

УДК 581.143.6:581.192.6

## РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ ВЕЙГЕЛЫ ЦВЕТУЩЕЙ «ВАРИЕГАТА» В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА

Землянухина О.А., Калаев В.Н., Воронина В.С.

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Воронежский государственный университет», Воронеж, e-mail: oz54@mail.ru*

Проведена длительная ступенчатая адаптация микроклонов вейгелы цветущей к солевому стрессу. С целью изучения влияния различных концентраций хлорида натрия на рост и развитие растения использовали 26, 43, 87, 130, 260, 345 мМ концентрации морской соли в селективных средах. Показано, что концентрации соли 26 и 87 мМ оказывали стимулирующее влияние на рост в первые две недели культивирования. Отрицательное действие соли проявляется при концентрации 130 мМ, являющейся полулетальной. После трехступенчатой адаптации с чередованием стресса и контроля в течение 120 суток растения нормально росли на летальной концентрации соли (260 мМ). 40 % растений сохранили способность расти на среде с концентрацией соли 345 мМ, которая в 2.7 раза превышает летальную. Динамика изменения содержания свободного пролина подтверждает создание нормально развивающихся солеустойчивых растений вейгелы в культуре *in vitro*.

Ключевые слова: микроклоны вейгелы, солевой стресс, стимуляция, полулетальная концентрация, длительная адаптация.

## WEIGELA FLORIDA «VARIEGATA» PLANT GROWTH AND DEVELOPMENT IN TISSUE CULTURE CONDITIONS UNDER SALT STRESS

Zemlianukhina O.A., Kalaev V.N., Voronina V.S.

*Federal State Budgetary Educational Institution of High Vocational Training "Voronezh State University", Voronezh, e-mail: oz54@mail.ru*

Three step adaptation of weigela microclones to salt stress have been conducted. With the aim to investigate the influence of different selective media 26, 43, 87, 130, 260, 345 mM salt concentrations on plantlet growth and development were used. During the first two weeks of propagation it has been shown that 26 and 87 mM had a growth stimulating effect. Significant negative salt action reveals at semi-lethal concentration of NaCl 130 mM. After 120 days of the three-step adaptation resistant plantlets grew normally at lethal salt concentration of 260 mM. Even at the concentration of 345 mM which is 2.7 times as high as the lethal one about 40 % of sterile plants still survived. The dynamics of changes in the free proline content confirms the fact that weigela plants in tissue culture acquire the quality of salt resistance.

Keywords: weigela microclones, salt stress, stimulation, semi-lethal concentration, long-term adaptation.

Засоление почв является одной из важнейших проблем как в сельском хозяйстве, так и в области декоративного садоводства. Реакцией растений на солевой стресс, так же как и на стрессы иной природы, является подавление ростовых функций, уменьшение длины корней, что связано, по мнению ряда авторов, со снижением интенсивности фотосинтеза [2, 22]. На засоление почв влияют как природные, так и антропогенные факторы. К последним относятся применение удобрений, кислотные осадки, техногенное воздушное загрязнение и др. В результате засоления почв наблюдается значительное снижение урожайности сельхозкультур и их качества. Различные виды растений отличаются разной чувствительностью к засолению. Например, галофиты успешно растут на соленых почвах (содержание соли более 0,5 %: полыни, бессмертники, солянки и многие другие), а растения сои при этом полностью погибают [13]. Проблема солеустойчивости растений является

актуальной, поскольку связана с нарушениями в окружающей среде, климате и сохранением биоразнообразия. Получение растений, устойчивых к засолению почвы, и, более того, успешно развивающихся в стрессовых условиях, является предметом исследований последних лет [1,3,15].

Засоление приводит к уменьшению потребления растениями воды, действуя не только токсически, но и осмотически [5,12]. В общем, высокие количества солей в почве приводят к раннему старению организма, быстрому увяданию и деградации корней [9].

Альтернативным способом получения форм растений, способных успешно расти в неблагоприятных условиях среды при воздействии одного или нескольких стрессовых факторов, являются биотехнологические методы размножения микроклонов на селективных средах. Поэтому целью исследования было получение микроклонов кустарника вейгелы цветущей «вариегата» (*Weigela florida* «*Variegata*» Bunge A.D.C.), адаптированных к условиям солевого стресса, вызванному добавлением в питательные среды натуральной пищевой морской соли, основным компонентом которой служит NaCl (98,9 %).

#### **Материалы и методы исследования**

Исходными растениями для отбора первичных эксплантов служили кусты вейгелы, растущие на территории ботанического сада им. Б.М. Козо-Полянского Воронежского государственного университета. Стерилизацию стеблевых эксплантов и микроклональное размножение вейгелы осуществляли по описанной нами методике [4]. Укорененные микрорастения помещали на безгормональную питательную среду Woody Plant Medium с половинным набором макросолей и сахарозы [18].

Экспериментальная часть подразделялась на два этапа. На первом происходил выбор полулетальной и летальной концентраций с использованием питательных сред, дополненных разными количествами соли. Схема первого этапа включала выдерживание укорененных растений на протяжении 30 суток на селективных средах в присутствии следующих концентраций морской соли (в пересчете на NaCl): 26, 43, 87, 130, 260, 345 mM. Пассирование на свежие питательные среды осуществлялось раз в две недели.

На втором этапе проводили ступенчатую адаптацию микроклонов вейгелы к условиям засоления. Растения помещали на питательную среду, содержащую полулетальную концентрацию хлорида натрия на 10 суток, после чего растения переносили на восстановление на 30 суток на контрольную среду. Совокупность периодов роста на солевой и контрольной средах (10 суток на соли + 30 суток восстановления) названы пассажем. Опыт проводили трижды на одних и тех же растениях, т.е. всего проводили 3 пассажа, а продолжительность эксперимента, таким образом, составила 120 суток.

Определение пролина проводили по [10].

Измерение высоты и, соответственно, прироста растений проводили в восьми биологических повторностях. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ «Stadia». Процедура группировки данных и их обработка изложены в работе Кулаичева [7]. Сравнение значений признаков осуществляли с использованием непараметрического Х-критерия Ван-дер-Вардена, т.к. распределение изучаемых признаков неизвестно или не подчиняется нормальному. Влияние фактора «концентрация соли в среде» и фактора «день (сутки наблюдения)» на изучаемый показатель вычисляли с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (модель с фиксированными эффектами). Силу влияния определяли по Снедекору (%).

### Результаты исследования и их обсуждение

Процесс получения устойчивых к засолению микроклонов вейгелы включал несколько этапов. На первом этапе исследовалось влияние различных концентраций соли в питательной среде (селективная среда) на рост растений в условиях *in vitro*. Было выяснено, что на селективной среде с добавлением 130 mM NaCl в течение 14 суток погибало чуть более 50 % растений. Эта концентрация была названа «полуметальной» и использована в дальнейших экспериментах при ступенчатой адаптации растений к засолению. При концентрации соли 260 mM погибали 100 % растений за этот же промежуток времени («летальная концентрация»). На остальных исследуемых концентрациях морской соли – 26, 43 и 87 mM – растения развивались по-разному. Результаты представлены в таблице.

Зависимость прироста микроклонов вейгелы от концентрации соли в питательной среде

Концентрация соли, mM	контроль	26 mM	43 mM	87 mM
	Δ, мм	Δ, мм	Δ, мм	Δ, мм
Сутки				
14 суток	9,50±3,07	18,75±4,44*с	13,80±5,21аб	28,5±2,5*ad
20 суток	16,80±9,60	15,00±2,04	9,50±3,57	15,00±0
30 суток	11,30±2,84	9,00±2,94	6,00±0,58	11,8±2,93
Общий прирост	35,00±6,73	42,80±5,54	29,30±8,52	53,00±3,58

\* – различия с контролем достоверны (P<0,05);

а – различия с концентрацией соли 26 mM достоверны (P<0,05);

б – различия с концентрацией соли 87 mM достоверны (P<0,05);

с – различия с 30 сутками достоверно (P<0,05);

d – различия с 30 сутками достоверно (P<0,01).

Двухфакторный дисперсионный анализ показал влияние фактора дня (суток наблюдения) (сила влияния 4,3 % (P<0,001)) и концентрации соли (сила влияния 19,8 % (P<0,05)) на прирост стебля в эксперименте. Так, на 14 сутки эксперимента отмечается

положительный эффект, на 20 и 30 сутки эффекты присутствия морской соли в культуральной среде не выявляются. Концентрация соли также не имеет однозначного стимулирующего воздействия на прирост растений в высоту. Достоверные различия с контролем выявляются только при концентрациях соли 26 и 87 мМ, при концентрации соли 43 мМ стимулирующего эффекта морской соли на изучаемый показатель не обнаруживается. Таким образом, существует две области стимуляции роста стебля: в области концентраций 26 и 87 мМ, в области концентрации 43 мМ стимулирующие эффекты отсутствуют.

Практически все исследования отмечают отрицательное влияние соли на рост и развитие растительных организмов. На наш взгляд, это может объясняться, например, тем, что авторами испытывались в основном высокие (полу- и летальные) концентрации стрессовых агентов, хотя для разных групп растений они, естественно, разные. Однако наши эксперименты по получению адаптированных к засолению растений выявили побочный эффект положительного влияния низких концентраций NaCl в первые две недели роста растений вейгелы на селективных средах. Из результатов таблицы также видно, что стадия активного роста наблюдается до 14-х суток инкубации, после чего процессы роста замедляются, несмотря на регулярное пассирование на свежие питательные среды. При этом солеспецифичный эффект не оказывал отрицательного действия на корни вплоть до концентрации 130 мМ.

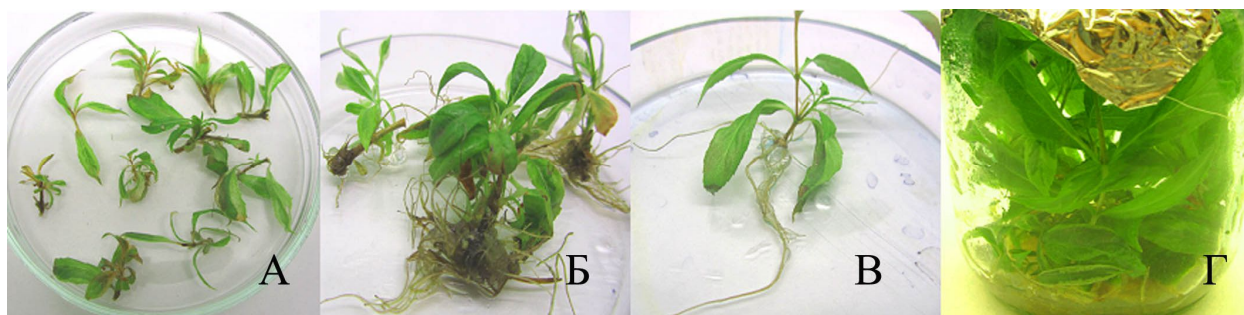
Изучение влияния низких концентраций соли (26 и 87 мМ) показали их стимулирующее на рост действие на 14 сутки наблюдения (различия с контролем достоверны ( $P < 0,05$ )). Концентрация 43 мМ такого влияния не оказывала. Полученные данные согласуются с мнением Нариманова и Корыстова [8], показавших наличие двух пиков стимулирующих эффектов при воздействии агентами различной этиологии (в области малых и больших доз радиации) и универсальность этого явления (возможность его выявления не только при облучении объектов ионизирующей радиацией, а при воздействии химических соединений).

При культивировании растений вейгелы на среде с концентрацией стрессового агента 26 и 87 мМ на 14 сутки происходит увеличение прироста по сравнению с контролем и 30 сутками культивирования, на 20 и 30 сутки скорость прироста не отличается от контроля, т.е. эффект выявляется только в начале эксперимента. Аналогичные эффекты были показаны Кузиным [6] при воздействии ионизирующих излучений в стимулирующих дозах на растительные объекты. В контроле и при культивировании на среде с концентрацией морской соли 47 мМ скорость прироста оставалась одинаковой в течение всего эксперимента.

По нашему мнению, при действии малых концентраций соли (26 и 87 мМ) на

протяжении месяца происходит накопление ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  в вакуолях, что и создает стимулирующий эффект на рост растений в высоту. Это влияние, однако, имеет преходящий характер, т.к. к концу эксперимента (30 суток) рост опытных и контрольных растений достоверно не отличается. Однако некоторые авторы отмечали стимулирующее действие хлорида натрия для синтеза пролина, обусловленного активацией синтеза глутамата [24].

Рядом авторов было показано, что в первые минуты и часы солевого стресса на растения оказывают влияние не ионы  $\text{Na}^+$  или  $\text{Cl}^-$ , а дефицит воды как для корней, так и для листьев [20]. По их мнению, это связано с тем, что концентрация соли не достигает токсического уровня, т.к. проникновение ионов достигает лишь 20 % от их общей концентрации в окружающей среде. Со временем ионы могут изолироваться в вакуолях листьев, растягивая их, тем самым отдаляя или полностью предотвращая гибель молодых растений. При этом концентрация ионов может превышать таковую в окружающей среде в 2–3 раза [16]. В наших экспериментах повреждающее влияние соли визуально не наблюдалось в первые часы и дни действия. Эффект засоления проявлялся после первой недели инкубации, когда соль накапливалась в более зрелых листьях, что приводило к их пожелтению и отмиранию. Одновременно наблюдалось отмирание (почернение) корней (полу- и летальная концентрация соли). Растения, растущие на полuletальной концентрации  $\text{NaCl}$  (130 мМ), при перемещении их на контрольные питательные среды в течение месяца восстанавливали нормальные корни (рисунок). При этом ризогенез наблюдался выше отмершей корневой системы.



*Рост и развитие растений вейгелы при солевом стрессе*

А – растения без корней в течение 10 суток на летальной концентрации  $\text{NaCl}$  (260 мМ) (1 пассаж); Б – растения с корнями перенесены после 3-х пассажей на летальную концентрацию на 2 недели; В – рост на летальной концентрации в течение 30 суток; Г – стимуляция роста на концентрации соли 87 мМ

Влияние высоких концентраций хлорида натрия активно изучается во всем мире. Например, Munns было показано [19], что первичному накоплению соли препятствует дополнительный синтез органических соединений, в частности, пролина и глицин бетаина, которые создают осмотический баланс между цитоплазмой и вакуолями. Другие авторы

подсчитали, что на накопление ионов расходуются энергетические ресурсы клетки: так, на использование одной молекулы NaCl тратятся 4 молекулы АТФ в листьях и 7 – в корнях, а на синтез или аккумуляцию одной молекулы пролина – 41 молекула АТФ [21]. Рядом авторов [23] было обнаружено, что процесс экспрессии генов, связанных с солевым шоком, зависит от времени действия фактора. Так, при влиянии 150 mM NaCl на корни риса через 15 минут действия фактора (ранняя фаза) была выражена экспрессия генов, индуцируемых эндогенным гормоном абсцизовой кислотой и относящихся к протеинкиназе. Через неделю солевого воздействия были экспрессированы другие гены [17]. В литературе имеются сведения, что ионы  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  начинают ингибировать ферменты при концентрации выше 100 mM каждый, а ионы  $\text{K}^+$  – при 100-200 mM [13]. Ферменты галофитов, т.е. растений, хорошо адаптирующихся к засолению, одинаково устойчивы к высоким концентрациям NaCl, как и гликофиты. Так, авторами, давно работающими в этом направлении, было показано, что в условиях *in vitro* активности ферментов, выделенных из галофитов *Atriplex spongiosa* или *Suaeda maritime*, растущих при 10-кратной концентрации соли, были одинаково чувствительны с ферментами фасоли и гороха [11,14].

По механизму устойчивости к соли растения делятся на два типа: 1) снижающие всасывание ионов в растения и 2) накапливающие их в вакуолях. Галофиты имеют оба типа устойчивости, что позволяет расти им на засоленных почвах. Некоторые гликофиты также имеют механизм сниженного всасывания солей корнями, но неспособны накапливать их в вакуолях, поэтому ионы могут накапливаться в транспирирующих листьях до токсического уровня [19]. Растения вейгелы цветущей относятся к гликофитам, поэтому для получения солеустойчивых растений необходимо было проведение ступенчатой (постепенной) адаптации к соли. В результате нами получены микрорастения кустарника, активно растущие в культуре *in vitro* на летальных концентрациях морской соли (260 mM).

Конститутивный уровень пролина (аминокислоты, выполняющей защитные функции) растений вейгелы на контрольных средах показал величину 11–12 мг % / г. Через 10 суток инкубации на полублетальной концентрации соли уровень свободного пролина поднялся до  $26,2 \pm 4,9$  мг % / г (различия с контролем достоверны ( $P < 0,05$ )), а концу первого пассажа уровень пролина падал до значений ниже контрольных и составил  $6,2 \pm 1,6$  мг % / г (различия с контролем достоверны ( $P < 0,05$ )). Эти значения у опытных растений сохраняются и к концу 120 суток наблюдения (3 пассаж):  $6,2 \pm 2,6$  мг % / г, что приближает их по показателю к растениям, растущим *in vivo* ( $1,3 \pm 0,9$  мг % / г). В своих исследованиях мы не обнаружили какого-нибудь значительного содержания пролина в корнях растений вейгелы, вся аминокислота содержалась в стеблях, что согласуется с результатами других исследователей [25].

## Заключение

Таким образом, в результате проведенной работы показано, что низкие концентрации соли (26 и 87 mM) оказывают ростстимулирующее влияние в первые две недели культивирования на селективных средах, а отрицательное действие соли на растения проявляется при концентрации выше 100 mM (130 mM). При этом наблюдается некроз корней, которые, однако, восстанавливаются в течение месяца в контрольных условиях. На следующих ступенях стресса (2 и 3 пассажи) растения хорошо растут, не отличаясь по скорости прироста от контрольных экземпляров. После трехступенчатой адаптации к условиям засоления на полублетальных концентрациях NaCl растения, перенесенные на летальные концентрации стрессового агента (260 mM), хорошо росли и развивались. Более того, около 40 % растений сохраняли жизнеспособность при концентрации соли, в 2,7 раза превышающей летальную (345 mM). Результаты эксперимента подтверждаются их сопоставлением с динамикой изменения содержания протекторной аминокислоты пролина, что позволяет утверждать о создании хорошо адаптированных к условиям засоления растений вейгелы цветущей в условиях *in vitro*.

## Список литературы

1. Гаджиева И.Х., Алиева З.М., Рамазанова П.Б. Кросс-адаптация растений к почвенному засолению и тяжелым металлам // Юг России. Экология, развитие. – 2010. – № 1. – С.26-32.
2. Гарифзинов А.Р., Жуков Н.И., Иванищев В.В., Кособрюхов А.А. Фотосинтетические процессы у тритикале озимого в условиях натрий-хлоридного засоления // Доклады РАСХН. – 2015. – № 3. – С.3-6.
3. Гладков Е.А. Получение растений полевицы побегоносной с комплексной устойчивостью к тяжелым металлам и засолению методами клеточной селекции // Сельскохозяйственная биология. – 2009. – № 6. – С. 85-88.
4. Землянухина О.А., Калаев В.Н., Воронина В.С. Микрклональное размножение вейгелы приятной и вейгелы пестролистной «*Kosteriana variegata*» // Вестник ВГУ. Серия: Химия, биология, фармация. – 2016. – № 1. – С.72-75.
5. Кузнецов Вл.В., Шевякова Н.И. Проллин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. – 1999. – Т.48. – № 2. – С.321-336.
6. Кузин А.М. Стимулирующее действие ионизирующего излучения на биологические процессы. – М.: Атомиздат, 1977. – 136 с.

7. Кулаичев А.П. Методы и средства комплексного анализа данных: учеб. пособие. – 4-е изд. – М.: ФОРУМ - ИНФРА-М, 2006. – 512 с.
8. Нариманов А.А., Корыстов Ю.Н. Стимуляция развития растений малыми дозами ионизирующего излучения // Изв. РАН. Сер. биол. – 1996. – № 5. – С. 618-620.
9. Терлецкая Н.В. Неспецифические реакции зерновых злаков на абиотические стрессы *in vivo* и *in vitro*. – Алматы, 2012. – 208 с.
10. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // Plant Soil. 1973. Vol.39. P.205-207.
11. Flowers T.J., Troke P.F., Yeo A.R. The mechanism of salt tolerance in halophytes // Annual Review of Plant Physiology. 1977. Vol.28. P.89-121.
12. Flowers T.J., Yeo A.R. Ion relations of plant under drought and salinity // Aust. J. Plant Phys. 1986. Vol.13, no. 1. P.75-91.
13. Greenway H., Munns R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes // Annual Review of Plant Physiology. 1980. Vol. 31. P.149-190.
14. Greenway H., Osmond C.B. Salt responses of enzymes from species differing in salt tolerance // Plant Physiology. 1972. Vol. 49. P.256-259.
15. Gupta N., Gaurav Sh. S., Kumar A. Molecular basis of aluminium toxicity in plants: A Review // American Journal of Plant Sciences. 2013, no. 4. P. 21-37.
16. Jeschke W.D., Aslam Z., Greenway H. Effects of NaCl on ion relations and carbohydrate status of roots and on osmotic regulation of roots and shoots of *Atriplex amnicola* // Plant, Cell and Environment. 1986. Vol.9. P.559-569.
17. Kawasaki S., Borchert C., Deyholos M., Wang H., Brazille S., Kawai K., Galbraith D., Bohnert H.J. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice // Plant Cell. 2001. Vol.13. P.889-905.
18. Lloyd G., McCown B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture // Proc. Inter. Plant Prop. 1980. Vol. 30. P. 421-427.
19. Munns R. Comparative physiology of salt and water stress // Plant, Cell and Environment. 2002, no.25. P.239-250.
20. Passioura J.B. & Munns R. Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate // Aust. J. Plant Phys. 2000. Vol.27. P.941-948.
21. Raven J.A. Regulation of pH and generation of osmolarity in vascular plants: a cost-benefit analysis in relation to efficiency of use of energy, nitrogen and water // New Phytologist. 1985. Vol.101. P.25-77.
22. Robinson S.P., Downton W.J.S., Millhouse J.A. Photosynthesis and ion content of leaves and isolated chloroplasts of salt-stressed spinach // Plant Physiol. 1983. Vol.73. P.238-242.



23. Shen W., Gómez-Cadenas A., Routly E.L., Ho T.-H.D., Simmonds J.A., Gulick P.J. The salt stress-inducible protein kinase gene, Esi47, from the salt-tolerant wheatgrass *Lophopyrum elongatum* is involved in plant hormone signaling // Plant Physiology. 2001. Vol.125. P.1429-1441.
24. Skopelitis D.S., Paranychianakis N.V., Paschalidis K.A. et al. Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine // Plant Cell. 2006. Vol. 18, no. 10. P. 2767-2781.
25. Wyn Jones R.G., Storey R. Salt stress and comparative physiology in the Gramineae. IV. Comparison of salt stress in *Spartina x townsendii* and three barley cultivars // Aust. J. Plant Phys. 1978. Vol. 5. P.839-850.