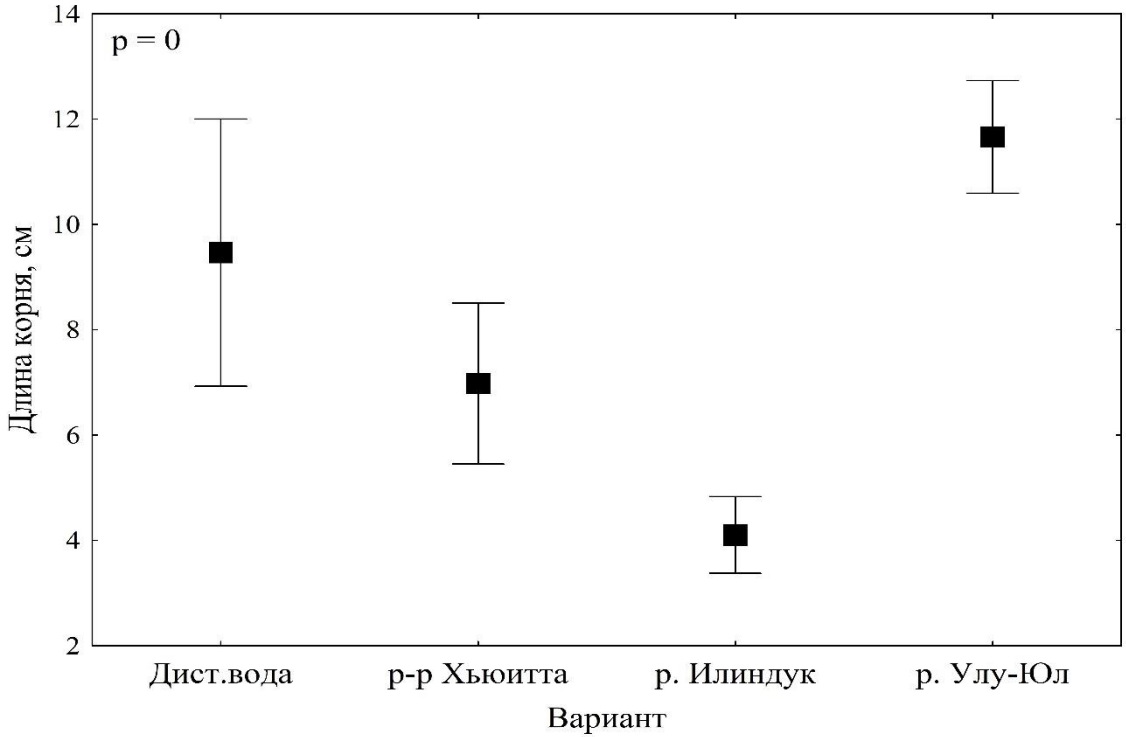

Рисунок 3.19 – Длина корней 14-суточных проростков томата сорта Дачник при культивировании на контрольных растворах и воде рек Илиндук и Улу-Юл (пробы от 15 июля 2018 г.)

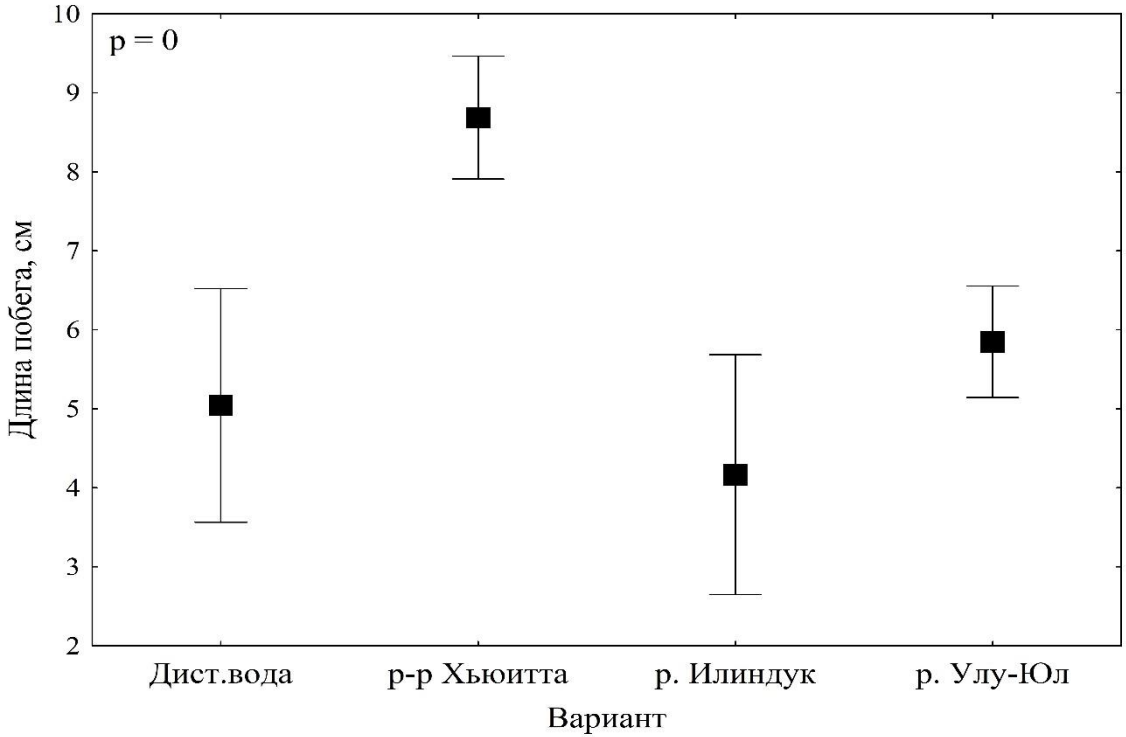

Рисунок 3.20 – Длина побегов 14-суточных проростков томата сорта Дачник при культивировании на контрольных растворах и воде рек Илиндук и Улу-Юл (пробы от 15 июля 2018 г.)

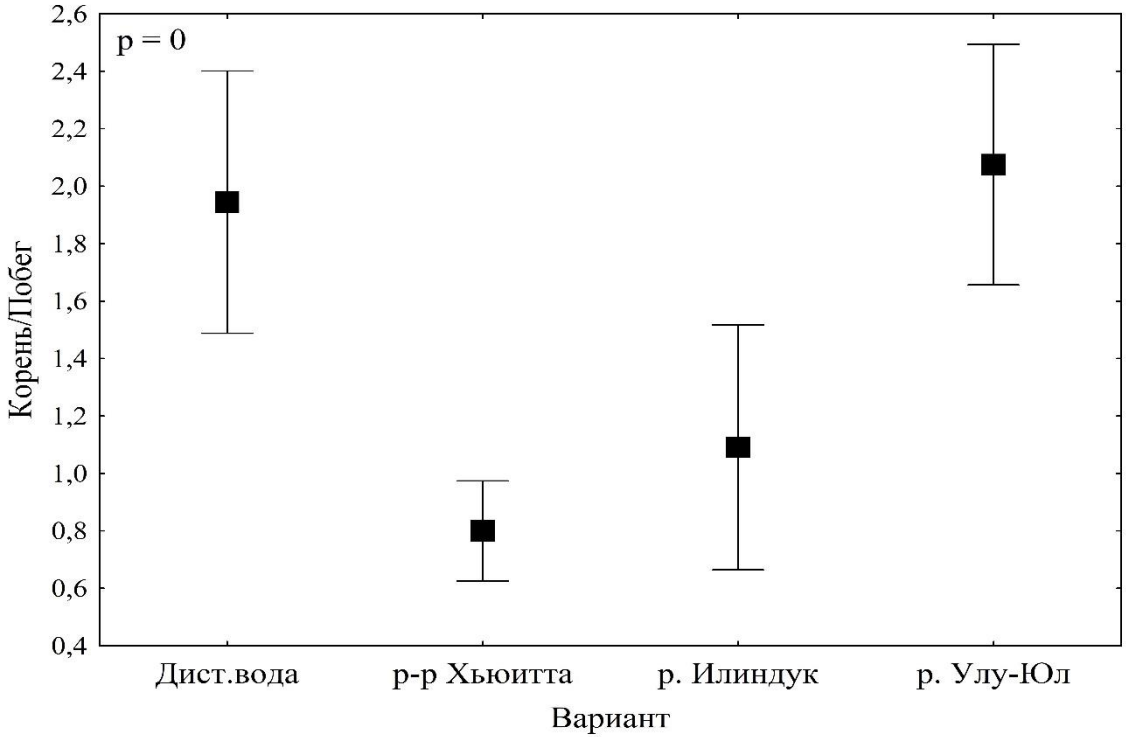

Рисунок 3.21 – Отношение Корень/Побег у 14-суточных проростков томата сорта Дачник при культивировании на контрольных растворах и воде рек Илиндук и Улу-Юл (пробы от 15 июля 2018 г.)

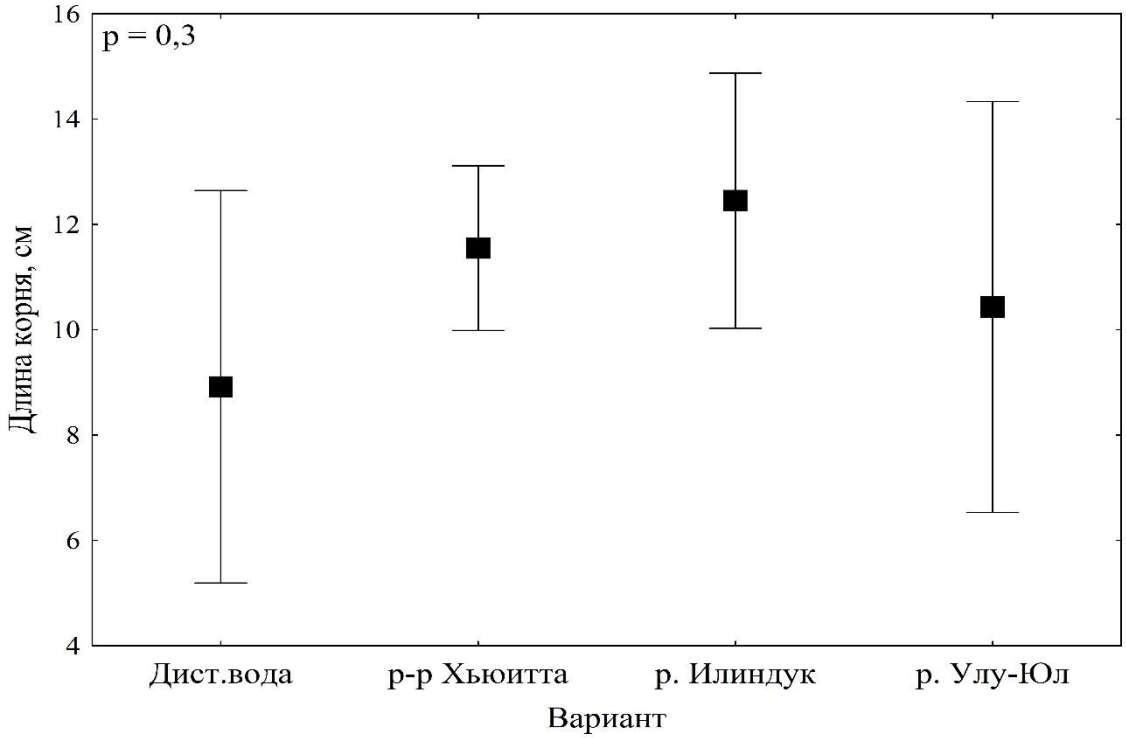

Рисунок 3.22 – Длина корней 14-суточных проростков томата сорта Дачник при культивировании на контрольных растворах и воде рек Илиндук и Улу-Юл (пробы от 23 августа 2018 г.)

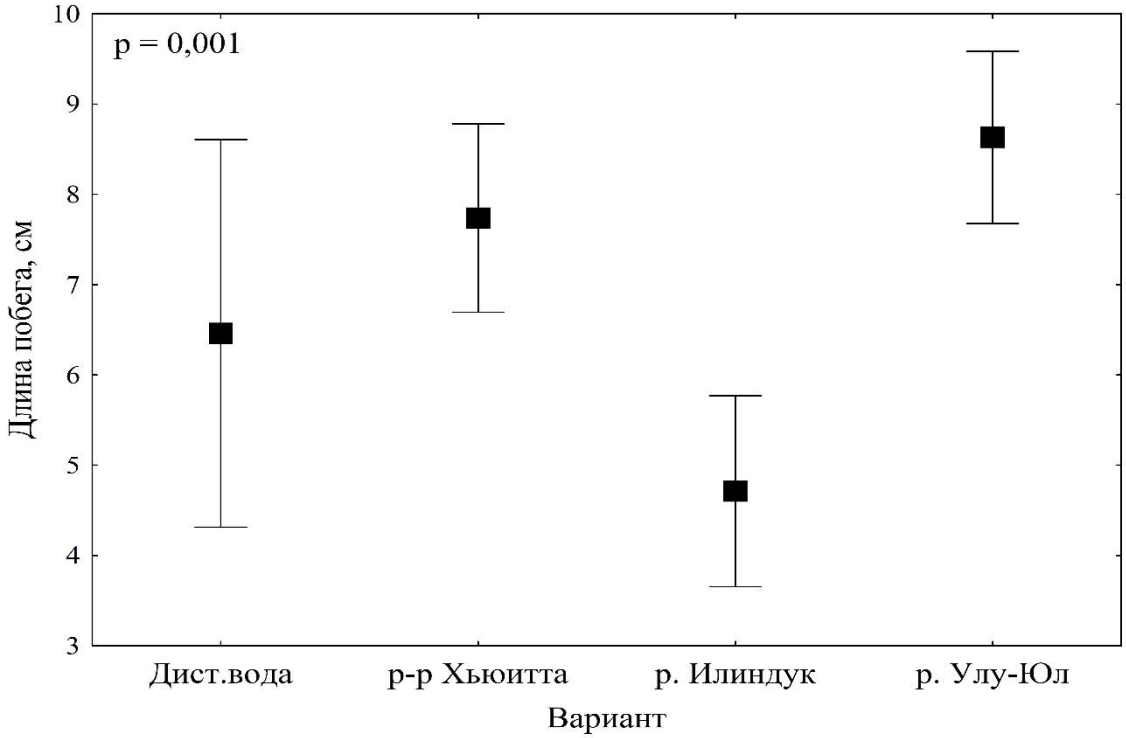

Рисунок 3.23 – Длина побегов 14-суточных проростков томата сорта Дачник при культивировании на контрольных растворах и воде рек Илиндук и Улу-Юл (пробы от 23 августа 2018 г.)

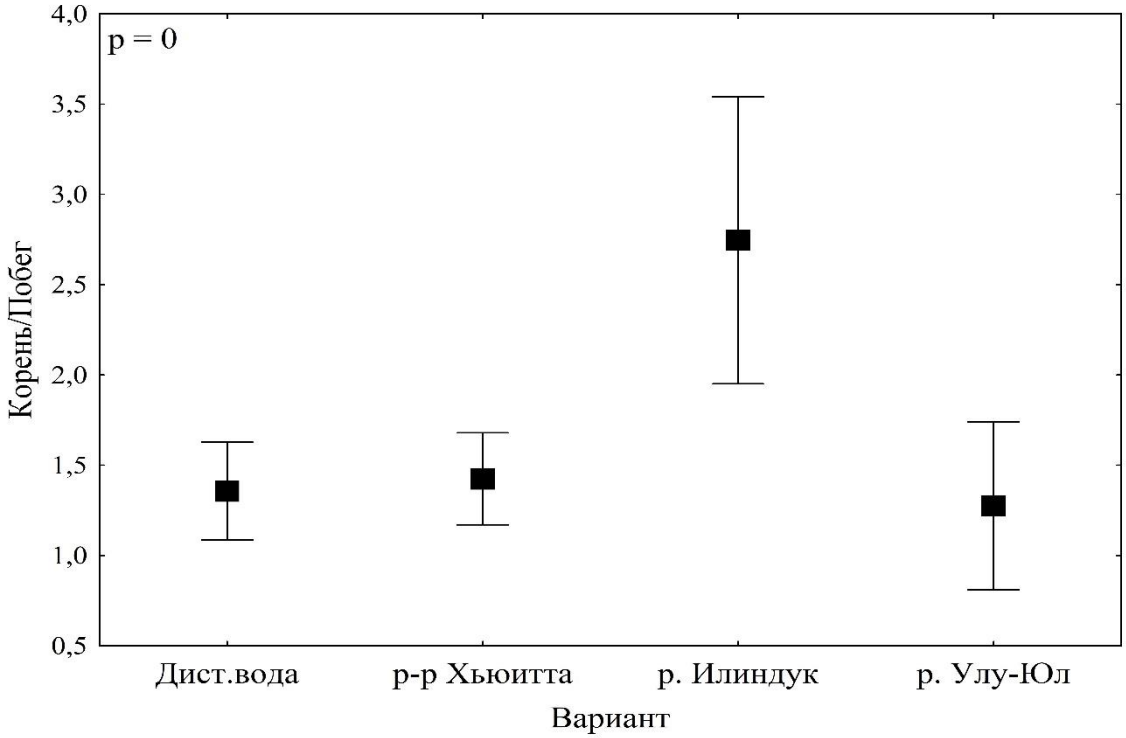

Рисунок 3.24 – Отношение Корень/Побег у 14-суточных проростков томата сорта Дачник при культивировании на контрольных растворах и воде рек Илиндук и Улу-Юл (пробы от 23 августа 2018 г.)

Среднее значение длины корней в данном варианте составило 3,7 см, в то время как среднее значение для вариантов с образцами воды из рек Илиндук и Улу-Юл – 5,5 и 7,5 см, соответственно. Эти значения показывают явную тенденцию к превышению исследуемого показателя в экспериментальных вариантах по сравнению с контролем, но, как уже было указано выше, это превышение не достоверно (возможно, как следствие достаточно высокой дисперсии данных в анализируемых совокупностях). По сравнению с контрольным вариантом, представленным низко концентрированным раствором Хьюитта, длина корней проростков томатов в экспериментальных вариантах была по-прежнему достоверно больше (Рисунок 3.16).

Средняя длина побегов томатов по окончании двухнедельного культивирования на образцах речной воды, собранных в поздневесенний период, практически не отличалась между вариантами с водами двух рек и варьировала в пределах 5,0–5,4 см (Рисунок 3.17). Эти значения были статистически значимо выше, чем средняя длина побегов в контроле с дистиллированной водой (около 3-х см). Достоверных различий по сравнению с контролем на растворе Хьюитта не зафиксировано.

В данном эксперименте практически отсутствовали различия между вариантами в соотношении Корень/Побег (Рисунок 3.18). Значения показателя варьировали слабо и находились в диапазоне 1–1,5.

Длина корней проростков томатов после экспозиции на пробах речной воды, собранной в середине летнего сезона 2018 года, продемонстрировала разделение на два обособленных, статистически отличающихся друг от друга кластера (Рисунок 3.19). В больший кластер попали контрольный вариант с дистиллированной водой (средняя длина корней 9,5 см) и экспериментальный вариант с водой реки Улу-Юл (11,7 см). В меньшем кластере оказались контрольный вариант с раствором Хьюитта (7 см) и опыт с водой реки Илиндук (4,2 см). Последний вариант статистически значимо отличался от всех остальных вариантов.

Длина побегов в трех группах из четырех не обнаружила достоверных различий и варьировало в пределах 4–6 см (Рисунок 3.20). И только в контроле с раствором Хьюитта значение этого показателя (8,7 см) было статистически значимо выше, чем в остальных группах.

Различия в аллометрическом соотношении Корень/Побег полностью соответствовали различиям в длине образовавшихся корней (Рисунки 3.19, 3.21).

Достоверные отличия в длине образовавшихся корней проростков томата, культивируемых на пробах речной воды, отобранных в начальную фазу завершения вегетационного сезона в естественных экосистемах исследуемого региона, не зафиксированы (Рисунок 3.22). Длина побегов в двух контрольных вариантах значимо не различалась. В то же время два опытных варианта статистически значимо отличались по изучаемому показателю: 8,6 см для варианта с водой реки Улу-Юл и 4,7 см для варианта с водой реки Илиндук (Рисунок 3.23).

Аллометрическое соотношение Корень/Побег для растений томата, выращенных на пробах воды реки Илиндук, составило 2,75 (Рисунок 3.24) и статистически значимо, почти двукратно превышало такое же соотношение в остальных вариантах (1,3–1,5).

Таким образом, статистически значимое положительное влияние вод обеих исследуемых рек на корнеобразование и аллометрическое отношение Корень/Побег проростков томатов было зафиксировано только для образцов речной воды, отобранных в период пика весеннего половодья (2 мая). Однако усреднение наблюдаемых эффектов по всему периоду отбора проб, объединение двух опытных групп в одну, общую для рек Илиндук и Улу-Юл, и восьмикратное увеличение объема выборок вследствие этого усреднения приводили к надежному подтверждению выводов о стимулировании корнеобразования у проростков томата и увеличении аллометрического отношения Корень/Побег под действием исследуемой речной воды. Результаты этого анализа, совмещенные с эффектами замачивания семян томата в растворе патентованного препарата Гумостим, представлены на рисунках 3.25–3.27. Объединенная опытная группа обозначена как «Речная вода». Было показано статистически значимое, практически двукратное превышение длины корня растений томата, выращенных в речной воде, по сравнению с остальными вариантами (Рисунок 3.25). Длина корней растений томата при культивировании на пробах речной волы составила в среднем 10,17 см. Длина корней проростков, выращенных из семян, обработанных Гумостимом, была в два раза меньше (5,09 см), что статистически значимо не отличалось от показателей в контрольных группах (5,94 см для варианта с дистиллированной водой и 4,86 см для варианта с питательным раствором Хьюитта), выровненным по электропроводности с речной водой.

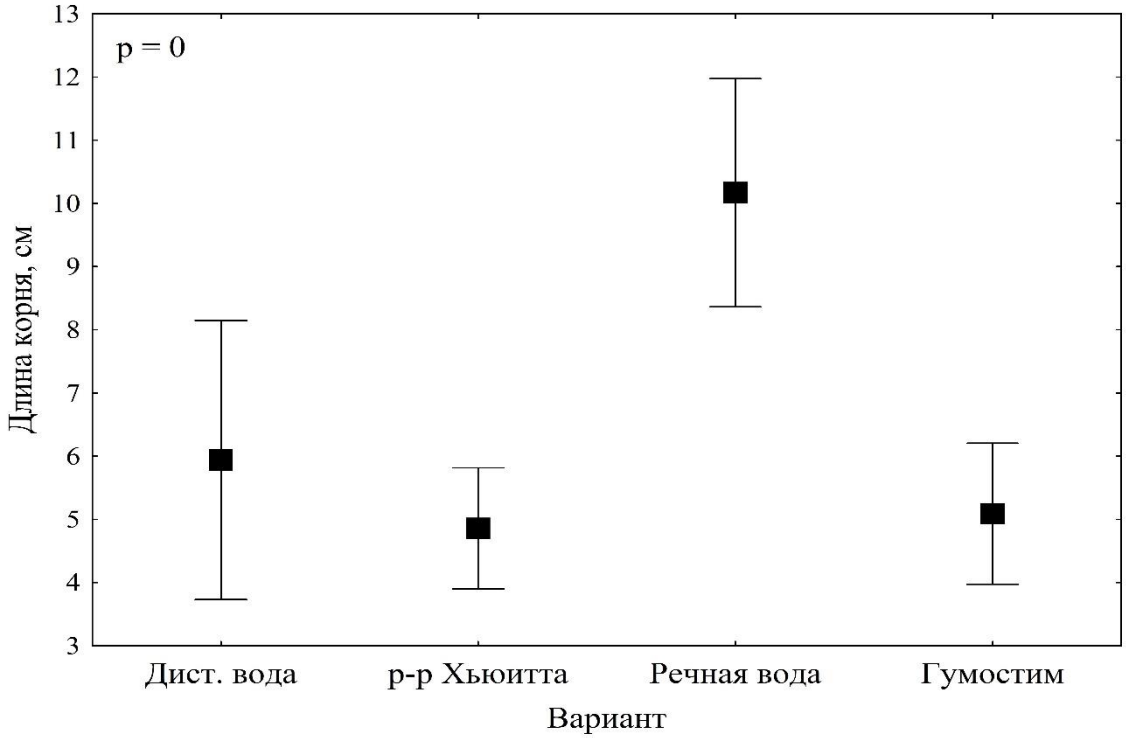

Рисунок 3.25 – Длина корней 14-суточных проростков томата сорта Дачник при культивировании на воде рек Илиндук и Улу-Юл и на растворе Хьюитта после обработки семян препаратом Гумостим

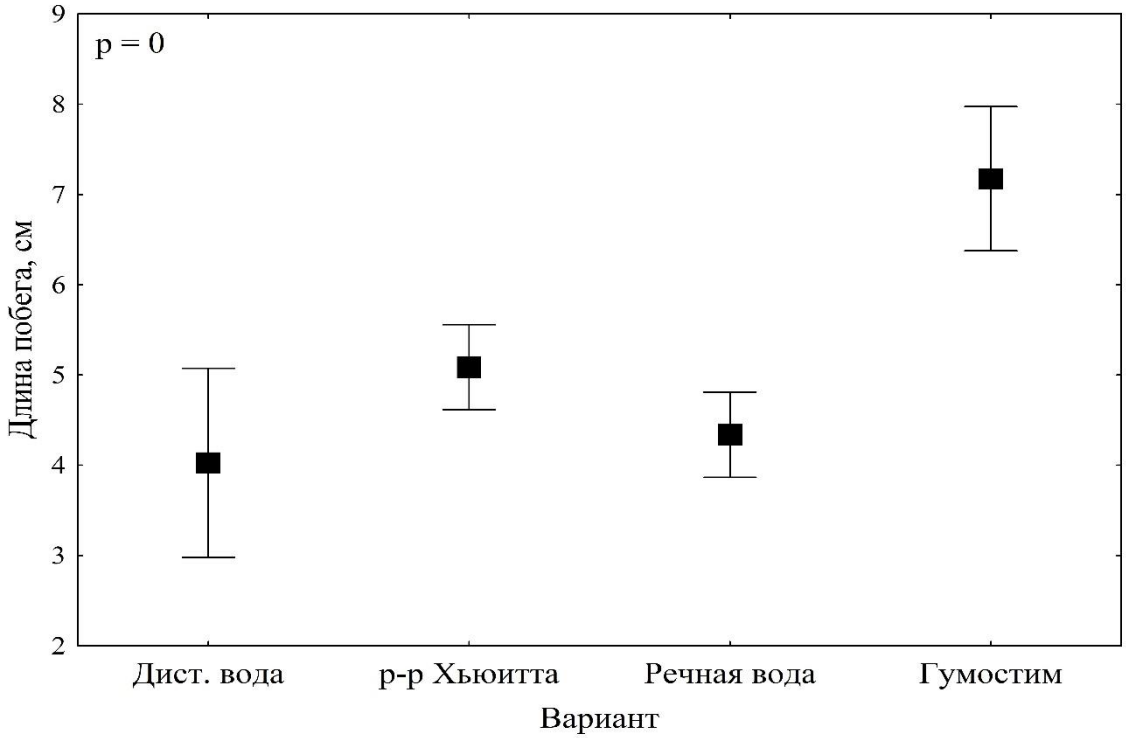

Рисунок 3.26 – Длина побегов 14-суточных проростков томата сорта Дачник при культивировании на воде рек Илиндук и Улу-Юл и на растворе Хьюитта после обработки семян препаратом Гумостим

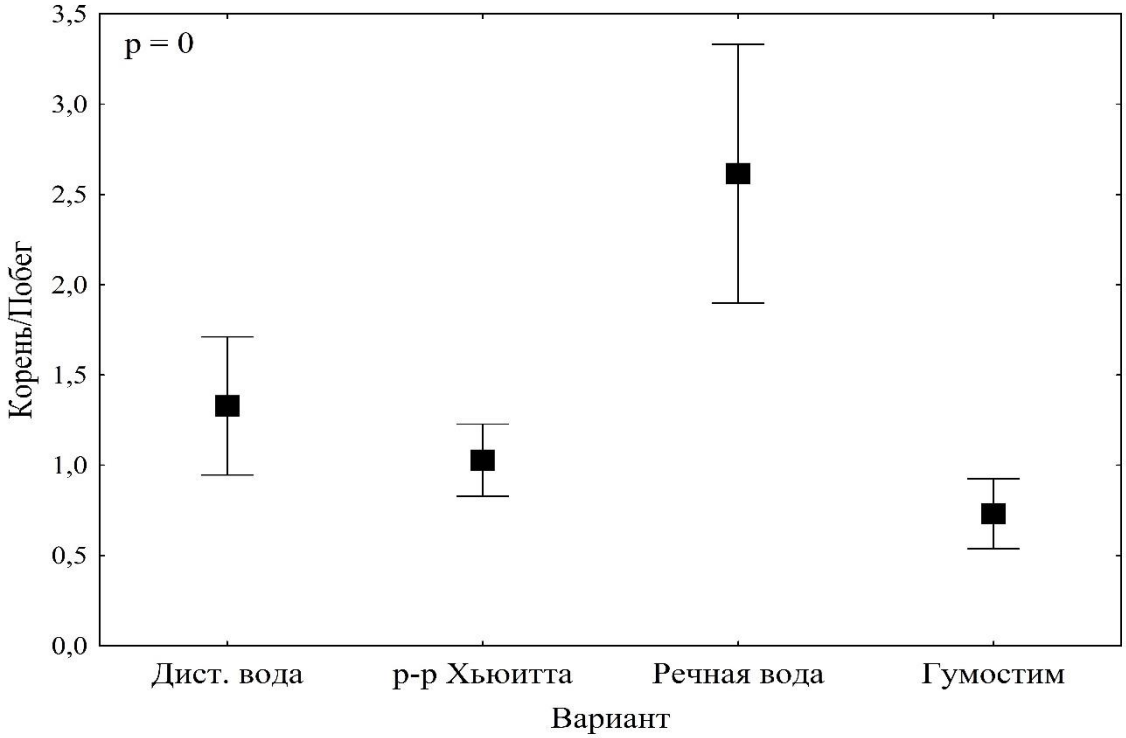

Рисунок 3.27 – Отношение Корень/Побег у 14-суточных проростков томата сорта Дачник при культивировании на воде рек Илиндук и Улу-Юл и на растворе Хьюитта после обработки семян препаратом Гумостим

На рисунке 3.26 видно, что длина побега 14-суточных проростков, выращенных из семян, обработанных Гумостимом, значимо превышает длину побега у проростков во всех остальных вариантах. В среднем, длина побега, после обработки Гумостимом составила 7,17 см, в вариантах с дистиллированной водой, раствором Хьюитта и речной водой – 4,03 см, 5,09 см и 4,34 см, соответственно.

Различия в аллометрическом соотношении Корень/Побег полностью соответствовали различиям в длине образовавшихся корней у исследуемых проростков (Рисунок 3.27). Так, для растений, выращенных на пробах речной воды, этот показатель составил 2,62, что статистически значимо, почти двукратно, превышает значение аллометрического соотношения в остальных вариантах.

Таким образом, при сравнении эффектов, оказываемых на корнеобразование проростков томатов речными водами с высоким содержанием ГВ и обработкой семян препаратом Гумостим, мы получили результаты, согласно которым Гумостим не проявил себя как корнестимулятор. Эффективность же проб воды, отобранных из рек Илиндук и Уду-Юл, в данном аспекте не вызывает сомнений. Гумостим оказывал на аллометрическое отношение Корень/Побег у проростков томата воздействие обратное по отношению к эффектам речной воды: обработка семян данным препаратом выраженно стимулировала рост побегов, но не корней.

Исходя из особенностей сезонной динамики гидрохимических показателей вод р. Улу-Юл и р. Илиндук в бесснежный период (Таблица 1.3) можно с большой долей вероятности предположить, что одним из главных факторов, оказывающих влияние на морфометрические характеристики растений томатов, является содержание гуминовых веществ в речной воде.

На рисунке 3.28 показано, как меняется содержание гуминовых компонентов в водах рек Илиндук и Улу-Юл в сезонной динамике. На графике хорошо видно, что эта динамика для гуминовых и фульвокислот характеризовалось, в целом, противоположно направленными изменениями. При этом с мая по июль сохранялось превалирование фульвокислот над гуминовыми кислотами. В конце мая это превалирование достигло максимальной степени и выражалось почти шестикратным превышением содержания фульвокислот по сравнению с содержанием гуминовых кислот.

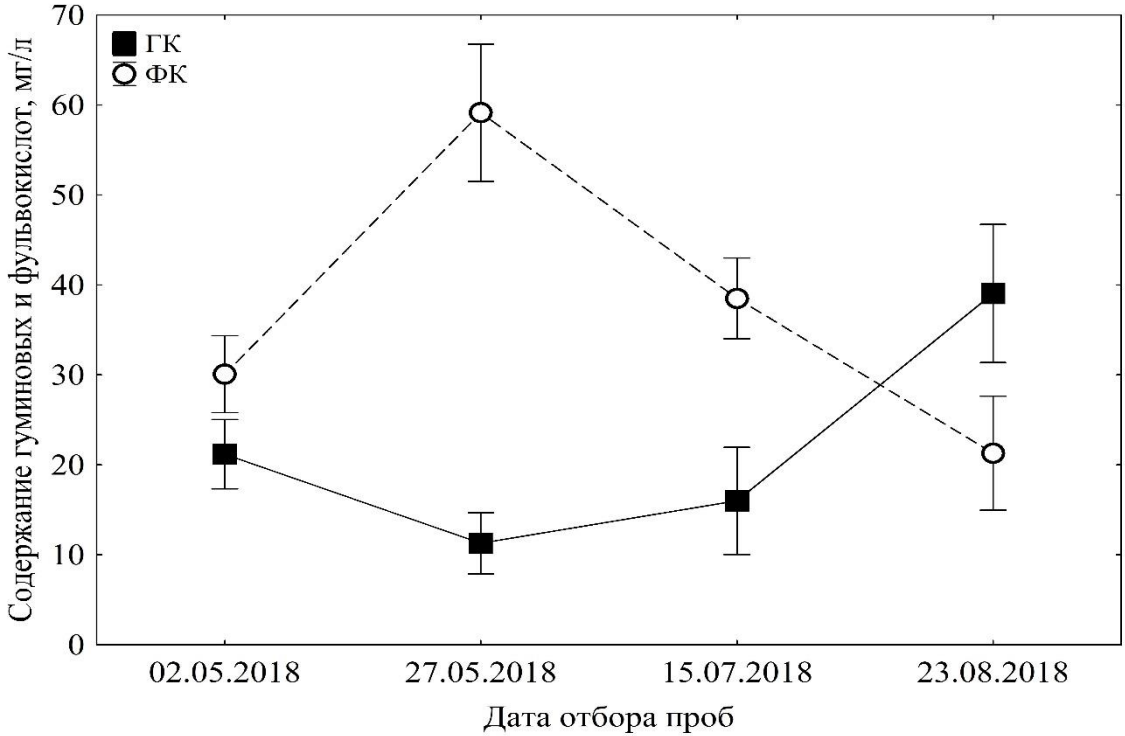

Рисунок 3.28 – Динамика содержания гуминовых и фульвокислот в водах рек Илиндук и Улу-Юл в весенне-летний период 2018 года

И только в последнюю временную точку забора проб (23.08.18) было зафиксировано реципрокное изменение данного соотношения: содержание гуминовых кислот почти двукратно превысило содержание фульвокислот.

Для ответа на вопрос, какой из двух компонентов гуминовых веществ речных вод наиболее вероятно оказывает влияние на морфометрические характеристики исследуемых растений (включая показатели отражающие процессы корнеобразования), нами было проведено графическое сравнение динамик показателя Корень/Побег с одной стороны, и содержания гуминовых и фульвокислот – с другой. Это сравнение проводилось отдельно для вод каждой из двух исследуемых рек. С нашей точки зрения наиболее информативным и показательным является график с соотнесением динамик используемого аллометрического показателя, рассчитанного для растений, выращенных на водах реки Илиндук, и содержания гуминовых кислот в этих же водах (Рисунок 3.29).

В продолжение поиска наиболее важных факторов, обуславливающих наблюдаемые аллометрические эффекты, был проведен корреляционный анализ между некоторыми гидрохимическими показателями исследуемых речных вод, и аллометрическим показателем Корень/Побег у проростков томата, культивируемых на гидропонике (Таблица 3.2).

Как видно из таблицы, исследуемый аллометрический показатель статистически значимо отрицательно коррелировал с pH как при выращивании растений томата на водах весны – начала лета, так и в течение всего весенне-осеннего сезона (с начала мая по конец августа). Выраженная отрицательная корреляция также зафиксирована между показателем Корень/Побег с одной стороны, жесткостью воды и содержанием фульвокислот – с другой. Относительно содержания гуминовых кислот можно отметить, что для проб речной воды, отобранных весной, зафиксирована сильная, статистически значимая положительная корреляция с показателем Корень/Побег.

Но если анализировать совокупность проб речной воды, отобранную в течение всего весенне-осеннего сезона, этот показатель (содержание гуминовых кислот), не обнаруживает практически никакой корреляции с исследуемым аллометрическим соотношением.

Это можно объяснить, в частности тем, что в ходе сезона, начиная с начала мая, в речной воде неуклонно повышается электропроводность и главная ее составляющая для вод данного типа, – жесткость (Таблица 3.1).

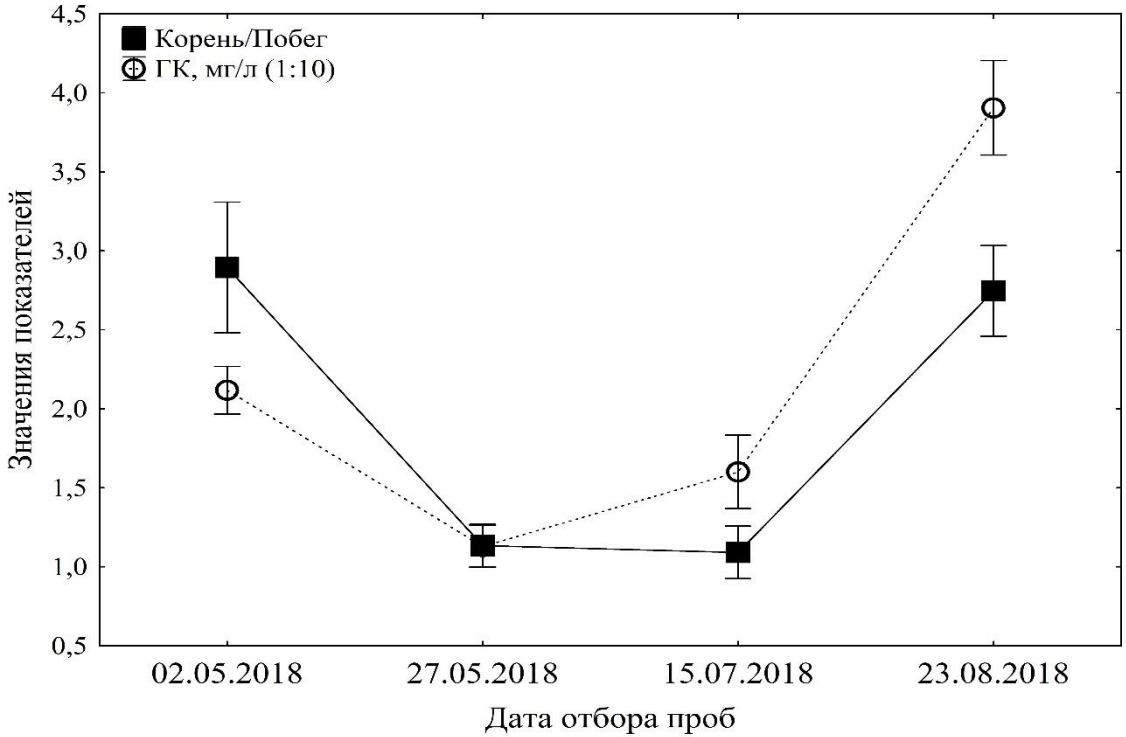

Рисунок 3.29 – Динамика содержания гуминовых кислот в водах р. Илиндук в весенне-летний период 2018 года и показателя Корень/Побег у 14-суточных проростков томата, культивируемых на этих водах

Для того, чтобы нивелировать влияние жесткости воды при рассмотрении результатов корреляционного анализа, мы ввели дополнительный показатель – отношение содержания гуминовых кислот в воде к суммарному содержанию катионов жесткости – кальция и магния (Таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Корреляция между некоторыми гидрохимическими показателями вод рек Илиндук и Улу-Юл и отношением Корень/Побег у проростков томата, культивируемых на пробах этих вод

Пары признаков	Период отбора проб воды	
	02.05–23.08	02.05–15.07
	Коэффициент корреляции, r	
pH – Корень/Побег	–0,74*	–0,93*
Содержание ГК – Корень/Побег	0,08	0,9*
Содержание ФК – Корень/Побег	–0,45	–0,9*
Жёсткость воды – Корень/Побег	–0,57	–0,88*
ГК/(Ca^{2+}+Mg^{2+}) – Корень/Побег	0,86*	0,93*
Примечания: * – статистически значимая корреляция при $p<0,05$; ГК/(Ca^{2+}+Mg^{2+}) – показатель, выражающий содержание гуминовых кислот (мг/л) в речной воде, отнесенное к суммарному содержанию катионов жесткости (мг/л)		

Хорошо видно, что такой подход позволил выявить наличие сильной положительной корреляции между содержанием гуминовых кислот в пробах вод рек Илиндук и Улу-Юл и показателем Корень/Побег у растений томатов, выращиваемых на этих водах в оба исследуемых периода.

В целом, все вышеописанные закономерности можно наглядно подытожить двумя обобщающими диаграммами: диаграммой зависимости величины показателя Корень/Побег от соотношения содержания гуминовых кислот к содержанию катионов жесткости в речной воде (Рисунок 3.30) и диаграммой сезонной зависимости наблюдаемого аллометрического эффекта, выраженного в процентах по отношению к контролю (Рисунок 3.31).

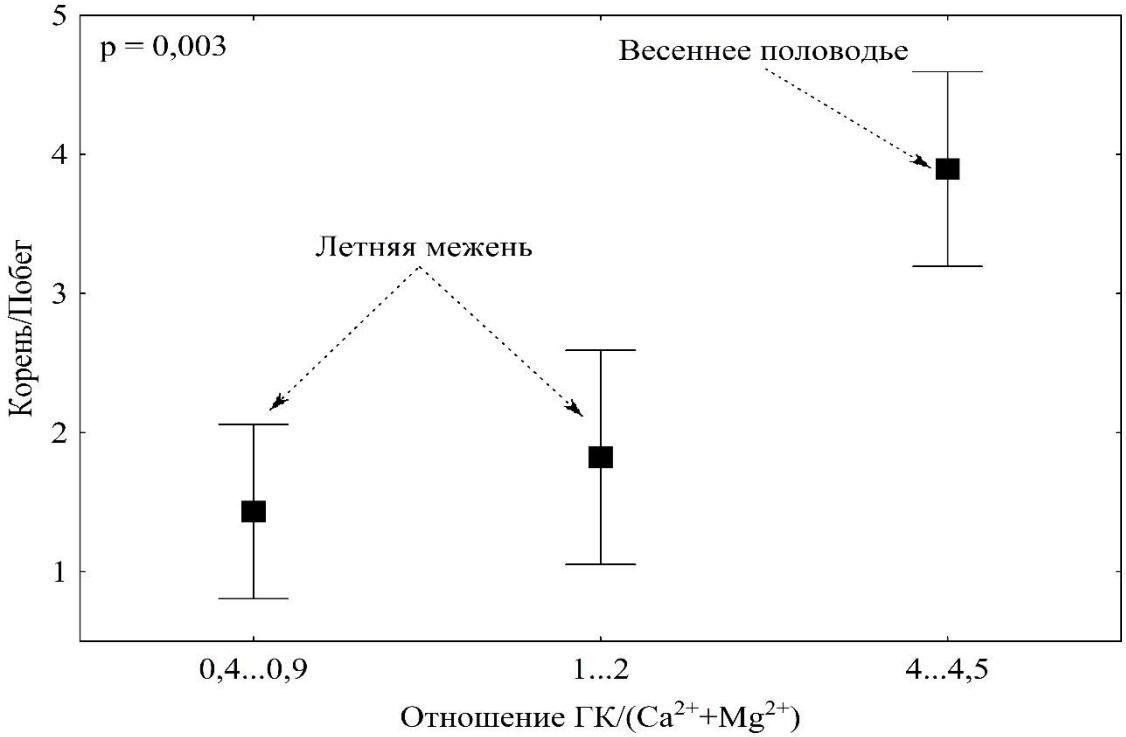

Рисунок 3.30 – Зависимость отношения Корень/Побег у 14-суточных проростков томата сорта Дачник, культивируемых на водах рек Илиндук и Улу-Юл, от соотношения гуминовых кислот и катионов жесткости

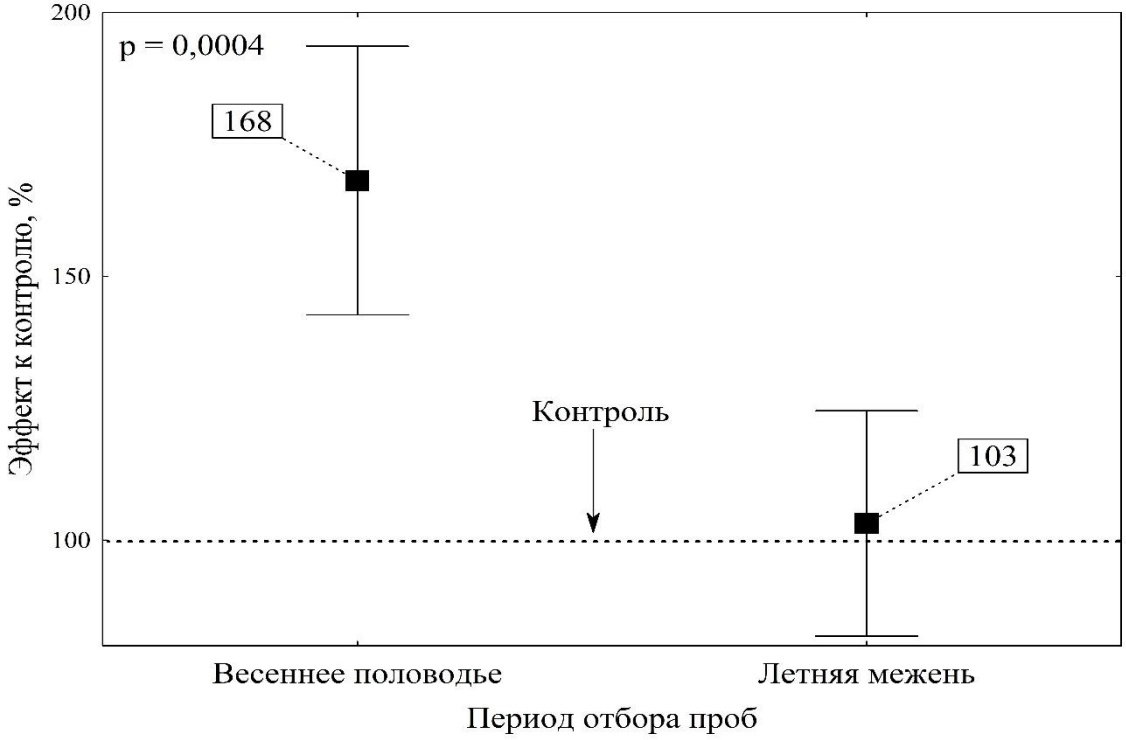

Рисунок 3.31 – Отношение Корень/Побег, выраженное в процентах к контролю, для 14-суточных проростков томата сорта Дачник при культивировании на водах рек Илиндук и Улу-Юл

Обе диаграммы достаточно очевидно показывают, что именно весенняя вода рек Илиндук и Улу-Юл, при культивировании на ней проростков томата, способствует значительному увеличению отношения Корень/Побег по сравнению с контролем. В сезон весеннего половодья воды рек Илиндук и Улу-Юл характеризуются повышенным относительным содержанием гуминовых кислот, слабокислыми значениями pH и очень низким уровнями электропроводности и жесткости.

Чтобы проверить предположение о том, что интенсивный рост корней у растений в опытных вариантах может быть связан с усилением деления клеток в апикальных частях, мы рассчитали митотический индекс апикальной меристемы корней 96-часовых проростков томатов в каждом из вариантов прорастания семян, включая вариант с предварительной обработкой Гумостимом (Рисунок 3.32). На диаграмме хорошо видно, что митотический индекс меристематических клеток корней проростков томата варьировал в диапазоне от 4,30 % у корешков семян, пророщенных в воде р. Илиндук, до 5,24 % в варианте с обработкой Гумостимом. Но средние значения величин митотического индекса во всех вариантах характеризовались практически полностью перекрывающимися доверительными интервалами, что (в совокупности с результатами дисперсионного анализа) исключало любую возможность считать различия статистически значимыми и указывало на полное отсутствие влияния изучаемого фактора (среды прорастания семян) на митотическую активность апикальной меристемы корней. Такие результаты не согласуются с некоторыми литературными данными, согласно которым гуминовые кислоты, выделенные из вермикомпоста, индуцировали значительное увеличение числа митотических участков в корнях кукурузы [Citric acid addition … , 2011]. Однако, с нашей точки зрения, это всего лишь подтверждает известные факты о том, что структура и физиологические свойства гуминовых кислот, выделенных из разных субстратов, могут очень сильно отличаться.

Механизмом, альтернативным повышению митотической активности меристем, может быть индукция растяжения клеток под действием комплекса из ГК и микроэлементов (гуматно-минерального комплекса). Это один из вариантов проявления ауксиноподобного действия ГВ. Ауксин стимулирует растяжение клеток посредством регуляции активности гидролаз клеточных стенок.

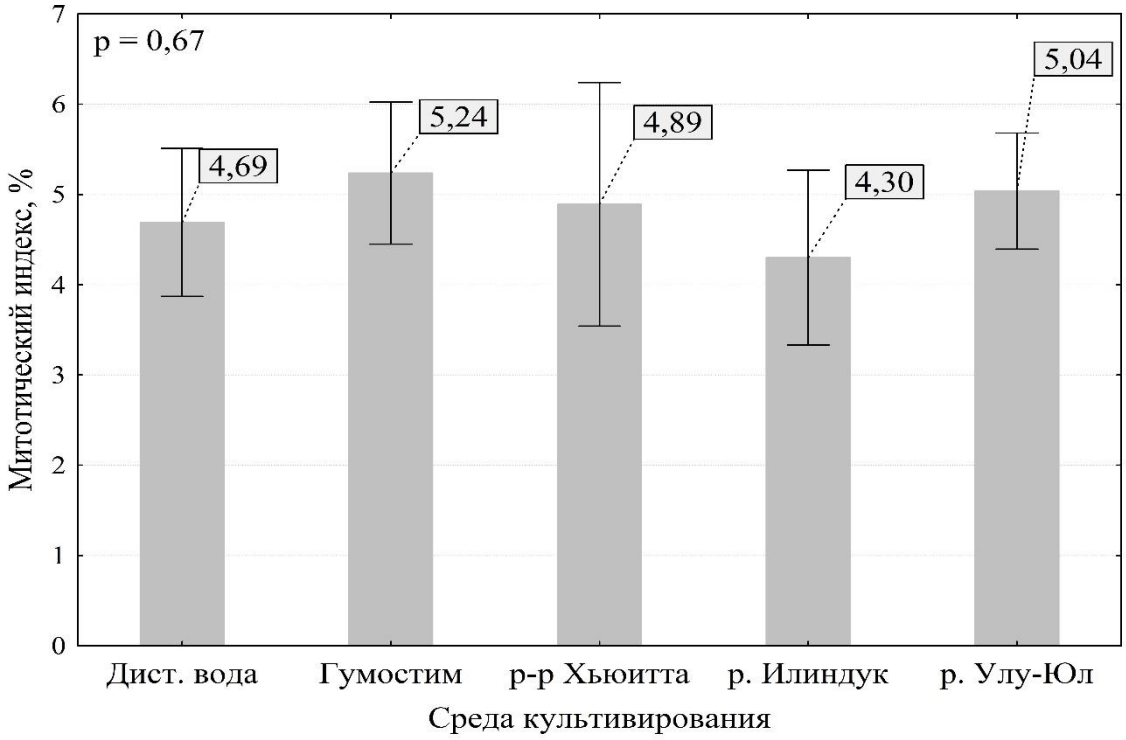

Рисунок 3.32 – Митотическая активность корневой апикальной меристемы проростков томата после замачивания семян и 96-часовой экспозиции на разных средах прорастания

Согласно так называемой гипотезе «кислого роста», ауксин активирует выход протонов в клеточную стенку, подкисляя ее и увеличивая растяжимость [Rayle, 1973 ; Rayle, Cleland, 1992 ; Peters, Richter, Felle, 1992 ; Алехина, Балнокин, 2005]. Снижение прочности клеточной стенки ведет к нарушению равновесия водного потенциала клетки, происходит поглощение воды и пассивное увеличение размеров клетки. Весенняя вода малых и средних рек бассейна Оби, питаемых преимущественно за счет стока с верховых болот, имеет слабокислую реакцию (обусловленную наличием гуминовых веществ) и очень низкую электропроводность, что вероятно, может вызвать эффекты на мембранах и клеточных стенках корней растений, аналогичные вышеописанным механизмам. Однако, несомненно, существуют и целый ряд специфических механизмов воздействия гуминовых кислот, поступающих из олиготрофных субстратов, на растительные организмы. Для выяснения этих механизмов необходимы дальнейшие исследования.

Авторы выражают благодарность доценту кафедры цитологии и генетики Биологического института Томского госуниверситета, кандидату биологических наук Митрениной Елизавете Юрьевне за помощь в освоении методики определения митотического индекса клеток апикальных меристем растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Weiner J. Allocation, plasticity and allometry in plants // Perspect. Plant. Ecol. – 2004. – Vol. 6. – P. 207–2015.
2. Bravo Avila C. H. Root:Shoot Ratio and Specific Leaf Area Along an Elevational Gradient in the Peruvian Andes [Electronic resource] // FIU Electronic Theses and Dissertations. – Electronic data. – [S. l.], 2013. – URL: https://digitalcommons.fiu.edu/etd/884 (access date: 24.08.2019).
3. Brassard B. W. Influence of Environmental Variability on Root Dynamics in Northern Forests / B. W. Brassard, H. Y. H. Chen, Y. Bergeron // Critical Reviews in Plant Science. – 2009. – Vol. 28. – P. 179–197.
4. Rauthan B. S. Effects of a soil fulvic acid on the growth and nutrient content of cucumber (Cucumis sativus) plants / B. S. Rauthan, M. Schnitzer // Plant and Soil. – 1981. – Vol. 63, is. 3. – P. 491–495.

5. The effect of commercial humic acid on tomato plant growth and mineral nutrition / F. Adani [at al.] // Journal of Plant Nutrition. – 1998. – Vol. 21 (3). – P. 561–575.
6. Hartwigsen J. A. Humic Acid Seed and Substrate Treatments Promote Seedling Root Development / J. A. Hartwigsen, M. R. Evans // HortScience: a publication of the American Society for Horticultural Science. – 2000. – Vol. 35 (7). – P. 1231–1233.
7. Сорт Дачник [Электронный ресурс] // Государственный реестр селекционных достижений. – Электрон. дан. – [Б. м.], 2019. – URL: https://reestr.gossort.com/reestr/sort/9609261 (дата обращения: 25.08.2019).
8. ImageJ [Electronic resource] // RSB Home Page. – Electronic data. – [S. l.], 2019. – URL: https://imagej.nih.gov/ij (access date: 28.08.2019).
9. Antibiotic effects on seed germination and root development of tomato (Solanum lycopersicum L.) / A. Bellinoa [et al.] // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2018. – Vol. 148. – P. 35–141.
10. Involvement of glutathione in β-cyclodextrin-hemin complex-induced lateral root formation in tomato seedlings / D. Zhu [et al.] // Journal of Plant Physiology. – 2016. – Vol. 204. – P. 92–100.
11. Identification and characterization of an ABA-activated MAP kinase cascade in Arabidopsis thaliana / A. Danquah [et al.] // The Plant Journal. – 2015. – Vol. 82. – P. 232–244.
12. Смирнов Ю. А. Ускоренный метод исследования соматических хромосом плодовых // Цитология. – 1968. – Т. 10, № 12. – С. 1601–1602.
13. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений / З. П. Паушева. – М. : Агропромиздат, 1988. – 271 с.
14. Лемешко Б. Ю. Сравнительный анализ критериев проверки отклонения распределения от нормального закона / Б. Ю. Лемешко, С. Б. Лемешко // Метрология. – 2005. – № 2. – С. 3–23.
15. Citric acid addition improve humic acids action and change proteins profile from plasma membrane of maize roots / J. Rima [et al.] // Ciência Rural. – 2011. – Vol. 41 (4). – P. 614–620
16. Rayle D. L. Auxin-induced hydrogen-ion excretion in Avena coleoptiles and its implications // Planta. – 1973. – Vol. 114. – P. 63–73.

17. Rayle D. L. The Acid Growth Theory of Auxin-induced Cell Elongation Is Alive and Well / D. L. Rayle, R. E. Cleland // Plant Physiol. – 1992. – Vol. 99. – P. 1271–1274
18. Peters W. Auxin-induced H+-pump stimulation does not depend on the presence of epidermal cells in corn coleoptiles / W. Peters, U. Richter, H. Felle // Planta – 1992 — Vol. 186. – P. 313–316
19. Физиология растений / Н. Д. Алехина [и др.] / под ред. И. П. Ермакова. – М. : Academia, 2005. – 640 с.