

УДК 576.3/7.086.83:58

Н.В. ТЕРЛЕЦКАЯ

## ПРОНИЦАЕМОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН КАК ПОКАЗАТЕЛЬ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ

*(Институт биологии и биотехнологии растений НЦБ РК)*

Проведен анализ изменения проницаемости клеточных мембран растительных тканей для оценки устойчивости к таким стрессовым факторам, как засоление и засуха. Показано, что уровень проницаемости мембран может быть использован как информативный и надежный критерий при скрининге соле- и засухоустойчивых генотипов ячменя.

В устойчивости растений к действию стрессовых факторов внешней среды помимо специфических, зависящих от особенностей воздействия и вида растения, важную роль играют неспецифические реакции клетки, возникающие при действии любых неблагоприятных факторов. Стресс, как известно, – «это совокупность всех неспецифических изменений, возникающих под влиянием любых сильных воздействий и сопровождающихся перестройкой защитных систем организма» [1, 2]. Суть неспецифических реакций в значительной степени сводится к тем изменениям, которые обнаруживаются в мембранных образованиях клетки. Ведь мембраны как естественный барьер первыми подвергаются действию стрессовых факторов, являясь для стрессов и мишенями первичного воздействия, и первой линией защиты. При этом изменения, возникающие в мембранах, влекут за собой каскад сдвигов в обмене веществ всей клетки [3].

Важнейшим свойством биологических мембран является их проницаемость – способность пропускать в клетку и из неё различные метаболиты (аминокислоты, сахара, ионы и т.п.), что имеет большое значение для осморегуляции и поддержания постоянства состава клетки, её физико-химического гомеостаза [4]. Поэтому изменение мембранной проницаемости «для растворенных веществ, в частности для электролитов», отмеченное еще в 1938 г. Н. А. Максимовым [5], является одним из критериев устойчивости растений к абиотическим стрессам. Поэтому целью данной работы было изучение изменения проницаемости клеточных мембран растительных тканей для оценки устойчивости к

таким стрессовым факторам, как засоление и засуха.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили различные по соле- и засухоустойчивости сорта и линии ярового ячменя, любезно предоставленные сотрудниками НПЦ земледелия и растениеводства ТОО «Агроинновация» РК и Института цитологии и генетики им. Лаврентьева СО РАН.

Устойчивость к засолению определялась на корешках 7-дневных проростков, выращенных в песчаной культуре при засолении субстрата (1.68 % NaCl) в экспериментальном варианте и поливе дистиллированной водой в контроле.

Цитологическое определение действия стресса на первичные корешки злаков проводились по составлению протоплазмы клеток по методике ВИР [6].

Устойчивость к засухе анализировалась на листовых пластинках (фазы «выход в трубку» – подфлаговый лист, «колошение» – флаговый лист) при завядании в течение 3 часов.

Проницаемость клеточных мембран определялась при помощи кондуктометра. За основу была взята методика Р.А. Бородиной [7].

Степень повреждения мембран при воздействии абиотических стрессов рассчитывали по формуле Clarke J.M. [8]:

$$\% \text{повреждения} = 1 - \frac{1 - T1/T2}{1 - C1/C2} \times 100\%,$$

где C1 – выход электролитов из объектов без воздействия стресса; C2 – полный выход электролитов из объектов без воздействия стресса; T1 – выход электролитов из объектов после стрессового воздействия;

T2 – полный выход электролитов из объектов после стрессового воздействия.

Водоудерживающая способность (ВУС) листьев оценивалась по методике Кожушко Н.Н. [9].

Определение содержания ионов  $K^+$ ,  $Na^+$  и  $Ca^{2+}$  в корнях, листьях и каллусных тканях ячменя проводилось методом мокрой минерализации на атомно-абсорбционном спектрофотометре ААС-1N при длине волны соответственно 766.5, 589.2 и 422.7 нм [10].

Определение активности фермента супероксиддисмутазы (СОД) в корнях проростков ячменя проводилось спектрофотометрическим методом, основанном на определении степени торможения реакции фотохимического восстановления нитротетразолевого синего. За у.е. активности СОД принято количество фермента, необходимое для снижения скорости восстановления нитротетразолевого синего на 50% [11].

Для расчета коэффициента корреляционной зависимости ( $\phi$ ) использовали уравнение:

$$r_{x,y} = \frac{Cov(X,Y)}{\sigma_x \cdot \sigma_y}$$

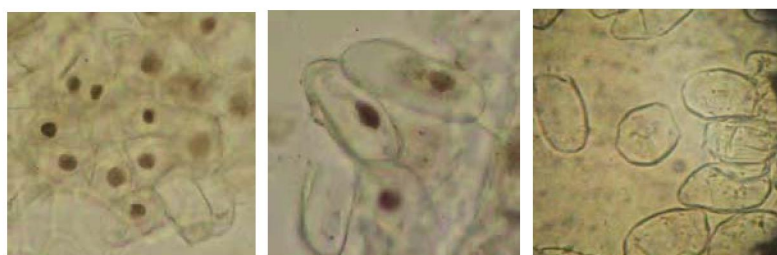
в программе Excel, где  $x$  и  $y$  –

выборочные средние значения массивов исследуемых параметров. Значки \*, \*\*, \*\*\* указывают на достоверность  $\phi$  соответственно при  $P \leq 0,05, 0,01$  и  $0,001$  [12].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

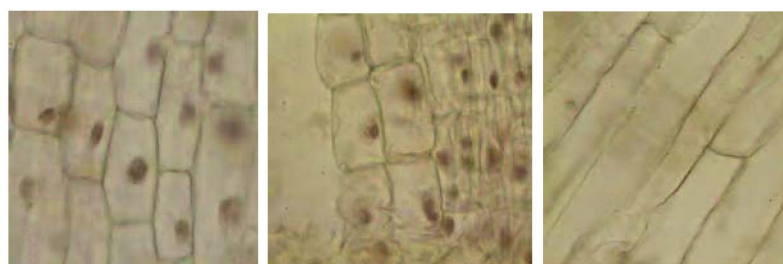
Известно, что зародышевые корни, проникая на большую глубину, чем узловые, призваны «добывать» воду из глубинных слоев, что чрезвычайно важно в условиях осмотического стресса, неотъемлемого компонента как засухи, так и засоления. Часто в неблагоприятных условиях зерновые злаки развиваются только на зародышевых корнях. Именно их нормальное функционирование на протяжении всей вегетации, и особенно в стрессовых условиях, способствует формированию урожайности зерна [13]. Зародышевые корни в первую очередь подвергаются не только осмотическому, но и токсическому воздействию засоления. Поэтому большое значение, на наш взгляд, необходимо придавать устойчивости именно на этом уровне.

Цитологический анализ изменений в клетках корневого чехлика проростков ячменя под действием засоления показал существенные отличия от контроля. Нами наблюдалась разница по форме и интенсивности деления клеток. Отмечены деформированные удлинённые клетки. И в клетках корневого чехлика, и в клетках зоны растяжения большой процент клеток со сжатыми, «сжатой» цитоплазмой, характерной для развития процесса плазмолиза, и мертвых клеток (рисунки 1, 2).



а. б. в.

Рис.1. Клетки корневого чехлика проростков ячменя: а – контроль; б – начало плазмолиза (солевой стресс); в – мертвые клетки (солевой стресс) (ув. x 10).



а. б. в.

Рис.2. Клетки зоны растяжения корня проростков ячменя: а – контроль; б – плазмолиз (солевой стресс); в – мертвые клетки (солевой стресс) (ув. x 10).

В литературе отмечается, что большое различие концентраций ионов внутри и вне клетки воспринимается клеткой как маркер целостности, а, следовательно, системы активного транспорта ионов должны включаться в работу при изменении концентрации по обе стороны мембраны [14]. Развивающийся процесс плазмолиза клеток корня при солевом стрессе не может не сказаться на изменении мембранной проницаемости.

Как видно из таблицы 1, – в условиях нашего эксперимента повреждаемость мембран клеток зародышевых корней при солевом стрессе варьировала от 35% (солетолерантная линия St-33) до 62% (солечувствительная линия 75/1-5) и позволила нам составить представление о солеустойчивости изучаемых генотипов на стадии проростков.

Таблица 1. Повреждаемость клеточных мембран корня в условиях солевого стресса

генотип	Степень повреждения мембран, %
75/1-5	62
к-14220	58
75/1-7	55
Арна	54
к-30356	52
Жулдыз	48
Азык	47
Ранний 1	47
St-33	35

Наименьшей повреждаемостью мембран, помимо St-33, характеризовались такие образцы, как Ранний 1, Азык, Жулдыз. При этом они отличались также хорошими визуальными и ростовыми характеристиками в условиях солевого стресса и наибольшим числом первичных корешков [15].

Поскольку клеточные мембраны корней устойчивых растений меньше повреждаются при стрессовых воздействиях, то можно предположить, что системы регуляции проницаемости и поддержания гомеостаза работают у них эффективнее, чем у неустойчивых [3, 16, 17].

Наглядным показателем повреждаемости мембранных систем при стрессе является активация мембранного транспорта. Данные наших экспериментов выявили снижение соотношения  $K^+/Na^+$  в корнях ячменя под воздействием NaCl в сотни раз (см. таблицу 2).

Однако показано, что у более устойчивых к стрессу форм эти изменения были менее выражены.

В данном контексте представляют несомненный интерес редокс-ферменты, локализованные на клеточной поверхности, в частности редокс-системы плазматической мембраны. Ведь производство в растительных клетках реактивных форм кислорода, таких как прооксиданты и свободные радикалы, вызывающих нарушение клеточного «редокс-статуса» можно назвать «общим знаменателем» стресса, приводящим клет-

Таблица 2. Соотношение концентрации ионов  $K^+/Na^+$  в корнях ярового ячменя под воздействием солевого стресса и без него

генотип	74/2-4	St-39	к-30356	Ранний 1	75/1-5
контроль	6,27	6,12	5,09	4,38	5,08
засоление	0,04	0,09	0,07	0,05	0,08

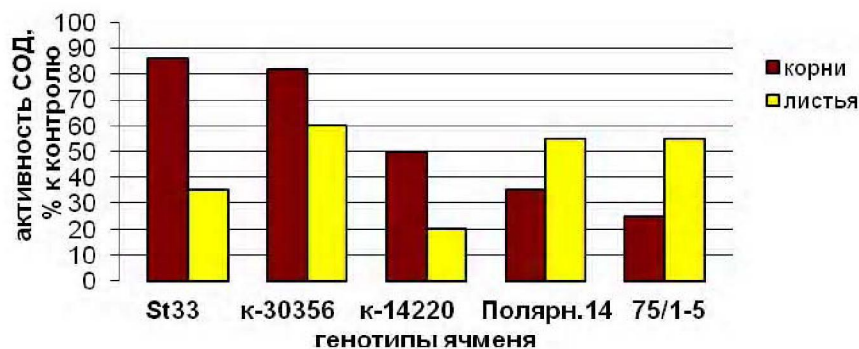


Рис.3. Изменение активности СОД при солевом стрессе в корнях и листьях проростков ячменя

ки к гибели [18]. Известно, что одна из ключевых ролей в антиоксидантной защите принадлежит ферменту супероксиддисмутазе (СОД, КФ 1.15.1.1).

Экспериментально на проростках ячменя ранее нами выявлено, что стрессовые условия подавляли активность СОД у всех изучаемых объектов. Однако, показано, что у более солеустойчивых генотипов ферментативная активность СОД в условиях солевого стресса снижалась в меньшей степени и была более выражена в корнях проростков ячменя, чем в листьях [19] (см. рисунок 3).

Поэтому мы считаем важным фактом выявление нами значимой отрицательной корреляционной связи  $\phi = -0,8^{***}$  между показателем повреждаемости клеточных мембран зародышевых корней и относительной активностью в них фермента-антиоксиданта супероксиддисмутазы при солевом стрессе.

Известно, что мембранная проницаемость не остается постоянной, а изменяется в процессе онтогенеза. На Юго-Востоке Казахстана наиболее сильное влияние почвенной и атмосферной засухи на зерновые культуры наблюдается в период от колошения до налива зерна. Именно в этот период потенциальные адаптивные способности растения играют, пожалуй, самую большую роль. Изменение проницаемости мембран – это интегральный показатель функционального состояния растений, свидетельствующий об

относительной способности растительных тканей снижать физиологическую и метаболическую активность при уменьшении водного потенциала [20]. Наши эксперименты показали большие различия у изучаемых генотипов по данному показателю (см. таблицу 3).

При этом, наиболее информативным показателем проницаемости мембран, как и следовало ожидать, оказался в фазе колошения.

Показана существенная отрицательная корреляционная зависимость между повреждаемостью мембран и водоудерживающей способностью (ВУС) флагового листа –  $\phi = -0,67^{**}$ . Ведь, как известно, мембранная проницаемость является одним из механизмов, регулирующих водоудерживающую способность листьев на субмолекулярном уровне. А признак водоудерживающей способности листьев считается очень важным для многих засушливых зон [20].

Выявлены значимые корреляционные связи этого параметра с такими важными элементами продуктивности зерновых злаков, как масса зерна с главного колоса и масса 1000 зерен.

Поэтому мы считаем, что показатель стабильности клеточных мембран наиболее активно «работающего» в период от колошения до налива зерна флагового листа может служить маркером засухоустойчивых генотипов.

Таким образом, результаты наших экспериментов говорят о значимости показателя проницаемости клеточных мембран при действии аби-

Таблица 3. Повреждаемость клеточных мембран листовых пластинок в условиях засухи

генотип	Повреждаемость мембран, %		Водоудерживающая способность, %		Масса зерна с гл. колоса, г	Масса 1000 зерен, г
	выход в трубку	колошение	выход в трубку	колошение		
Одесский 100	31,8	43,0	26,6	44,0	1,14	41,4
Г 1344/1355	30,1	33,3	23,3	50,4	1,07	41,0
93/80-18	48,0	23,2	25,5	43,9	1,17	43,2
93/80-1	47,7	22,5	12,1	41,5	1,13	41,0
173/83-17	53,5	18,6	24,8	46,6	1,17	45,7
65/84-5	44,7	17,0	28,3	47,6	1,31	49,5
93/80-3	32,7	10,6	24,9	51,7	1,21	48,1
30/83-4	28,0	8,6	31,7	55,5	1,43	61,7
Корреляционные связи						
С массой 1000 зерен	-0,15	-0,78***	0,38*	0,69**		
С массой зерна с главн. колоса	-0,20	-0,57**	0,25	0,57**		
С ВУС		-0,67**				

отических стрессов (засоление, засуха) как информативного и надежного критерия при скрининге соле- и засухоустойчивых генотипов ячменя.

Работа проводилась в рамках проекта фундаментальных исследований НИР РК: Ф.0357-08 (4.3.1.), проект 10Н (4.3.1./294),

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Селье Г. На уровне целостного организма. М.: Наука, 1972. 122 с.
2. Полевой В.В. Физиология растений. М.: Высш. шк., 1989. 464 с.
3. Чиркова Т. В. Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям//Статьи Соросовского образовательного журнала. Биология. 1997. № 9, с.12-17.
4. Таимухамедов Б. А., Гасельганс А. И. Активный транспорт ионов через биологические мембраны, Ташкент, 1973.
5. Максимов Н.А. О проницаемости протоплазмы при завядании растений// Докл. АН СССР, 1938. Т.31. № 4. С.182-183.
6. Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям (методическое руководство) под ред. Удовенко Г.В.// Ленинград, 1988 – с.89-96.
7. Бородина Р.А. Комплексная физиологическая оценка засухо- и жароустойчивости озимой пшеницы в условиях Узбекистана. Л.: ВИР. 1987. 32 с.
8. *Clarce J.M., McCay T.N.* Existed leaf water retention capability as an indicator of drought resistance of *Triticum* genotypes// *Canad. J. Plant Sc.* 1982. V.62. № 3. P.571-578.
9. Кожушко Н.Н. Водоудерживающая способность как показатель засухоустойчивости растений// Тр. по прикл. бот., ген. и сел., – Л., ВИР, 1976, – Т.57. Вып.2. – с. 59-67.
10. Костюк Т.П., Садыков Ш.Ш., Садыков Р.Ш., Бигалиев А.Б. Устройство для автоклавного разложения биоматериалов, повышающее качество экологической оценки природной среды.//Вестник КазНУ №1(9), Алматы, 2000, с.125-127.
11. *Jiang M., Zhang J.* Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defense system and oxidative damage in leaves of maize seedlings// *Plant Cell Physiology*, 2001, V 42(11), p. 1265-1273.
12. Терентьев П.В., Ростова И.С. Практикум по биометрии. – М.,1977.
13. Никитина В.И. Изменчивость хозяйственно-ценных признаков яровой мягкой пшеницы и ячменя в условиях лесостепной зоны Сибири и ее значение для селекции. Автореф. дисс. д.б.н. Санкт-Петербург. 2007. 40с.
14. Болдырев А. А. Ионные градиенты в жизни клеток. Природа. 1992. 7: 78-83.
15. Отчет о НИР: Ф.0357-08 (4.3.1.), проект 10Н (4.3.1..294), 2007, № госрегистрации 0106РК00373.
16. Портуровская С.П. Условия формирования адаптивного потенциала растений озимого ячменя.// Сб. трудов Ставропольского государственного аграрного университета, 2005 г.
17. Грищенкова Н.Н., Лукаткин А.С. Определение устойчивости растительных тканей к абиотическим стрессам с использованием кондуктометрического метода.// Поволжский экологический журнал, 2005 год, № 1.
18. *Current Medicinal Chemistry*, Volume 12, Number 10, May 2005, pp. 1161-1208(48)
19. Терлецакая Н.В., Алтыбаева Н.А., Бисенбаев А.К. Активность фермента-антиоксиданта супероксиддисмутазы у зерновых злаков при солевом стрессе// Вестник КазНУ, сер. Биологическая, № 1 (36), 2008, с.66-68.
20. Кожушко Н.Н. Изучение засухоустойчивости мирового генофонда яровой пшеницы для селекционных целей. Л.: ВИР. 1991. 92 с.

#### Резюме

Өсімдік ұлпасындағы клетка мембранасының өзгеріштігі сондай стрестік факторға, тұзға және құрғақшылыққа төзімділігін бағалады. Арпа генотиптерінің скриндік тұзға және құрғақшылыққа төзімділігін теңдей мембрана өзгеріштігі сенімді түрде көрсетті.

#### Summary

It was analysed of the change to permeability cellular membranes of plant tissues resistances for estimation to such stressful factor, as salt and drought. It is shown that level to permeability of membranes can be used as information and reliable criterion under screening of salt- and drought- tolerance genotypes of barley.