

УДК 611.018.1, 631.147, 635.64

ДИНАМИКА УТИЛИЗАЦИИ ЗАПАСНЫХ ВЕЩЕСТВ В СЕМЯДОЛЯХ ЛЮЦЕРНЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ СОЛЕЙ И ОСМОТИКА

Е.Н. БАРАНОВА, Н.В. ЛАВРОВА, А.А. ГУЛЕВИЧ*

(Кафедра хранения, переработки и товароведения продукции
растениеводства)

Приведены результаты исследований по разработке метода предварительной оценки устойчивости двудольных растений к абиотическим стрессам по цитологическому анализу утилизации запасных веществ семядолей. Полученные результаты показали, что нарушения утилизации запасного крахмала, белка и липидов имеют специфический характер в зависимости от действующего стрессора.

Прорастание и развитие проростка являются критическими фазами в жизненном цикле семенных растений, в течение которых проростки должны адаптировать свои программы развития и метаболизма к условиям окружающей среды [5].

Основные типы запасных веществ (ЗВ), такие как полисахариды, запасные белки, липиды, откладываются в виде крахмальных зерен амилопластов, белковых тел вакуолей и олеосом (липидных включений) цитоплазмы в различных частях семени [4]. В зависимости от вида растения и принадлежности его к двудольным или однодольным существует множество характерных отличий в местах локализации ЗВ семени [6]. Биохимические аспекты и особенности компартиментализации хорошо изучены у ряда растений [3].

При прорастании семян происходит процесс мобилизации ЗВ, что на ультраструктурном уровне выражается в освобождении специализированных компартментов (вакуолей, пластид и липидных капель) от ЗВ.

Этот процесс подробно описан для ряда с.-х. растений [3].

Принципиальную важность в связи с воздействием на продуктивность приобретает вопрос о влиянии стрессовых факторов на процесс утилизации ЗВ. Изучение подобных взаимосвязей становится доступным при совместном протекании двух процессов: прорастания и действия стрессового фактора. Стабильное прорастание семян в неблагоприятных условиях может быть определяющим для получения устойчивого и качественного урожая.

Засоление является самой серьезной угрозой для сельского хозяйства и для окружающей среды. Сильное засоление может привести к снижению урожайности или гибели с.-х. растений [7]. Это послужило причиной изучения влияния действия NaCl, Na₂SO₄ и маннитола (осмотика) на утилизацию ЗВ в семядолях люцерны посевной (*Medicago sativa* L.).

Полученные результаты показали, что нарушения утилизации за-

* ВНИИСБ РАСХН.

пасного крахмала, белка и липидов имеют специфический характер в зависимости от действующего стрессора.

На основании наших данных предложен тест, характеризующий влияние стрессового фактора на утилизацию 3 типов ЗВ (полисахаридов, белков и липидов) по наличию или отсутствию и конформации специфических образований их локализации (крахмальных зерен, белковых тел и липидных включений цитоплазмы).

Методы

Исследовали проростки люцерны посевной сорта Надежда. Семена помещали в условия действия NaCl , Na_2SO_4 и маннитола в различных концентрациях, выравненных по осмотическому давлению до 2 и 6 атмосфер по стандартной методике [1]. Контрольные семена проращивали в дистиллированной воде.

Семена проращивали в водных растворах на фильтровальной бумаге в чашках Петри (по 100 шт. на чашку) в условиях без освещения при t 20–25°C — 1 сут и далее 12-часового фотопериода, при освещении $5 \cdot 10^3$ лк от белых люминесцентных ламп, при температуре 17–18°C ночью и 20–25°C днем. В опытах использовали семядольные листья 8-дневных проростков.

Для получения срезов кусочки семядольных листьев шириной 0,5–1 мм и длиной 1–2 мм фиксировали (поперечный срез) в 2%-м растворе глутарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере с добавлением сахарозы (15 мг/мл, рН 7,2) 4 ч при комнатной температуре. Дофиксацию проводили в 1 %-й четырехокиси осмия на том же буфере 2 ч. Образцы дегидратировали в серии растворов этанола восходящей концентрации (30, 50 и 70%) по 30 мин при комнатной температуре. Пос-

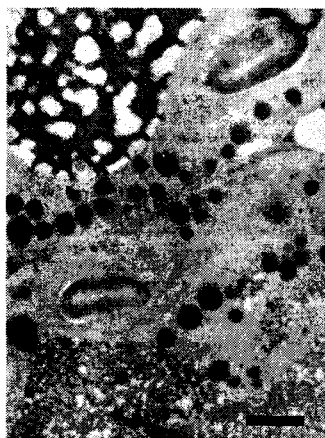
ле этого материал доводили до абсолютного этанола. Дополнительно обезживали окисью пропилена. Образцы помещали в смесь окиси пропилена и смол в соотношении 2:5; 1:1; 5:2 (по 1 ч) и оставляли на ночь. Заливку проводили смесью смол аралдита и эпона с катализатором. Полимеризация длилась 2 сут при температуре 62°C.

Ультратонкие срезы готовили на микротоме LKB — V (LKB, Швеция). Срезы окрашивали цитратом свинца по Reynolds [8] и просматривали на трансмиссионном электронном микроскопе Н-3 (Хитачи, Япония) при ускоряющем напряжении 100 кВ и рабочем увеличении $\times 10000$. Полученные негативы не менее 90 шт. на образец анализировали и измеряли площадь пластид и крахмальных зерен в условных единицах.

Результаты и их обсуждение

Электронно-микроскопический анализ ЗВ показал, что в контрольных условиях в клетках мезофилла семядолей на 4-е сут имеются амилопласты с крупными крахмальными зернами, липидные включения в цитоплазме в виде капель и белковые тела в вакуоли (рис. 1а). Эти структурные компоненты характерны для ранних этапов развития семядоли и соответствуют имеющимся в литературе описаниям ЗВ проростков двудольных [2, 3]. На 8-е сут наблюдали изменение специфических для ЗВ компартментов, связанных с исчезновением большей части белковых тел в вакуоли, олеосом (липидных включений в цитоплазме) и крахмальных зерен на фоне формирования хлоропласта из амилопласт (рис. 1б).

Определение морфометрических показателей (всхожесть, длина корня и биомасса) показало, что при всех видах воздействия (NaCl ,



a



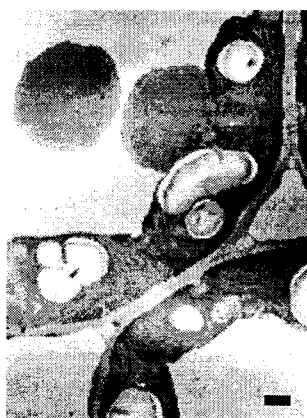
б



в



г



д



е



и



к

— 1 МК

Na_2SO_4 , маннитол) наблюдалась стимуляция при низких концентрациях (2 атм.) и угнетение при высоких концентрациях (6 атм.).

Утилизация ЗВ в присутствии стрессовых факторов

Белковые тела. В присутствии NaCl (2 и 6 атм) происходила полная утилизация белковых тел на 8-е сут (рис. 1в, г) Обработка маннитолом приводила к нарушениям в утилизации, что выражалось в визуализации плотных белковых тел, расположенных в вакуоли, имеющих округлую форму и более светлый периферический ободок (рис. 1д, е). Характерна ассоциация части белковых тел с тонопластом (рис. 1е). Обработка Na_2SO_4 приводила к изменениям, связанным с наличием крупных и мелких плотных белковых тел линзовидной формы, ассоциированных с поверхностью тонопласта при 2 атм (рис. 1и) с увеличением объема белковых включений неправильной формы при 6 атм (рис. 1и, к).

Крахмальные зерна. NaCl вызывал изменения в структуре пластид и количестве крахмальных зерен, что выражалось в наличии мелких крахмальных зерен при низкой концентрации — 2 атм (рис. 1в) и уменьшении крахмальных зерен при 6 атм (рис. 1г). Действие маннитола выражалось в сохранении формы пластид, как в 8-суточном контроле, и числе крахмальных зерен, значимо превышающем 4-суточный контроль при низкой (2 атм) и при высокой (6 атм) интенсивности (рис. 1д, е). Na_2SO_4 при 2 атм характеризовался незначительными включениями крахмала в хлоропластах (рис. 1и), при 6 атм форма и количество крахмальных зерен напоминали 4-суточный контроль (рис. 1к).

Липидные включения. Под действием NaCl наблюдали цитоплазму,

содержащую некоторое количество липидных включений характерной округлой формы при 2 и 6 атм (рис. 1в, г). В присутствии маннитола как при 2, так и при 6 атм (рис. 1д, е) наблюдались липидные включения неправильной формы, количество запасных липидов было значительно больше при 6 атм (рис. 1е). Воздействие Na_2SO_4 проявлялось в наличии липидных включений неправильной формы в цитоплазме при 2 атм (рис. 1и) и большом числе липидных включений продолговатой формы с неровным краем при 6 атм (рис. 1к).

Полученные данные свидетельствуют о влиянии засоления и осмотического фактора на утилизацию ЗВ. В связи с различиями в токсичности ионов и особенностями в воздействии осмотического и ионного факторов солевого стресса и в зависимости от интенсивности воздействия влияние различных стрессоров на источники ЗВ: запасные вакуоли (белковые тела), пластиды (крахмальные зерна), олеосомы (липидные капли) характеризовалось типичными для каждого стрессора изменениями в клетках паренхимы семядолей. Это может свидетельствовать о различиях в защите от действия стрессовых факторов процессов утилизации ЗВ и транспорта продуктов распада, а также об индивидуальной реакции ферментативных комплексов, отвечающих за мобилизацию ЗВ, на разные типы воздействий.

Засоление и действие осмотика при большой интенсивности (6 атм) вызывало явное замедление процессов утилизации ЗВ, так как при всех типах воздействий наблюдалось значительно большее количество компартментов ЗВ по сравнению с контролем. Однако влияние солей и осмотика носило спе-

цифический характер. Так, засоление NaCl почти не влияло на утилизацию белковых тел в вакуолях и не оказывало отрицательного воздействия на метаболизм запасного крахмала, однако об ингибировании процессов расщепления липидов свидетельствует наличие некоторого количества липидных капель при 2 атм и несколько большего количества при 6 атм. Маннитол вызывает ингибирование процессов утилизации даже в незначительной концентрации, особенно это относится к утилизации крахмала, так как количество и размер крахмальных зерен указывает на то, что он расщеплен на 8-е сут в меньшей степени, чем в 4-суточном контроле. Сильное ингибирование процессов утилизации липидов отмечено при действии маннитола и Na₂SO₄. Сульфат натрия, кроме того, препятствовал процессу утилизации белка при 6 атм.

Заключение

Специфическое нарушение утилизации ЗВ под действием стрессовых факторов разной природы свидетельствует о связи повреждений метаболизма при негативных процессах в проростках и взрослых растениях с повреждениями метаболизма ЗВ в семядолях, где эти процессы протекают более наглядно. Таким образом, характер изменений метаболизма ЗВ при прорастании может от-

ражать нарушения, происходящие в растениях при запасании ЗВ, что является наиболее значимым показателем урожайности. На основании полученных данных предложен тест, характеризующий как положительное, так и отрицательное влияние на 2 из 3 значимых факторов метаболизма ЗВ (утилизация и транспорт продуктов распада) с учетом влияния на 3 основных компонента ЗВ растений: белков, углеводов и липидов. Влияние стрессовых факторов на синтез ЗВ нами не изучалось.

В этой связи перспективной задачей является упрощение инструментальной базы теста до биохимического или микроскопического уровня с использованием световой микроскопии со специфичным окрашиванием ЗВ по трем типам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методические указания по определению солеустойчивости кормовых культур по прорастанию семян в солевых растворах. Л.: ВИР, 1974. — 2. Химия и биохимия бобовых растений. М.: Агропромиздат, 1986. — 3. Эмбриология растений. Т. 2, М.: Агропромиздат, 1990. — 4. *Bewley J.D., Blak M.* Seeds: Physiology of development and germination. New York. Premium Press, 1994. — 5. *Holdworth M., Kurup S., McKibbin R.* // *Trends Plant Sci.*, 1999. 4, 275–280. — 6. *Martin A.C.* The comparative internal morphology of seeds. 1946. *Am. Midl Nat* 36: 513–660. 7. *Parida A.K., Das A.B.* // *Ecotoxicology and Enviromental Safety* 60, 2005, 324–349. — 8. *Reynolds E.S.* // *Cell Biol.* 17:208–12, 1963.

Статья поступила
23 сентября 2005 г.

SUMMARY

Research results to work up a method of preliminary evaluation of dicotyledonous plants' stability to abiotic stress are given. The results achieved show that the breach of utilization of stored reserve starch and protein has got specific character depending on the stressor.