

## ВЛИЯНИЕ СОЛЕВОГО СТРЕССА НА ОСНОВНЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ

© 2000 г. Ю.О. Трухина, Р. Шайбе, А.Т. Епринцев

Воронежский государственный университет

Длительное воздействие солевого стресса приводит к понижению ассимиляции, транспирации, фотохимического гашения флуоресценции хлорофилла а и параллельно к значительному возрастанию нефотохимического гашения. Наблюдалась тенденция уменьшения содержания белка и увеличения концентрации свободных гексоз и сахарозы, несмотря на относительно стабильное содержание хлорофилла. Увеличение концентрации малаита коррелировало с динамикой активности НАД-МДГ.

Одна треть общей площади, используемой для орошаемого земледелия, засолена. По мере роста потребности в источниках воды для ирригации всё большей необходимостью становится использование воды из таких источников, как дренажные каналы и сточные воды, которые часто содержат значительные примеси солей. Большинство культурных растений являются гликофитами, т.е. организмами, чувствительными к засолению. Изучение ответа растений на повышенные концентрации солей в окружающей среде способствует выяснению механизмов устойчивости, приспособлений к засолённым местам обитания. Большинство растений способно в какой-то мере регулировать осмотическое давление в целях сохранения необходимого градиента водного потенциала по отношению к солевому почвенному раствору. В клетках растений синтезируются органические осмополиэты, поддерживающие осмотический потенциал [1]. Проводились эксперименты, в которых сельскохозяйственные растения, такие, как томат и дыня, подвергали засолению на стадии созревания плодов. Химический анализ последних показал повышение содержания растворимых веществ, сахаров и возрастание кислотности [2]. Во многих случаях первоначальной ответной реакцией гликофитов является утрата способности замыкающих клеток листа регулировать осмотическое давление, что приводит к увеличению устойчивого сопротивления по отношению к диффузии  $\text{CO}_2$ . Засоление также вызывает изменение протекания фотофизических и фотохимических стадий фотосинтеза. Фотосинтез может подавляться и при повышенных концентрациях  $\text{CO}_2$ . Изменяется распределение потока электронов и меньшая их доля

используется на совершение полезной, с точки зрения фотосинтеза, работы [3].

В связи с этим целью данной работы являлось изучение изменения основных физиолого-биохимических параметров картофеля при длительном засолении и способности к восстановлению нормального функционирования после солевого стресса.

### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали картофель сорта Desi (возраст 1 месяц), выращенный гидропонным методом в среде следующего состава:  $\text{KNO}_3$  6 мМ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  4 мМ,  $\text{MgCl}_2$  4 мМ,  $\text{MgSO}_4$  2 мМ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 мМ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 мМ,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  45,6 мкМ,  $\text{FeCl}_3$  80 мкМ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  46 мкМ,  $\text{MnCl}_2$  7,5 мкМ,  $\text{ZnSO}_4$  0,76 мкМ,  $\text{CuSO}_4$  0,32 мкМ,  $\text{NaMoO}_4$  12 мкМ.

Интенсивность света составляла 170 мкмоль квантов  $\text{m}^2\text{s}^{-1}$  при измерении на высоте растения, относительная влажность 75% при ежедневном освещении в течение 12 часов (22°C) и 12 часах темноты (18°C).

Измерения проводили в первьевых листьях (4-5 номер считая от верхушки) растений, подвергавшихся в течение 3 недель воздействию 50 и 100 мМ  $\text{NaCl}$ , а также в послестрессовый период (1 неделя в обычных условиях выращивания).  $\text{NaCl}$  добавлялся к растениям в возрасте 1 месяца.

Определение газообмена и флуоресценции хлорофилла осуществляли одновременно. Газообмен измеряли с помощью системы LCA4 ( ADC, Hoddesdon, UK). Гашение флуоресценции хлорофилла а измеряли с помощью флуориметра PAM (Walz, Effeltrich, Германия). Квантовый выход фотосинтетического

электронного транспорта, ( $\Phi_{II}$ ), и коэффициенты гашения флуоресценции хлорофилла а определяли, как описано Schreiber et al., 1986 [4]; Walker, 1987 [5]; Kooten & Snel, 1990 [6]. Измеряли активности оксидоредуктазных малатдегидрогеназ: НАДФ-МДГ (КФ 1.1.1.82), НАД-МДГ (КФ 1.1.1.37) [7]. Параллельно

определяли содержание малата, глюкозы, фруктозы, сахарозы [8] и крахмала [9].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведённые измерения ассимиляции, транспирации и межклеточного  $\text{CO}_2$  показали, что после воздействия в течение 1 недели 50 mM NaCl уровень ассимиляции был выше, а при 100 mM этот уровень был ниже, чем в контрольных растениях. Сходная картина наблюдалась для величин транспирации и для концентрации  $\text{CO}_2$  в межклеточном пространстве. По истечении 2 недель экспозиции эти параметры были ниже контрольного уровня при высоких интенсивностях света. После третьей недели засоления параметры обоих вариантов становились одинаковыми при высокой интенсивности света и были ниже контрольного уровня ~на 20%. (Рис.1).

Через 1 неделю после окончания засоления, в нормальных условиях, исследуемые показатели растений (50 mM NaCl) нормализовались. Ассимиляция и концентрация  $\text{CO}_2$  в межклеточном пространстве картофеля, подвергавшегося воздействию 100 mM, оставались немного ниже: ассимиляция составляла ~70%, концентрация  $\text{CO}_2$  ~94% (при высоких интенсивностях света). Следовательно, эти растения не восстановились, т.к. их 3-х недельная экспозиция при 100 mM NaCl - это слишком много или, возможно, 1 неделя опять в нормальных условиях - это слишком мало для восстановления нормальной физиологической деятельности данных растений.

Засоление оказывало четкое влияние на флуоресценцию хлорофилла а. По существующим представлениям, если энергия возбуждения использовалась бы растением для фотосинтеза, то флуоресценция будет представлять часть забракованной энергии. В таком случае можно ожидать взаимной зависимости, т.е. если фотосинтез станет лимитироваться каким-либо внешним фактором, например таким, как нехватка  $\text{CO}_2$ , то больше энергии будет лишней, что вызовет интенсификацию флуоресценции. Таким образом, чем интенсивнее протекает процесс фотосинтеза, тем меньше наблюдаемая флуоресценция [4]. Уменьшение флуоресценции из-за переноса электронов к первому стабильному акцептору электронов фотосистемы II QA называют «фотохимическим гашением», - « $q_Q$ », чтобы отделить его от других механизмов «гашения» - «нефотохимической» природы. Они включают в себя гашение окисленным пластохиноном ( $q_P$ ), гашение в результате «переходов состояния» ( $q_T$ ) и гашение, связанное с фотоингибирированием ( $q_I$ ). Глав-

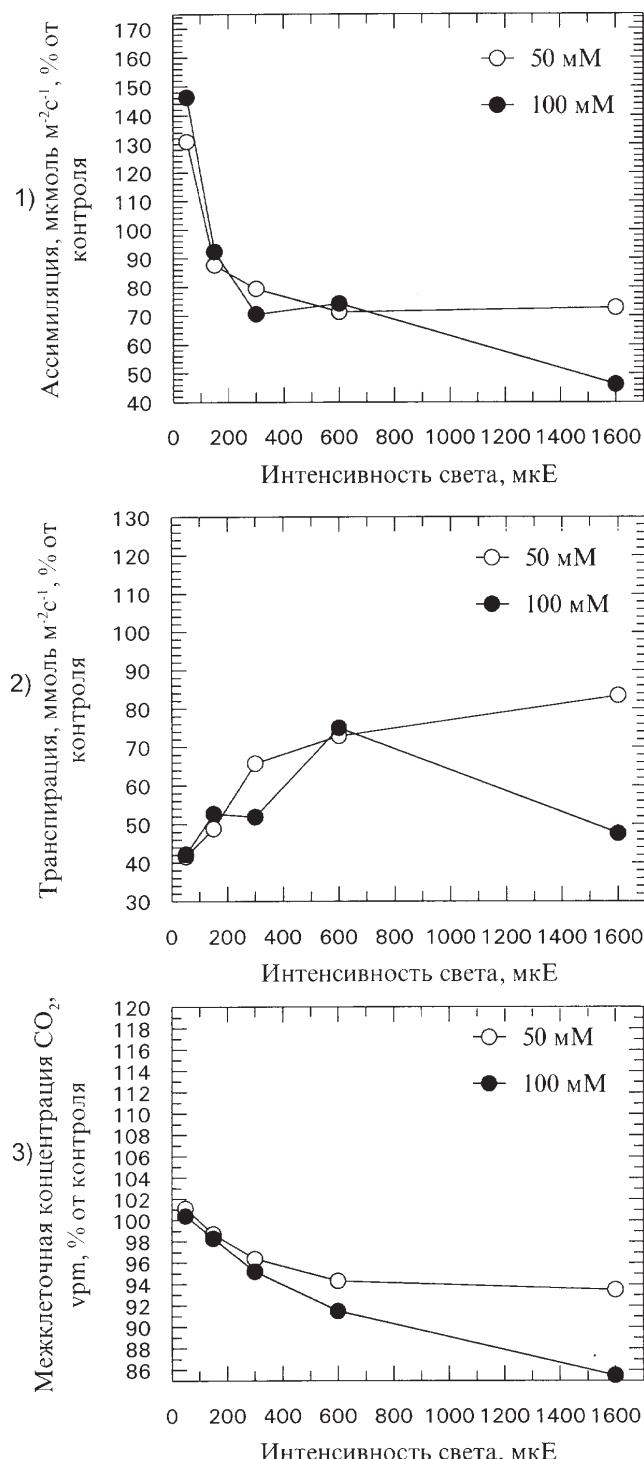
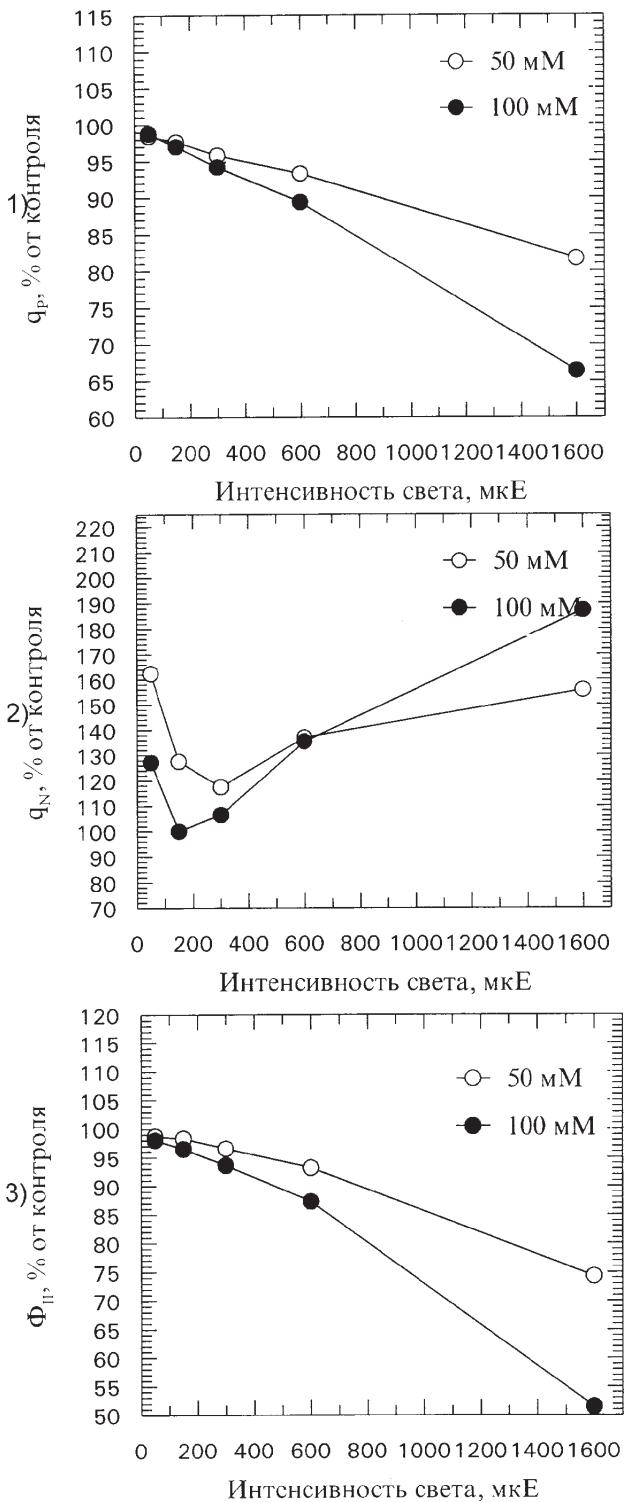


Рис. 1 Газообмен листьев картофеля через 2 недели воздействия NaCl: 1) ассимиляция, 2) транспирация, 3) межклеточное содержание  $\text{CO}_2$ .

**Рис. 2** Коэффициенты гашения флуоресценции хлорофилла а через 2 недели воздействия NaCl: 1) фотохимическое гашение, 2) нефотохимическое гашение, 3) квантовый выход фотосистемы II



ным нефотохимическим механизмом гашения, однако, является высокоэнергетическое гашение, или « $q_E$ ». Оно связано с протонным градиентом, создающимся на мембране тилакоида в результате освещения. Ког-

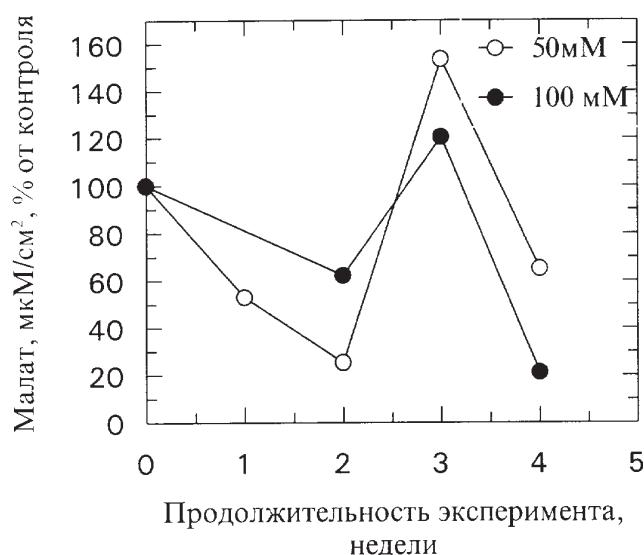
да протонный градиент большой,  $q_E$  будет высоким и флуоресценция «гасится», т.е. при низкой ассимиляции значения  $q_E$  высоки. Согласно стандартизации параметров «гашения»,  $q_p$ ,  $q_T$ ,  $q_I$  и  $q_E$  объединены под общим названием «нефотохимического гашения»



**Рис. 3** Изменения концентрации глюкозы, фруктозы и сахарозы в листьях картофеля при воздействии NaCl в течение 3 недель и восстановлении в течение 1 недели: 1) глюкозы, 2) фруктозы, 3) сахарозы.

**Таблица 1.** Изменения активности НАДФ-МДГ из листьев картофеля в условиях солевого стресса.

Время	Вариант	Хл A, мг/см <sup>2</sup>	Хл A, % от контроля	Хл B, мг/см <sup>2</sup>	Хл B, % от контроля	Хл A+B, мг/см <sup>2</sup>	Хл A+B, % от контроля	НАДФ-МДГ, ФЕ/см <sup>2</sup>	НАДФ-МДГ, ФЕ/мгХл	НАДФ-МДГ, ФЕ/мгХл, % от контроля
1 неделя	Контроль	0,855		0,210		1,064		0,017	0,016	
1 неделя	50 mM NaCl	1,298	152,0	0,318	151,6	1,616	151,9	0,022	0,014	83,2
2 недели	Контроль	1,446		0,353		1,798		0,022	0,012	
2 недели	50 mM NaCl	1,755	121,4	0,457	129,5	2,211	123,0	0,040	0,018	149,8
2 недели	100 mM NaCl	1,458	100,9	0,345	98,0	1,803	100,3	0,014	0,008	64,3
3 недели	Контроль	1,504		0,388		1,892		0,020	0,011	
3 недели	50 mM NaCl	1,621	107,8	0,421	108,6	2,042	108,0	0,033	0,016	150,0
3 недели	100 mM NaCl	1,116	74,2	0,295	76,0	1,411	74,6	0,008	0,006	55,4
Восстановление (1 неделя)	Контроль	1,256		0,287		1,543		0,059	0,038	
Восстановление (1 неделя)	50 mM NaCl	1,410	112,2	0,359	124,8	1,768	114,6	0,024	0,014	36,2
Восстановление (1 неделя)	100 mM NaCl	1,273	101,3	0,321	111,8	1,594	103,3	0,024	0,015	40,2

**Рис. 4** Изменения концентрации малата в листьях картофеля в течение 3 недель воздействия NaCl и при восстановлении в течение 1 недели.

( $q_N$ ), так как касаются в большей степени природы и механизмов процесса гашения [5]. Фотохимическое гашение обозначается символом  $q_p$ .

Результаты проведённых исследований показывают чёткую картину изменений фотохимического и нефотохимического гашения.  $Q_p$  уменьшалось при засолении,  $q_N$  возрастило и квантовый выход фотосистемы II падал. Таким образом, потребность в квантах у растений в период солевого стресса возрастила. Большее количество квантов направлялось не на полезную работу, а на переходы состояния, больше гашения становилось связанным с фотоингибицией. (Рис.2). Все обнаруженные изменения были более существенны для растений, экспонируемых при 100 mM NaCl. Т.е. у них наблюдалось более быстрое реагирование на засоление, чем при 50 mM. После третьей недели  $q_p$  и квантовый выход ФС II были уже одинаковыми при разных концентрациях NaCl, т.е. ниже контроля. Понижение этих параметров дости-

гало для  $q_p$  75%, а  $\Phi_{II}$  ~60 % от контроля при интенсивности света 1600 мкЕ. К третьей неделе засоления  $q_N$  возрастало на 53% относительно контроля при 50 мМ и на 87% при 100 мМ. В то же время, при значительном возрастании нефотохимического гашения, фотохимическое уменьшалось не так сильно. Следовательно, даже при длительном стрессовом воздействии довольно высока доля квантов света, используемых в процессе фотосинтеза. После одной недели в нормальных условиях параметры растения при 100 мМ NaCl оставались неизменными, а картофель, перенесший 50 мМ NaCl, восстанавливался.  $Q_p$  и квантовый выход ФС II растения при 50 мМ были восстановлены практически до 100%, несмотря на то, что  $q_N$  осталось немного выше, чем в контрольных организмах (на 10-20%).

При засолении количество глюкозы, фруктозы и сахарозы в растениях увеличивалось до максимальных значений к третьей неделе стрессового воздействия и пик при 100 мМ NaCl был во всех случаях выше, чем при 50 мМ. (Рис.3) Концентрация глюкозы возрастала ~ в 3,7 раза при 50 мМ и ~ в 5,5 раз при 100 мМ. Содержание фруктозы увеличивалось ~ в 4,1

раз при 50 мМ и почти в 6 раз при 100 мМ. Содержание сахарозы возрастало ~ в 3,5 раза при 50 мМ и ~ в 6,5 раз при 100 мМ, что может являться реакцией на осмотический стресс. После одной недели «восстановления» концентрации глюкозы, фруктозы и сахарозы возвращались к нормальным значениям.

Содержание крахмала несколько падало ко второй неделе стрессового воздействия (~ на 18% при 50 мМ и на 15% при 100 мМ, по отношению к концентрации в контролльном растении, в эквивалентах глюкозы, мкМ/см<sup>2</sup>). Снижение количества крахмала коррелировало со снижением уровня ассимиляции. Понижение фиксации CO<sub>2</sub> в процессе фотосинтеза не позволяет растениям накапливать запасное вещество. Через 1 неделю действия нормальных условий содержание крахмала восстанавливалось приблизительно до контрольного уровня.

Активность НАДФ-МДГ растений при 50 мМ возрасстала по сравнению с контрольными растениями и имела пик через 2 недели стрессового воздействия. Но при 100 мМ активность уменьшалась на протяжении всего опыта и к концу эксперимента составила лишь около половины от значений в контрольных

**Таблица 2.** Динамика активности НАД-МДГ из листьев картофеля в условиях солевого стресса.

Время	Вариант	Белок, мг/см <sup>2</sup>	Белок, мг/см <sup>2</sup> , % от контроля	НАД- МДГ, ФЕ/см <sup>2</sup>	НАД- МДГ, ФЕ/см <sup>2</sup> , % от контроля	НАД- МДГ, ФЕ/мг белка	НАД-МДГ, ФЕ/мг белка, % от контроля
1 неделя	Контроль	0,737		2,142		2,906	
1 неделя	50 mM NaCl	0,784	106,4	2,326	108,6	2,966	102,1
1 неделя	100 mM NaCl	0,675	91,6	1,834	85,6	2,715	93,4
2 недели	Контроль	0,599		1,979		3,306	
2 недели	50 mM NaCl	0,626	104,6	2,142	108,2	3,422	103,5
2 недели	100 mM NaCl	0,636	106,2	2,427	122,6	3,818	115,5
3 недели	Контроль	0,757		1,641		2,168	
3 недели	50 mM NaCl	0,915	120,9	3,061	186,5	3,344	154,2
3 недели	100 mM NaCl	0,571	75,5	1,979	120,6	3,463	159,7
Восстановление (1 неделя)	Контроль	0,962		3,061		3,181	
Восстановление (1 неделя)	50 mM NaCl	0,581	60,4	1,979	64,7	3,405	107,0
Восстановление (1 неделя)	100 mM NaCl	0,628	65,3	2,326	76,0	3,702	116,4

растениях. После 1 недели при нормальных условиях эта величина оставалась в 2 раза меньше, чем в контроле. (Табл.1)

Активность НАД-МДГ возрастала к третьей неделе засоления как при 50, так и при 100 мМ NaCl и после стресса возвращалась почти к контрольным значениям. (Табл.2)

Концентрация малата вначале уменьшалась, но потом, между второй и третьей неделями воздействия засоления увеличивалась до значений, которые через 3 недели были выше, чем в контроле. После периода восстановления (1 неделя) они опять уменьшались. (Рис.4) Тенденции изменения в содержании малата совпадали с таковыми для глюкозы, фруктозы и сахарозы. Увеличение концентрации малата совпадало с пиком активности НАД-МДГ, ферmenta, в больших количествах содержащегося в растениях и играющего доминирующую роль в метаболизме малата в C<sub>3</sub>-растениях.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что длительное воздействие солевого стресса приводит к понижению ассимиляции, транспирации, «фотохимического гашения» флуоресценции хлорофилла а при значительном повышении «нефотохимического гашения». Кроме того, выявлены снижение содержания белка и повышение концентрации свободных гексоз и сахарозы при относительно ста-

бильном уровне хлорофилла а. Увеличение количества малата коррелировало с динамикой активности НАД-МДГ. Показано, что растения картофеля способны после 3-х недельного засоления (50 мМ NaCl) восстанавливать нормальное функционирование физиологических процессов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Bohnert H.J., Jensen R.G. // Australian Journal of Plant Physiology 1996. V 23. P. 662-666.
- Mizrahi Y. & Pasternak D. // Plant and Soil 1985. 89. P. 301-307.
- Орт Д., Меландри Б.А., Юнге В. и др. Фотосинтез: 2 т. / Под ред. Говинджи. Москва “Мир”. 1987. С. 338-345.
- Schreiber U., Schliwa U. & Bilger W. // Photosynth. Res. 1986. V. 10. P. 51-62.
- Walker D. // Oxygraphics limited, Sheffield. 1986.
- Van Kooten O. & Snel J.F.H. // Photosynthesis Research 1990. V. 25 P. 147-150.
- Scheibe R. & Stitt M. // Plant Physiol. Biochem. 1988. V. 26 P. 473-481.
- Bergmeier H.U. Methods of Enzymatic Analysis / Verlag Chemie, Weinheim. 1985.
- Batz O., Scheibe R. & Neuhaus H.E. // Plant Physiol. 1992. V. 100. P. 184-190.