

УДК 611.018.1, 635:64

ИЗМЕНЕНИЯ В СУБКЛЕТОЧНЫХ КОМПАРТМЕНТАХ КЛЕТОК
СЕМЯДОЛЕЙ ТАБАКА В ПЕРИОД ПРОРАСТАНИЯ
ПРИ СОЛЕВОМ И ОСМОТИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Е.Н. БАРАНОВА², А.А. ГУЛЕВИЧ², А.Н. МАЙСУРЯН², Н.В. ЛАВРОВА¹

О Кафедра хранения и переработки плодов и овощей; ² Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН)

Получены данные о цитологических изменениях в клетках мезофилла семядолей, по которым можно провести оценку повреждений растений при засолении. На проростках табака подтверждена чувствительность и специфичность нарушений процессов утилизации запасных веществ (крахмала, запасного белка, липидов). Установлено, что кроме картины замедленного преобразования клеточных компартментов, специфично для осмотического (маннит) и солевого (Na_2SO_4) воздействий, четко идентифицируются изменения хроматина в ядре.

Ключевые слова: запасные вещества, ультраструктура, прорастание, засоление, осмотик, Na_2SO_4 , табак.

Ранние этапы онтогенеза, такие как прорастание семени и формирование проростка, являются критическим периодом в жизненном цикле растений, особенно при неблагоприятных условиях окружающей среды. В частности, почвенное засоление значительно снижает продуктивность растений [9, 10] и представляет собой сильный повреждающий фактор для развития проростков гликофитов, к которым относят большинство с.-х. культур.

Ранее предполагалось, что воздействие солей, приводящее к замедлению развития на первых этапах прорастания, связано в первую очередь с недостаточным поступлением воды (осмотическим фактором) [12]. В то же время для взрослых растений многие физиологи однозначно указывали на наличие сложной системы регуляции солеустойчивости, связанной со специфическим влиянием различных ионов у отдельных органов и целых растений томата [1, 7]. Однако в последнее время установлено не только осмотическое, но и специфическое, часто именуемое токсическим, действие растворов солей на набухание и прорастание семян. Кроме того, успешное в ряде случаев применение солей для «праймирования» — предобработки семян, выявило некоторые преимущества (в устойчивости к другим стрессорам) у растений, полученных из подвергнутых обработке семян. Это может объясняться появлением неспецифического ответа, который вызывается экспрессией генов, отвечающих не только за толерантность к данному стрессовому фактору но и за толерантность к повреждающим факторам других, как абиотических, так и биотических стрессов. В мировой литературе имеется немного сведений о сущности процессов, из-за которых происходит замедление (ингибирование) прорастания семян и формирования

проростков в условиях солевого воздействия. В основном всё изучение сводится к оценке динамики морфометрических показателей различных частей семени [13] и только в одном случае проводился учет изменения тотальных запасных резервов эндосперма [14]. Также единичны случаи исследования биохимической активности ферментов, участвующих в мобилизации запасных резервов семян в условиях засоленности внешней среды [6, 8, 11]. Информативность подобных исследований можно значительно увеличить, применив цитологические методы для изучения процессов распада и утилизации запасных веществ в прорастающих семенах.

Ранее на модели развивающихся проростков одного из представителей двудольных растений — люцерны посевной методами электронной микроскопии нами было детально изучено влияние солей и осмотика маннитола на процесс мобилизации запасных веществ, депонированных в пластидах, липидных каплях (олеосомах) и в белковых телах клеток семядолей [2]. Подобные наблюдения были подтверждены и для клеток семядолей томата [5]. Было показано, что у растений, развивавшихся в условиях засоления среды, наблюдаются четко тестируемые изменения в динамике мобилизации запасных веществ. Обнаружена специфичность действия осмотика и солей, которая проявляется в общем стимулирующем влиянии низких концентраций солей на рост и развитие растений и их ингибирующем эффекте в высоких концентрациях. В настоящей работе была поставлена задача: на примере проростков табака, часто выращиваемого на почвах как с первичным, так и с вторичным засолением, подтвердить полученные ранее данные о влиянии солей на утилизацию запасных веществ в клетках семядолей; детально изучить процесс преобразования внутриклеточных компартментов, в которых депонированы запасные вещества (крахмал, липиды и белки), в норме и в условиях адаптации к солевому стрессу; а также на структурную организацию ядер, характеризующую функциональное состояние генетического аппарата клетки.

Методика

В качестве объекта использовали развивающиеся проростки табака (*Nicotiana tabacum*, сорт "Samsun"). Осмотический стресс индуцировали растворами Na₂SO₄ и маннитола. Для унификации условий воздействия концентрации реагентов выравнивали по осмотическому давлению до 600 кПа.

Семена проращивали в темноте при 22-25°C — 1 сут. и далее в условиях 12-часового фотопериода, при 18-20°C в темноте и 22-25°C на свету в водных растворах реагентов в чашках Петри (по 100 семян). Для электронно-микроскопического анализа использовали листья семядолей 20-дневных проростков. В качестве контроля использовали те же органы проростков, взятые на 8-е сут. после прорастания на дистиллированной воде.

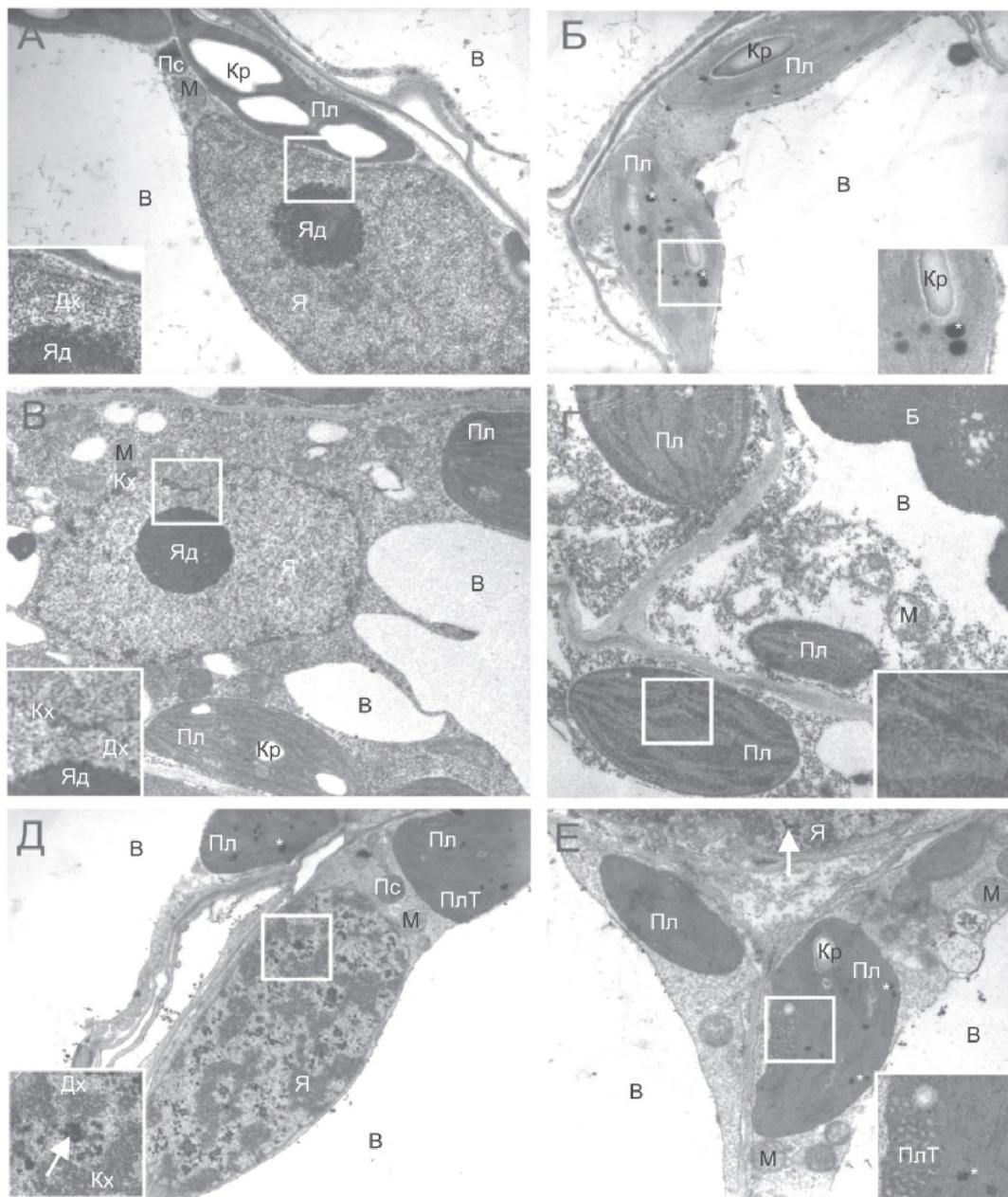
Для электронной микроскопии фрагменты семядольных листьев шириной 0,5-1 мм и длиной 1-2 мм фиксировали 4 ч при комнатной температуре в 2%-м растворе глутарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере с добавлением сахарозы (15 мг/мл, рН 7,2). Постфиксацию материала проводили в 1%-й четырехокиси осмия на том же буфере 2 ч. Дегидратацию и заключение материала в эпоксидную смолу проводили по стандартной методике. Ультратонкие срезы готовили на микротоме LKB — V (LKB, Швеция). Срезы окрашивали цитратом свинца и просматривали на трансмиссионном электронном микроскопе H-300 (Хитачи, Япония) при ускоряющем напряжении 100 кВ и рабочем увеличении X10000.

Результаты и их обсуждение

Для изучения повреждения процессов, связанных с утилизацией запасных веществ, являющихся первичным материалом строительства растительных тканей в проростках, мы исследовали утилизацию запасных веществ семядоли табака (крахмальных зерен и пластоглобул в пластидах, запасного белка в вакуолях, олеосом в цитоплазме) в контроле (рис. 1 А, Б) и при предобработке осмотиком (рис. 1 В, Г) и Na_2SO_4 (рис. 1 Д, Е). Кроме наблюдения за наличием и количеством неутризованных в связи с засолением запасных веществ мы обращали внимание на процессы преобразования компартментов. Так можно утверждать, что имитирующий осмотическое воздействие маннитол вызывал замедление утилизации белка и препятствовал слиянию вакуолей. Развитие же тилакоидов и ламеллярной системы в хлоропластах в целом соответствовало контролю, однако грани были менее выражены и содержали меньшее количество тилакоидов (рис. 1 В, Г). Можно также отметить отсутствие пластоглобул на фоне сохранения небольших крахмальных зерен.

Предобработка Na_2SO_4 способствовала изменениям в ядерном компартменте (рис. 1 Д), вызывая появление конденсированных участков хроматина. Сульфат натрия препятствовал развитию хлоропластов, что выражалось в сохранении проламеллярных тел (рис. 1 Е), наличии пластоглобул и крахмала (рис. 1 Д, Е). Можно отметить, что в данном эксперименте Na_2SO_4 не оказывает заметного влияния на утилизацию белка и крахмала. Подобные наблюдения позволяют подтвердить полученные нами ранее на люцерне [2-4] и томате [5] данные о специфическом действии солей и осмотика на утилизацию запасных веществ и преобразование содержащих их запасающих компартментов в компартменты, характерные для вегетирующих и фотосинтезирующих тканей. Важным фактом является то, что наряду с подтверждением предположение о различиях, свидетельствующих о специфической чувствительности утилизации запасных веществ как к осмотическому, так и токсическому воздействию, все же эта чувствительность на уровне различных компартментов неодинакова и зависит от вида растения. Так, Na_2SO_4 вызывал замедление утилизации крахмала в клетках мезофилла при проращивании люцерны [4] и при предобработке томата [5], но при предобработке табака это явление нами не отмечалось. Также отсутствовали нарушения в утилизации липидов из олеосом, описанные как для люцерны, так и для томата [3, 5]. Эти отличия могут свидетельствовать либо о более быстрой перестройке метаболизма утилизации резервов у табака, либо о меньшей чувствительности к данному воздействию ферментов, участвующих в утилизации липидов.

В данном исследовании мы показали, что в клетках табака под действием неблагоприятных условий, имитирующих факторы засоления (осмотический фактор — маннитол, токсический и осмотический факторы — Na_2SO_4), происходят замедление утилизации запасных веществ и преобразование содержащих их компартментов, изменение роста клеток растяжением и пролиферативной активности, изменение размеров клеток. Таким образом, на растениях табака подтверждено, что внутриклеточные цитологические мишени (маркеры) чувствительны к воздействиям, имитирующим засоление, как это было ранее установлено для люцерны (*Medicago sativa* L.) [2] и томата (*Solanum lycopersicum*) [5]. Подтверждено также, что воздействия специфически влияют на ядро клеток семядоли, как и у томата, что позволяет визуально идентифицировать структурные изменения, связанные, возможно, с эпигенетическими ответами на действие абиотических факторов.



Ультраструктура клеток мезофилла семядольных листьев табака при прорастании в присутствии маннитола (В, Г), Na_2S_0_4 (Д, Е) и в контрольных условиях (А, Б).

Обозначения: В — вакуоль, М — митохондрия, Пл — пластида, Плт — проламеллярное тело, Пс — пероксисома, Я — ядро, Яд — ядрышко, Дх — диспергированный хроматин, Кх — конденсированный хроматин, * — пластоглобулы, стрелка — уплотненные образования неизвестной этиологии

Возможные области практического использования результатов работы состоят в том, что полученные данные в дальнейшем планируется использовать для оценки солетолерантности растений, модифицированных методами генетической инженерии или клеточной селекции. Они позволят проводить комплексную физиологическую оценку эффективности интродуцированных генов, способных усиливать адаптивные возможности растений. Важно, что метод цитологических маркеров можно использовать на ранних этапах отбора модифицированных растений, что позволит отделять линии, действительно обладающие устойчивостью к засолению, от линий, просто прошедших успешную генетическую трансформацию, но не проявивших толерантность к различным абиотическим стрессовым воздействиям, в т.ч. к засолению.

Заключение

Изученные цитологические маркеры-мишени (утилизация крахмала в пластидах, липидов в олеосомах и запасного белка в вакуолях) являются высокочувствительными и специфически реагируют на различные типы засоления и осмотические воздействия.

Для детальной характеристики повреждения метаболических процессов может эффективно использоваться ультраструктурное обследование процессов утилизации запасных веществ с фиксацией преобразований запасующих компартментов клетки.

Работа частично профинансирована грантом РФФИ 07-08-00610-а и по программе РАСХН 04.03.03.01.

Библиографический список

1. Алиева З.М., Прусакова Л.Д., Самедова Н.Х., Юсуфов А.Г. Реакция проростков и изолированных органов томатов и фасоли на NaCl-засоление // *Агрехимия*, 2008. № 6. С. 45-51.
2. Баранова Е.Н., Лаврова Н.В., Гулевич А.А. Динамика утилизации запасных веществ в семядолях люцерны под влиянием солей и осмотика // *Известия ТСХА*, 2005. Вып. 4. С. 169-173.
3. Баранова Е.Н., Гулевич А.А., Поляков В.Ю. Эффекты NaCl, Na₂SO₄ и маннита на утилизацию запасных липидов в семядолях и корнях проростков люцерны посевной // *Физиология растений*, 2006. № 6. С. 880-885.
4. Баранова Е.Н., Гулевич А.А., Поляков В.Ю. Эффекты NaCl, Na₂SO₄ и маннита на утилизацию запасного крахмала и формирование пластид в семядолях и корнях проростков люцерны / *Физиология растений*, 2007. № 1. С. 59-67.
5. Баранова Е.П., Лаврова Н.В., Гулевич А.А. Цитологическая характеристика устойчивости мобилизации запасных веществ у томата при засолении // *Известия ТСХА*, 2009. Вып. 3. С. 61-64.
6. Домаши В.П., Сосновская Т.Ф., Шарпио Т.П., Забрейко С.А. Активность системы протеолиза люпина желтого (*Lupinus luteus* L.) и ячменя (*Hordeum vulgare* L.) в условиях солевого стресса // *Известия НАН Беларуси. Сер. Биол. наук*, 2006. № 3. С. 22-26.
7. Строгонов Б.П. Физиологические основы солеустойчивости растений. М.: АН СССР, 1962.
8. Ben Miled D.D., Zarrouk M., Cherif A. Sodium Chloride Effects on Lipase Activity in Germinating Rape Seeds, 2000. Vol. 28. Part 6. P. 899-902.
9. Hosseini A.K., Powell A.A., Bingham I.J. Comparison of the Seed Germination and Early Seedling Growth of Soybean in Saline Conditions // *Seed Sci. Res.*, 2002. Vol. 12. P. 165-172.
10. Joshi A.J., Mali B.S., Hinglajia H. Salt tolerance at germination and early growth of two forage grasses growing in marshy habitats // *Environ. Exp. Bot.*, 2005. Vol. 54. P. 267-274.
11. Lin C.C., Kao C.H. NaCl stress in rice seedlings: starch // *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 1995. Vol. 36. P. 169-173.
12. Munns R. Comparative physiology of salt and water stress Plant, Cell & Environment, 2002. V. 25. P. 239-250.

13. Rogers ME, Noble CL, Halloran GM, Nicholas ME. The Effect of NaCl on the Germination and Early Seedling Growth of White Clover (*Trifolium repens* L.) Populations Selected for High and Low Salinity Tolerance // Seed Sci. Technol., 1995. Vol. 23. P. 277-287.

14. Soltani A., Gholipour M, Zeinali E. Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity // Environ. Exp. Bot., 2006. Vol. 55. P. 195-200.

15. Voigt E.L., Almeida T.D., Chagas R.M., Ponte L.F.A., Viegas R.A., Silveira J.A.G. Source-sink regulation of cotyledonary reserve mobilization during cashew (*Anacardium occidentale*) seedling establishment under NaCl salinity // J. Plant Physiol., 2008. Vol. 166. P. 80-89.

Рецензент — д. б. н. Л. А. Паничкин

SUMMARY

The article touches data on cytological changes in mesophyll cells of cotyledons, by which one can make an evaluation of detriment to plants under conditions of salinization of soil. Both sensitivity and specificity of storage compounds utilization processes disorder (starch, storage protein, lipids) have been confirmed in tobacco seedlings. It has been established that in addition to the pattern of delayed transformation of cell compartments, specific to both osmotic (mannitol) and saline (Na₂SO₄) effect, changes in chromatin in nucleus can be clearly identified.

Key words: storage compounds, ultra-structure, germination salinization, osmotic, Na₂SO₄, tobacco.

Баранова Екатерина Николаевна — к. б. н. Эл. почта: greenpro2007@rambler.ru

Гулевич Александр Анатольевич — Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН. Эл. почта: iab@iab.ru

Майсuryн Александр Николаевич — д. б. н.

Лаврова Наталия Владимировна — д. б. н. Тел. (499) 977-10-33.

Эл. почта: Gaplo@rambler.ru