



УДК 581.522.4.03/.04

КРОСС-АДАПТАЦИЯ РАСТЕНИЙ К ПОЧВЕННОМУ ЗАСОЛЕНИЮ И ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ

© 2010. Гаджиева И.Х., Алиева З.М., Рамазанова П.Б.

Дагестанский государственный университет, биологический факультет

Изучали последствия кросс-адаптации растений на примере проростков, стеблевых и листовых черенков огурца действием NaCl, CuSO₄ или ZnSO₄ на жизнеспособность. Засоление среды способствовало повышению интенсивности флуоресценции и содержания пролина в листьях, дисбалансу ионов, снижению выживаемости, прироста и укореняемости черенков. Предварительная экспозиция в растворе NaCl сопровождалась повышением устойчивости проростков и черенков огурца при дополнительном действии сернокислых солей меди и цинка.

The consequences of plant cross adaptation on cucumber seedlings and shoots under NaCl, CuSO₄ and ZnSO₄ influence on life's activity was studied. Medium salification produced an increase of fluorescence and proline content in leaves, ion disbalance, decrease of survival percentage, accretion and rooting of cuttings. The pretreatment of cuttings and seedlings by NaCl solutions increases their tolerance to subsequent effect of copper sulphate and zinc sulphate.

Ключевые слова: адаптация, солеустойчивость, тяжелые металлы, пролин.

Keywords: adaptation, solinity, heavy metall, proline.

Gadjieva I.H., Alieva Z.M., Ramazanova P.B. The cross-adaptation of cucumber seedlings to soil salinity and heavy metals

Площадь засоленных территорий на Земле достигла 25% и имеет тенденцию к росту [10], не является в этом отношении исключением и Дагестан [2]. Действие высоких концентраций непитательных солей на растения и возможность повышения галотолерантности исследуется давно [7,9,17,19,23,29,32]. Из-за антропогенного загрязнения почв тяжелыми металлами [1,20,22] ныне на повестку дня встает вопрос изучения реакции растений на комплексное действие природных и антропогенных факторов [6].

В литературе приводятся сведения о неоднозначной реакции растений на сочетание различных экстримов [11,12]. Предполагается наличие общих систем устойчивости к двум и более стрессорам. Наиболее обстоятельные эксперименты касаются кросс-адаптации к солевому и температурному факторам, хотя рассматриваются комбинации и других стрессоров [4,6]. Одним из механизмов такой сопряженной устойчивости растений к разным стрессорам может быть накопление в тканях растений низкомолекулярных соединений, в частности, пролина, вызываемого различными природными и антропогенными факторами, индуцирующими в растениях водный стресс [3,15,24,31]. Проллин выполняет в растениях в условиях стресса роль осморегулятора или протектора [12,25]. Между содержанием пролина и уровнем солеустойчивости отмечается как прямая, так и обратная связь. В последнем случае содержание пролина рассматривается как критерий стресса [21,28,29].

В этой связи возникает необходимость выяснения последствий комплексного воздействия солей натрия и тяжелых металлов на отдельные структуры огурца разной целостности и оценки роли пролина в устойчивости растений к ним.

Методика

Известно, что именно культурные растения наиболее часто подвергаются воздействию почвенного засоления и тяжелых металлов. С учетом этого 10-дневные проростки и срезанные на фазе двух настоящих листьев стеблевые и листовые черенки огурца (*Cucumis sativus* L.) с. Феникс экспонировали в растворе NaCl (10-40 мМ) в течение трех суток и затем переносили для постоянного культивирования в растворы CuSO₄ или ZnSO₄ (0,01 мМ) или оставляли в том же растворе. Часть черенков предварительно инкубировали в 0,025% растворе полиэтиленгликоля (ПЭГ) с молекулярной массой 6000 (нейтральный осмотик не проникающий в ткани, но создающий в них водный дефицит) [18]. Проростки и стеблевые черенки помещали в пеницил-



линовые стаканчики с растворами солей, изолированные листья культивировали в чашках Петри на смоченной ими фильтровальной бумаге. В вариантах опыта бумагу и растворы регулярно сменяли. Опыты проводили в условиях естественного освещения и температуры 24⁰/17⁰С.

У проростков и изолированных структур огурца определяли выживаемость, прирост побегов и корней, темпы ризогенеза и общую укореняемость.

Морфологический анализ сочетался с изучением интенсивности флуоресценции [14], накопления свободного пролина [8] и изменения содержания ионов (натрия, калия, кальция, меди и цинка) после сжигания (при 450-500⁰С) высушенного материала [16]. Определение ионов проводили на атомно-адсорбционном спектрометре (AASIN, ГДР, Carl Zeiss, Jena). Повторность опытов 2-4 кратная, в вариантах 10-20 структур. Определение пролина проводили в 4-6 кратной биологической повторности (при этом в каждую навеску брали 2-4 растения из вариантов), ионов – 2-4 кратной. Статистическую обработку проводили по общепринятой методике, все выводы сделаны на основании достоверных различий [13].

Результаты

Наибольший прирост побегов и корней у проростков огурца наблюдали при их постоянном культивировании в дистиллированной воде - контроль (рис.1). Экспонирование проростков в растворах солей, особенно CuSO₄, подавляло их рост. При этом реакция разных органов проростков неоднозначна. Большую чувствительность к засолению среды проявляли корни. Так, длина наибольшего корня в варианте с постоянным инкубированием в среде с CuSO₄ составила 46 мм, тогда как в контроле – 137 мм (рис.1). При предобработке проростков NaCl и докультивировании в растворе CuSO₄ длина побегов и корней составила соответственно 92 и 54 мм. В этом варианте возрастало и количество боковых корней – в среднем на одном растении развивалось по 4 корешка. Предварительная обработка NaCl при последующем выдерживании проростков в растворе ZnSO₄ также стимулировала прирост побегов и корней, хотя в варианте NaCl→H₂O темпы прироста линейных структур были ниже, чем в случае постоянного инкубирования в воде.

Для облиственных черенков огурца характерна высокая выживаемость и ризогенная активность. При культивировании в воде на 15-ые сутки сохранились все черенки. Дифференциация корней у них началась на 7 сутки и общая укореняемость составила 100%. Инкубирование черенков в растворах солей снижало их выживаемость и частоту ризогенеза. При постоянном культивировании в растворе CuSO₄ выживаемость на 15-е сутки снизилась до 35%. В варианте с ZnSO₄ жизнеспособность сохранили 60% и с NaCl – 90% черенков. Засоление среды вызывало задержку сроков развития корней и подавляло общую укореняемость черенков. При инкубировании в растворах CuSO₄, ZnSO₄ и NaCl закладка корешков у черенков наблюдалась соответственно на 21, 15 и 10 сутки. Постоянное культивирование черенков в растворах солей подавляло их общую укореняемость (табл.1). В варианте с NaCl укореняемость черенков была на 25% ниже контроля. В условиях засоления среды CuSO₄ корнеобразование составило 15%, ZnSO₄ – 35%.

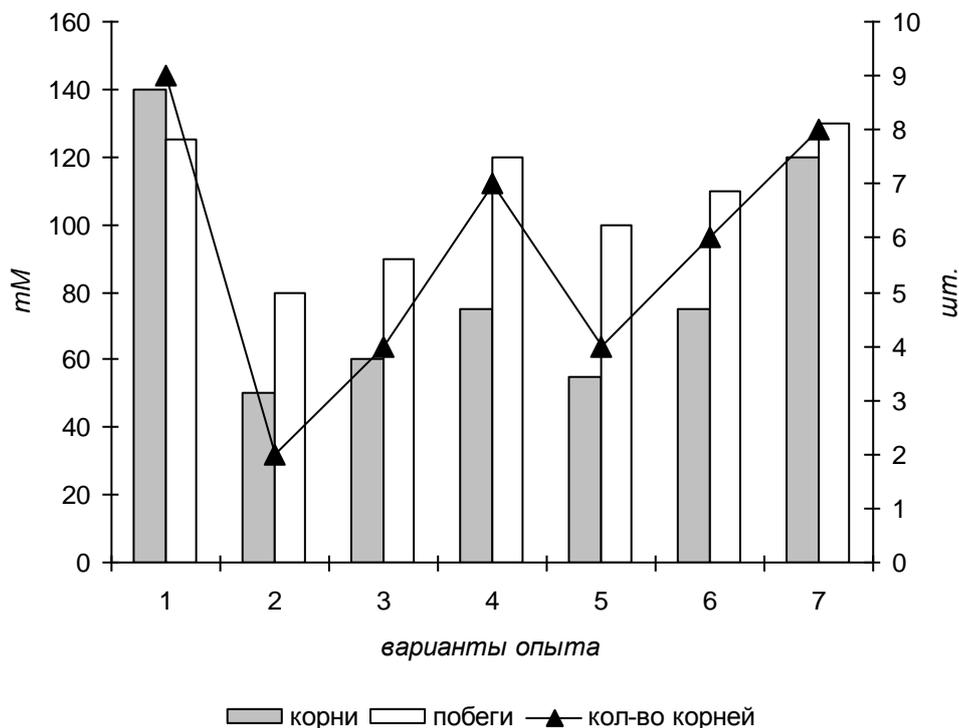


Рис. 1. Влияние засоления среды на прирост побегов и корней у проростков огурца

Примечание: варианты опыта 1-7 см. табл. 1

Таблица 1

Жизнеспособность черенков огурца при чередовании растворов солей

Варианты культивирования		Выживаемость на 15 сут., %	Укореняемость		Выход флуоресценции, % к контролю
Пред-обработка	Постоянно		Начало, сут.	Общая, %	
1. H ₂ O*	H ₂ O	100	7	100	100
2. CuSO ₄	CuSO ₄	35	21	15	167
3. ZnSO ₄	ZnSO ₄	50	15	35	146
4. NaCl	NaCl	90	10	75	120
5.	CuSO ₄	45	18	25	149
6.	ZnSO ₄	65	12	50	133
7.	H ₂ O	100	8	100	100
8. H ₂ O	CuSO ₄	35	20	15	156
9.	ZnSO ₄	55	14	40	139
10.	NaCl	100	9	85	114

Примечание: H₂O* - контроль, NaCl -10 mM, CuSO₄ и ZnSO₄ – 0,01 mM, предобработка – 3 суток, затем постоянное культивирование.

Одним из показателей степени воздействия различных экстримов на растения является физиологическое состояние фотосинтетического аппарата, в частности интенсивность флуоресценции [27]. В наших опытах засоление среды повышало выход флуоресценции в листьях интактных проростков и изолированных структур огурца. Так, при культивировании стеблевых черенков в среде с CuSO₄ флуоресценция была наибольшей и достигла 167 % от контроля, в вариантах с ZnSO₄ и NaCl соответственно 146 % и 120 %.

Смена среды инкубирования изменяла параметры жизнеспособности черенков. Так, в варианте с предварительным экспонированием черенков в воде и докультивированием в растворе ZnSO₄, выживаемость черенков на 15-ые сутки составила 55%, дифференциация корней



начиналась на сутки раньше и общая укореняемость достигла 40%. В случае докультивирования в растворе CuSO_4 показатели выживаемости черенков и частоты ризогенеза совпадали с результатами постоянного инкубирования в среде с сульфатом меди (табл.1). При смене воды раствором NaCl выживаемость и корнеобразование составляли соответственно 100% и 85%.

Предобработка NaCl оказалась более эффективной в плане повышения устойчивости черенков к действию сернокислых солей меди и цинка (табл.1). При переносе черенков из раствора NaCl в среду с CuSO_4 их выживаемость на 15-ые сутки возрастает до 45%. В этом варианте развитие корней начиналось на 3 суток раньше, чем при постоянном культивировании в CuSO_4 и общая укореняемость составила 25%. При предварительном выдерживании в растворе NaCl и докультивировании в среде с ZnSO_4 или CuSO_4 в листовых пластинках черенков снижается интенсивность флуоресценции соответственно на 13 и 18 % по сравнению с вариантами постоянного культивирования в сернокислых солях (табл.1).

Таблица 2

Содержание ионов в 20-ти дневных структурах огурцов после 5-ти суток культивирования

Варианты, мм		Содержание ионов, мг/г сухой биомассы					
		Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}
H_2O	а	3,22	9,06	19,62	0,56	0,00021	0,00033
	б	6,85	11,29	13,54	0,36	0,00041	0,00039
	в	7,74	15,19	19,63	0,46	0,00050	0,00076
	г	2,90	13,54	16,64	0,50	0,00024	0,00038
CuSO_4 0,1	а	3,19	9,35	21,26	0,53	0,00055	-
	б	7,54	12,89	33,28	0,25	0,00041	-
	в	5,57	20,52	24,87	0,19	0,00078	-
	г	3,19	10,52	26,29	0,60	0,00039	-
CuSO_4 0,01	а	4,12	11,83	46,47	0,86	0,00052	-
	б	8,43	15,03	26,53	0,51	0,00032	-
	в	6,80	22,86	16,63	0,38	0,00069	-
	г	3,53	16,93	27,34	0,46	0,00035	-
ZnSO_4 0,1	а	3,69	10,97	29,54	0,71	-	0,00073
	б	4,53	12,78	35,24	0,65	-	0,00062
	в	8,69	20,87	33,86	0,57	-	0,00115
	г	3,81	14,77	23,45	0,44	-	0,00089
ZnSO_4 0,01	а	3,99	11,47	39,62	0,65	-	0,00059
	б	4,48	10,54	16,86	0,52	-	0,00050
	в	3,45	17,35	19,37	0,50	-	0,00098
	г	3,17	16,91	14,79	0,49	-	0,00063
Интактные	а	2,95	11,09	25,26	0,51	-	-
	б	6,39	13,17	10,54	0,28	-	-
	в	5,57	18,07	27,22	0,55	-	-
	г	4,61	21,19	22,11	0,42	-	-

Примечание: а, б, в, г – семядоли, гипокотили, корни и листья.

Для конкретизации действия на растения избыточных концентраций минеральных элементов необходимо иметь представление не только об уровне их содержания во внешнем растворе, но и в самих тканях. Опыты показали (табл. 2), что в биомассе отдельных структур - семядолей, гипокотилей и особенно корней при культивировании даже в невысоких концентрациях солей, не только повышается содержание того катиона, который находится в маточном растворе, но и также меняется содержание и соотношение других ионов (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}), причем наблюдалась органоспецифичность этих изменений. Так, у проростков огурцов при культивировании в растворах CuSO_4 и ZnSO_4 , более значительно изменялось содержание Ca^{2+} и



Mg²⁺ в семядолях и гипокотилеях по сравнению с корнями и листьями. При этом изменения в уровне Na⁺ и K⁺ были менее выражены. В растворе ZnSO₄ изменения в содержании Ca²⁺, Mg²⁺ и Cu²⁺ были большими по сравнению с Na⁺ и K⁺. Подобные явления отмечены у всех структур. В обоих растворах заметны изменения в содержании Zn²⁺ и Cu²⁺ в гипокотилеях и листьях. В целом в листьях содержание ионов выше, чем в семядолях, а в корнях – выше, чем в листьях. Биомасса корней и гипокотилей, как правило, содержит ионов больше, чем листьев и семядолей.

В листовых пластинках стеблевых и листовых черенков огурца при действии солей NaCl, CuSO₄ и ZnSO₄ возрастало содержание пролина. При этом быстрое увеличение содержания аминокислоты в условиях высоких концентраций NaCl (40-80 мМ) наблюдаемое уже на вторые сутки опыта (табл.3) не способствовало повышению их выживаемости. Так, более чувствительные к засолению изолированные листья в этих вариантах полностью отмирали уже на 3-5 сутки. При более длительном культивировании черенков в среде с концентрациями 10-20 мМ NaCl (максимальная концентрация, в которой еще наблюдается укоренение листьев) наблюдалось небольшое, но достоверное повышение содержания пролина, которое сопровождалось и некоторым повышением жизнеспособности самих черенков. Их средняя продолжительность жизни возрастала до 10-15 дней, несколько превышая контроль. Эти результаты позволяют предположить, что защитное действие пролина на выживаемость изолированных листьев проявляется лишь для относительно невысоких концентраций солей.

Таблица 3

Содержание пролина на 5 сутки в тканях гипокотильных черенков

Растворы, мМ	На мкМ/г сырой биомассы		На мкМ/г сухой биомассы	
	А	Б	А	Б
H ₂ O				
CuSO ₄	0,43±0,02	0,76±0,05	6,55±0,23	20,25±1,24
1	0	0	0	0
0,1	4,77±0,41	0,49±0,04	10,90±0,85	14,25±1,24
ZnSO ₄				
1	2,00±0,28	0,94±0,17	25,55±3,50	17,73±3,26
0,1	0,85±0,05	1,09±0,02	15,85±0,89	27,38±0,57

Примечание: А - интактные семядоли; Б- гипокотили, 0- к этому сроку отмерли

Увеличение содержания пролина в тканях вызывают не только избыточные концентрации солей, но и ПЭГ [18]. В наших опытах достоверный рост пролина наблюдался при инкубировании листовых черенков огурца в растворе ПЭГ двое и более суток. По жизнеспособности такие листья не отличались от культивируемых в воде: у них не снижалась выживаемость и регенерационные процессы, а уровень пролина составлял на 7-ые сутки более 300% от контроля (табл.4). В варианте с предварительным выдерживанием в ПЭГ в течение 5 суток и последующим культивированием в растворе NaCl выживаемость и укореняемость изолированных листьев огурца была на 20% выше, чем при постоянном инкубировании в среде с хлоридом натрия, а активность каллусогенеза возрастала в два раза. В случае же предобработки NaCl и переносе в ПЭГ выживаемость и частота ризогенеза листовых черенков резко снижалась (табл.5).

Таким образом, отмечена высокая чувствительность проростков и черенков огурца к засолению. Культивирование в растворах различных солей сопровождалось повышением выхода флуоресценции, накоплением пролина и дисбалансом ионного гомеостаза тканей. Интегральным показателем общего состояния проростков и изолированных структур является интенсивность ростовых процессов (рис.1).



Таблица 4

Содержание пролина (мкМ/г сырой ткани) в изолированных листьях огурцов, культивируемых в растворах NaCl (7 сут)

Варианты культивирования		На 1 г сырой массы		На 1 г сухой массы	
		мкМ	% к контролю	мкМ	% к контролю
Контроль (H ₂ O)		1.7±0.1	100	22.0±0.4	100
Предобработка NaCl, мМ	10	2.3±0.4	135	24.0 ±1.5	109
	20	2.2±0.1	129	25.1±1.0	114
	40	2.3±0.1	135	26.5±2.0	120
	80*	3.4	200	40	190
ПЭГ, в %	0,025	5.2 ±0.5	306	40.5±2.9	184
	0,05	7.3±0.7	429	43.4±3.8	197

Примечание: Данные для варианта 80 мМ приведены на 3 сут опыта, поскольку при более длительном культивировании в этом варианте листья отмирали.

Таблица 5

Влияние последовательности обработок NaCl (10 мМ) и ПЭГ (0.025%) на состояние отдельных листьев огурца (14 сут)

Варианты		Выживаемость, %		Каллусообразование		Общая укореняемость, %
Пред- обработки [120ч]	Культивирования	12 сут	15 сут	%	мощность	
NaCl	NaCl	50	10	50	++	10
NaCl	ПЭГ	25	5	80	+	15
ПЭГ	ПЭГ	75	55	100	+++	50
ПЭГ	NaCl	70	30	100	+++	30
H ₂ O	H ₂ O	100	90	100	+++	80

Примечание: +, ++ и +++ - слабое, среднее и сильное проявление признака

Степень снижения жизнеспособности структур огурца зависела от состава солей. Наибольшая токсичность характерна для сульфата меди, отмечено накопление ионов меди в корнях и в других органах. Корневой барьер играет заметную роль в формировании толерантности к избытку меди [5]. Подобная картина наблюдалась нами и в отношении ZnSO₄. Однако быстрое нарушение ионного гомеостаза и соотношения всех основных катионов (K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺) (табл.2) говорит о недостаточном вкладе такого механизма в толерантность проростков огурца на последовательное действие разных солей. В этой связи интересно отметить, что ингибирующее жизнеспособность действие сульфата меди или цинка снижалось при кратковременной (3-5 суток) предварительной обработке проростков и черенков хлоридом натрия, что, возможно, связано с индуцированным NaCl ростом содержания пролина. Следует отметить, что защитное действие пролина проявляется лишь для относительно невысоких концентраций солей в среде (табл.3). Опыты по перекрестному культивированию в растворах ПЭГ и NaCl свидетельствуют о необходимости создания определенного уровня пролина в тканях огурца и о перспективности использования такого подхода для повышения комплексной стресс-устойчивости растений.

Библиографический список

1. Алексеева – Попова Н.В. Устойчивость к тяжелым металлам дикорастущих видов. - Л.: Наука, 1991. – С. 204.
2. Баламирзоев М.А., Мирзоев Э.М.-Р., Аджиев А.М., Муфараджиев К.Г. Почвы Дагестана. Экологические аспекты их рационального использования. - Махачкала: ГУ «Дагестанское книжное издательство», 2001. – С. 336.
3. Бритиков Е.А. Биологическая роль пролина. - М.: Наука, 1975.- С.88.
4. Гладков Е.А. Влияние комплексного взаимодействия тяжелых металлов на растения мегаполисов // Экология, 2007.- №1. - С.71-74.
5. Демедчик В.В., Соколик А.И., Юрин В.М. Токсичность избытка



меди и толерантность к нему растений // Успехи современной биологии, 2001.- №5.- Т.121.- С.511-525.

6. Духовский П., Юкнис Р., Бразайтите А., Жукаускайте И. Реакция растений на комплексное воздействие природных и антропогенных стрессоров // Физиология растений, 2003. - Т.50.- №32. - С.165 -173. **7.** Захарин А.А. Особенности водно-солевого обмена растений при солевом стрессе // Агрохимия, 1990.- №8. - С.69-79. **8.** Калинкина Л.Г., Назаренко Л.В., Гордеева Е.Е. Модифицированный метод выделения свободных аминокислот для определения на аминокислотном анализаторе // Физиология растений, 1990.- Т.37. Вып.3. - С.617-621. **9.** Керимов Ф.А., Кузнецов Вл.В., Шамина З.Б. Организменный и клеточный уровни солеустойчивости двух сортов хлопчатника [133, ИНЭБР-85] // Физиология растений, 1993. - Т.40. - №1.- С.128-131. **10.** Ковда В.А., Розанова Б.Г. Типы почв, их география и использование. - М.: Высшая школа, 1988.- Ч.II. – С.367. **11.** Кузнецов Вл.В. Адаптация растений к экстремальным факторам: возможная роль стрессорных систем // Тез. Докл. II съезда ВОФР.- М., -1990.- С.102. **12.** Кузнецов Вл.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений, 1999. - Т.46. - №2. - С.321-336. **13.** Лакин Г.Ф. Биометрия. - М.: Высшая школа, 1990.- С. 352. **14.** Маммаев А.Т., Магомедова М. Х-М., Алиева М.Ю. Замедленная флуоресценция растений при экстремальных воздействиях // Достижения и современные проблемы развития науки в Дагестане.- Махачкала, 2002.- С.447. **15.** Мохаммед А.М., Ралдугина Г.Н., Холодова В.П., Кузнецов Вл.В. Аккумуляция осмолитов растениями различных генотипов рапса при хлоридном засолении // Физиология растений, 2006.- Т.53. - №5.- С.732-738. **16.** Разумов В.А. Справочник лаборанта-химика по анализу кормов. - М.: Россельхозиздат, 1986. – С.304. **17.** Строгонов Б.П. Физиологические основы солеустойчивости растений. - М.: Изд. АН СССР, 1962.- С.366. **18.** Строгонов Б.П., Клышев Л.К., Азимов Р.А., и др. Проблемы солеустойчивости растений. Ташкент: ФАН, 1989. – С.184. **19.** Удовенко Г.В. Принципы различной реакции сортов и видов растений на засоление почвы // Сорт и удобрение. Иркутск, 1974.- С.219-223. **20.** Феник С.И., Трофимьяк Т.Б., Блюм Я.Б. Механизмы формирования устойчивости растений к тяжелым металлам // Успехи современной биологии, 1995. - Т.115.- №3.- С.261-275. **21.** Франко О.Л., Мело Ф.Р. Осмопротекторы: ответ растений на осмотический стресс // Физиология растений, 2000. - Т.47.- №1. - С.152-159. **22.** Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. - СПб.: Изд. Санкт-Петербургского ун-та, 2002. - С.224. **23.** Шахов А.А. Солеустойчивость растений. - М.: Изд. АН СССР, 1956. – С. 552. **24.** Шевякова Н.И. Метаболизм и физиологическая роль пролина в растениях при водном и солевом стрессе // Физиология растений, 1983.- Т.30.- №4.- С.768-783. **25.** Шевякова Н.И., Каролевски П. К вопросу о механизмах ответных реакций на засоление различных по солеустойчивости сортов фасоли // Сельскохозяйственная биология, 1994. - №1.- С.84-88. **26.** Шевякова Н.И., Рошупкина Б.В., Парамонова Н.В., Кузнецов Вл.В. Стрессорный ответ клеток *Nicotiana glauca* на засоление и высокую температуру. 1. Аккумуляция пролина, полиаминов, бетаинов и сахаров // Физиология растений, 1994. - Т.41.- С.558-565. **27.** Широкова Н.А., Канаш Е.В. Диагностика устойчивости и эффективности работы фотосинтетического аппарата растений при стрессе, вызванном радиацией, по показателям замедленной флуоресценции // Тез. Межд. конф. «Проблемы физиологии растений Севера». Петрозаводск, 2004.- С.207. **28.** Dachek William V., Erickson S., Sharon S. Isolation, assay, biosynthesis, translocation, and function of proline in plant cells and tissues // The Botanical Review, 1981. V.47. №3. P.349-381. **29.** Greenway H., Rana Munns. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes // Annual Review of Plant Physiology., 1980. V.31. P.149-190. **30.** Munns R. Comparative physiology of salt aut water stress // Plant, Cell and Environment. 2002. V.25. P. 239-250. **31.** Stewart G.R., Lee J. A. The rate of Proline Accumulation in Halophytes // Planta Berl).1974. Vol.120.P.279-289. **32.** Tester M. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants, 2003. 503 p.