

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. М.В. ЛОМОНОСОВА**

Биологический факультет

На правах рукописи

ДЖАЛАЛИХОНАРМАНД САИД

**«ИОНООБМЕННАЯ СПОСОБНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ
СТЕНОК ИЗ РАЗНЫХ ОРГАНОВ РАСТЕНИЙ
В УСЛОВИЯХ ЗАСОЛЕНИЯ
(НА ПРИМЕРЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМ. FАVАСЕАЕ)»**

Специальность

03.00.12 – физиология и биохимия растений

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2007

Диссертационная работа выполнена на кафедре физиологии растений
Московского Государственного Университета им. М. В. Ломоносова

Научные руководители: доктор биологических наук,
профессор
И. П. Ермаков

кандидат химических наук,
старший научный сотрудник
Н. Р. Мейчик

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор
Е. П. Феофилова

кандидат биологических наук,
доцент
К. Н. Тимофеев

Ведущая организация: Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева
РАН.

Защита состоится «16» февраля 2007 г. в 15.30 часов на заседании
диссертационного совета Д 501.001.46 в Московском Государственном
Университете им. М. В. Ломоносова по адресу: 119992, г. Москва, ГСП-2,
Ленинские Горы, МГУ, Биологический факультет.
Факс – (495) 939-43-09

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического
факультета МГУ им. М. В. Ломоносова.

Автореферат разослан «16» января 2007 года

Ученый секретарь
диссертационного совета, к. б. н.

М. А. Гусаковская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Экологические факторы оказывают значительное влияние на рост и развитие растений. Одним из распространенных по площади и неблагоприятному воздействию на продуктивность растений абиотических стрессоров является засоление почв. Засоленные почвы широко распространены во многих странах мира, занимая около 20% посевных площадей и почти половину орошаемых территорий (Munns, 2002). Выяснение механизмов адаптации растительных организмов, позволяющих им выживать в условиях засоления среды, является важным направлением физиологии устойчивости растений.

Избыточное содержание ионов натрия и хлорида в почве оказывает гипертоническое и токсическое действие на растение, и поддержание роста в этих условиях связано как с регуляцией водного и осмотического гомеостаза, так и с изменением свойств клеточных стенок растений (Cosgrove and Li, 1993).

На фоне значительного прогресса в изучении состава и свойств составляющих клеточную стенку полисахаридов, структурных белков и ферментов число работ, в которых исследованы процессы, происходящие в этом компартменте при действии стрессоров, в частности, засоления, ограничено. Представление о том, что клеточная стенка может являться источником сигналов для запуска ответных, защитных реакций растительного организма, широко обсуждается в литературе (Горшкова, 1997). Однако мало известно, какой вклад вносят клеточные стенки в формировании механизмов солеустойчивости растения.

В настоящее время клеточная стенка рассматривается как сложноорганизованный, динамичный компартмент, выполняющий ряд важных функций (Шарова, 2004, Carpita and Gibeaut, 1993). За счет физико-химических свойств этой структуры и способности осуществлять реакции обмена между ионообменными группами полимерного матрикса стенок и ионами среды модифицируется внешний раствор и создается «внутренняя физиологическая среда» организма.

Исследованию особенностей функционирования клеточных стенок растений как природных ионообменников в условиях засоления посвящены немногочисленные публикации (Bigot and Binet, 1986; Meychik et al., 2005; Мейчик и др.,

2006). Практически отсутствуют работы, в которых ионообменная способность клеточных стенок была бы оценена количественно. Также не изучалась специфика ионообменных свойств клеточных стенок у разных сортов культурных растений.

Бобовые растения во многих странах, в том числе в Исламской республике Иран, являются ценными сельскохозяйственными культурами, важными продуцентами белка (Singla and Garg, 2005). В этой связи крайне важно изучить видовые и сортовые особенности бобовых культур с целью их использования на засоленных почвах. Сравнительные исследования свойств клеточных стенок растений разных видов и сортов, отличающихся по устойчивости к действию солевого стресса, необходимы для выяснения роли этого компартмента клетки в механизмах солеустойчивости.

Цель данной диссертационной работы: провести сравнительное исследование ионообменной способности полимерного матрикса клеточных стенок растений из семейства Fabaceae при действии засоления и установить роль клеточной стенки в солеустойчивости растений.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Используя параметры роста, сравнить степень устойчивости к засолению разных видов и сортов растений из семейства бобовых.
2. Определить качественный и количественный состав функциональных групп полимерного матрикса клеточных стенок бобовых растений, различающихся по устойчивости, и выявить изменения в ответ на действие засоления.
3. Провести сравнительное исследование физико-химических свойств полимерного матрикса клеточных стенок разных сортов и видов бобовых растений:
 - определить константы диссоциации функциональных групп, расположенных в полимерной структуре клеточных стенок;
 - оценить коэффициенты набухания полимерного матрикса клеточных стенок при разных значениях pH и ионной силы внешнего раствора;

- определить интервал pH, в котором функциональные группы клеточных стенок ионизированы и способны принимать участие в реакциях ионного обмена.

4. Установить роль ионообменного механизма связывания ионов полимерным матриксом клеточных стенок в адаптации бобовых растений к засолению.

Научная новизна работы. Впервые исследован состав полимерного матрикса клеточных стенок растений из семейства Fabaceae – нута *C. arietinum* (сорт Bivanij и ILC482) и вики *V. narbonensis* (сорт Sel2384), и проведен сравнительный анализ содержания катионообменных групп (карбоксильных групп полигалактуроновой и оксикоричных кислот, фенольных групп) и анионообменных групп (аминогрупп). Впервые определены физико-химические параметры, количественно характеризующие ионообменные свойства (константы диссоциации функциональных групп, общее содержание катионообменных и анионообменных групп, количество групп каждого типа) и способность к набуханию полимерного матрикса клеточных стенок растений, различающихся по солеустойчивости. Определены интервалы pH, в которых функциональные группы матрикса ионизированы и способны вступать в обменные реакции с катионами и анионами внешней среды. Впервые показано, что объем клеточных стенок *C. arietinum* и *V. narbonensis* не является постоянной величиной и зависит от ионных условий и pH внешнего раствора и апопласта. Установлено, что растения из семейства Fabaceae, отличающиеся по устойчивости к действию засоления, проявляют сортовую и видовую специфичность структуры полимеров экстраклеточного матрикса.

Практическая значимость работы. Полученные в работе данные расширяют фундаментальные знания о роли клеточных стенок в устойчивости растений к неблагоприятным факторам окружающей среды. Результаты могут быть использованы в курсах лекций по минеральному питанию и стресс-устойчивости растений. Показано, что одной из ответных реакций бобовых растений на засоление являются изменения физико-химических свойств клеточных стенок. Полученные в работе физико-химические параметры (константы диссоциации функциональных групп, общее содержание катионообменных и анионообменных групп, количество

групп каждого типа, коэффициент набухания полимерного матрикса) позволяют предсказывать изменения ионного состава в водном пространстве клеточных стенок на начальном этапе поглощения элементов минерального питания.

Апробация работы. Результаты исследования были представлены на IV-ой Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, 2005), 13th Multi-disciplinary Iranian Researchers Conference in Europe (Leeds, 2005), XV International Plant Nutrition Colloquium «Plant nutrition for food security, human health and environmental protection» (Beijing, 2005), International scientific conference «Genetic and Physiological Fundamentals of Plant Growth and Productivity» (Vilnius, 2006).

Публикации. Всего по материалам диссертации опубликовано 9 работ. Экспериментальные данные, представленные в диссертации, получены лично соискателем и опубликованы в соавторстве с руководителями и сотрудниками, работавшими совместно с автором.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 147 стр. машинописного текста и состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 123 наименования (из них 105 на иностранных языках). Работа содержит 16 таблиц и иллюстрирована 30 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследования служили 18-21-дневные растения нута *Cicer arietinum* L. (сорт Bivaniј, ILC482, Nachem), вики *Vicia narbonesis* L. (сорт Sel2384) и чины *Lathyrus sativus* L. (сорт Sel635) из семейства Fabaceae. Семена вики и чины проращивали во влажном вермикулите в течение 5 дней, а семена нута - на влажной фильтровальной бумаге в термостате при 27°C в темноте в течение 3 дней. Через 3-5 дней проростки пересаживали в 3 л сосуды (20 растений на сосуд) на питательный раствор Прянишникова следующего состава (г/л): NH₄NO₃ - 0,24, MgSO₄ - 0,06, KCl - 0,15, CaSO₄*2H₂O - 0,344, CaHPO₄*2H₂O - 0,172, FeCl₃ - 0,025. Растения росли в камерах при дневной и ночной температуре воздуха 23°C, при освещении лампами дневного света с интенсивностью света 46 мкмоль фото-

нов/м²*с на уровне листьев верхнего яруса, аэрации растворов в течение дня. Растворы в сосудах заменяли каждую неделю. 3-5-дневные растения подвергали засолению, внося в питательный раствор хлористый натрий. Концентрация хлористого натрия в питательной среде составляла 0,5, 40 и 80 мМ.

Листья у растений нута, вики и чины разделяли на нижний (первые 3-4 листа) и верхний (остальные листья) ярусы. В опытах использовали интактные и высушенные ткани растений, а также клеточные стенки, выделенные из корней, стеблей и листьев разных ярусов нута, чины и вики, выращенных на разном фоне засоления.

Выделение клеточных стенок из разных тканей растений проводили в соответствии с методикой (Meuchik et al., 1999; Meuchik and Yermakov, 2001). Интактный растительный материал помещали в стеклянную ионообменную колонку (V=250 мл), промывали в динамических условиях последовательно 1%-ными растворами щелочи, кислоты и дистиллированной водой до отсутствия хлорид-ионов в промывных водах, а затем высушивали в присутствии поглотителя (CaCl₂) при 55-60° до постоянного веса.

Для оценки качества выделения клеточных стенок проводили микроскопический анализ препаратов, окрашенных флуоресцентным красителем DAPI.

Для определения качественного и количественного состава ионообменных групп полимерного матрикса клеточных стенок использовали потенциометрическое титрование, которое осуществляли методом отдельных навесок (Мейчик и др., 1999). Расчет кривых титрования проводили, как описано в работах (Meuchik and Yermakov 1999; 2001). Количество функциональных групп каждого типа, а также значения рН, отвечающие началу и концу их ионизации определяли, анализируя экспериментальные кривые зависимости сорбционной способности клеточных стенок от рН. Содержание свободных аминокрупп определяли методом неводного титрования в уксусной кислоте (Черонис и Ма, 1973).

Определение содержания воды в тканях растений и весового коэффициента набухания клеточных стенок в воде проводили в соответствии с методикой (Meuchik and Yermakov, 2001). Весовой коэффициент набухания стандартизо-

ванных клеточных стенок (K^{cw}) и содержание воды в органах растений (Q) определяли по соответствующим формулам (Гельферих, 1962).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ SPSS, версия 13.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка солеустойчивости растений из семейства Fabaceae

Одним из тестов для оценки степени солеустойчивости растений является прорастание семян. Важность этого критерия при выборе наиболее толерантного сорта нута возрастает в связи с тем, что стадия прорастания его семян характеризуется наибольшей чувствительностью к засолению. Результаты свидетельствуют, что в отсутствие влияния NaCl сорта нута ILC482 и Bivaniј отличаются от Hachem сравнительно высоким процентом прорастания (95, 98% для ILC482 и Bivaniј и 71% для Hachem). При увеличении концентрации NaCl в среде от 0,5 (контроль)

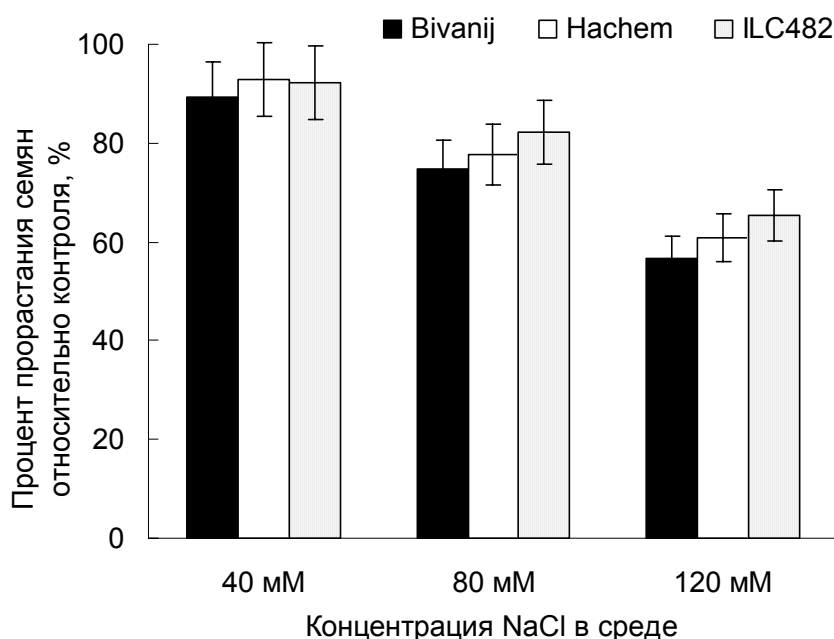


Рисунок. 1. Влияние засоления на прорастание семян разных сортов нута. В легенде - названия сортов нута

до 120 мМ происходит снижение прорастания семян всех сортов нута (рис.1). Такие данные не противоречат результатам Солтани с соавторами, которые показали, что прорастание семян разных сортов нута (Jam и Кака) *C. arietinum* при разном уровне засоления внешнего раствора имеет существенные отличия: более устойчивые сорта характеризуется более высоким процентом прорастания и более

высокой скоростью прорастания (Soltani et al., 2002). Результаты настоящей работы свидетельствуют, что при всех уровнях засоления внешнего раствора семена растений сорта ILC482, в отличие от Bivanij и Nachem, характеризуются самым высоким процентом прорастания. Следовательно, сорт ILC482 является относительно устойчивым, а Bivanij - чувствительным к высоким концентрациям NaCl в среде. Эти данные согласуются с результатами экспериментов, в которых показано, что присутствие в среде NaCl приводит к замедлению прорастания семян бобовых растений: гороха, фасоли и сои (Essa, 2002; Saxena et al., 1994). Полагают, что это связано в большей степени с влиянием осмотической компоненты солевого стресса, нежели токсическим эффектом.

Другим критерием для оценки степени устойчивости растений к засолению является накопление биомассы. Результаты свидетельствуют, что, независимо от сорта нута, в ответ на увеличение концентрации NaCl во внешнем растворе происходит ингибирование роста растений, выражающееся в снижении накопления сухой массы тканей. Полагают, что подавление роста в условиях засоления связано как с уменьшением доступности и поглощения воды растениями, так и с токсическим действием хлористого натрия (Munns, 2003; Taiz and Zeiger, 1998; Tester and Davenport, 2003). Данные нашей работы показывают, что растения сорта ILC482, по сравнению с сортами Bivanij и Nachem, характеризуются наименьшим снижением в накоплении сухой массы и корней, и надземных органов (рис.2а).

Известно, что все органы растений подвержены неблагоприятному влиянию засоления, однако ответ на повреждающее действие стрессора каждого из них будет разным (Raptan et al., 2001). Так, например, показано, что в условиях засоления у растений люцерны накопление листовой биомассы снижается в меньшей степени по сравнению с массой стебля, а урожайность зерна тритикале ингибируется в большей степени, чем масса побега (Karim et al., 1992). Однако причины такого разного ответа на воздействие солевого стресса различных органов одного растения полностью не выяснены (Raptan et al., 2001).

Рост корней всех сортов нута в большей степени подвержен влиянию засоления по сравнению с ростом надземных органов (рис. 2б). Также определено,

что с увеличением концентрации NaCl в питательном растворе происходит сни-

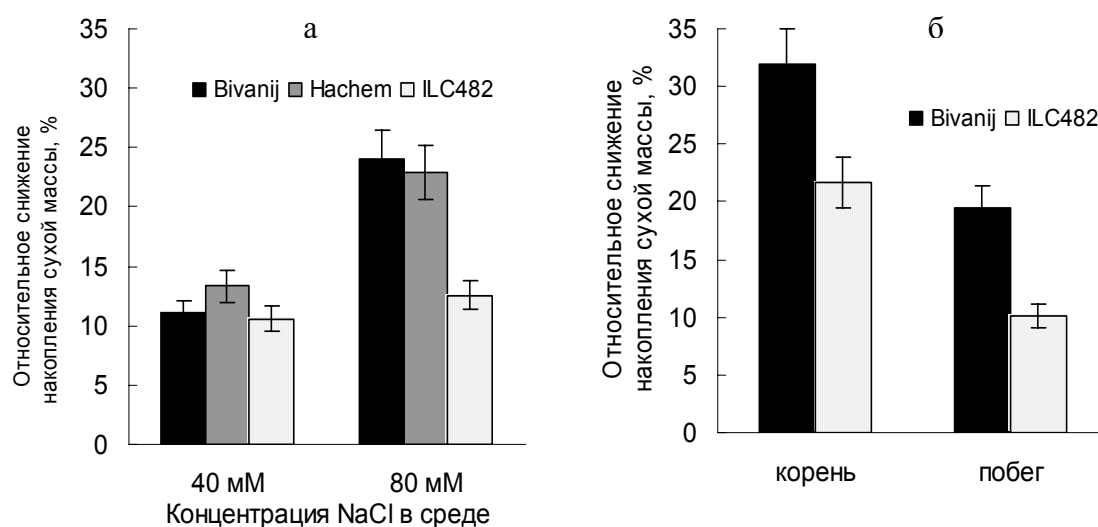


Рисунок 2. а – изменения в накоплении сухой массы растений разных сортов нута в зависимости от концентрации NaCl в среде; б – относительное снижение в накоплении сухой массы корней и надземных органов растений нута сорта Bivaniј и ILC482, выращенных в присутствии 80 mM NaCl

жение соотношения массы корней и побега. Предполагают, что уменьшение биомассы растений при засолении связано с ингибированием гидролиза запасных питательных веществ и их транслокации в растущие ткани надземных органов (Singla and Garg, 2005). Известно также, что для роста растений в условиях солевого стресса необходимы дополнительные энергетические ресурсы. При этом происходит изменение направленности метаболизма углерода, выражающееся в уменьшении его доступности для процессов роста (Cheeseman, 1988). Согласно результатам теста по накоплению сухой биомассы солеустойчивость сортов нута изменяется в ряду: ILC482 > Hachem > Bivaniј. Следовательно, на основании двух критериев оценки степени устойчивости растений можно заключить, что сорт ILC482 является относительно устойчивым, а Bivaniј - чувствительным к высоким концентрациям NaCl в среде.

Для сравнения устойчивости к засолению растений из семейства Fabaceae проведены эксперименты по оценке накопления общей биомассы растениями нута *C.arietinum*, вики *V.narbonesis* и чины *L.sativus*. Результаты свидетельствуют, что в условиях засоления среды у растений нута, в отличие от вики и чины, происходит наибольшее снижение накопления сухой массы. Этот параметр у *V.*

narbonesis и *L. sativus* имеет близкие величины. В связи с тем, что продуктивность вики выше по сравнению с растениями чины, в работе использовали растения вики. Таким образом, для сравнительного изучения ионообменных свойств клеточных стенок растений из семейства Fabaceae были выбраны растения нута *C. arietinum* двух сортов (Bivanij и ILC 482), отличающихся по солеустойчивости, и вики *V. narbonesis*.

Ионообменные свойства клеточных стенок растений нута и вики

Известно, что от ионообменных свойств клеточных стенок в определенной степени зависит способность к поглощению элементов минерального питания и ионный состав растений. Ионообменная способность полимерного матрикса клеточных стенок, изолированных из разных органов, была исследована с помощью потенциометрического метода, который ранее был разработан и применен к исследованию структуры ионогенных групп клеточных стенок других растений (Мейчик и др., 1999; Meychik and Yermakov, 1999; 2001). Для расчета величин констант ионизации ионогенных групп (табл.1) применено модифицированное Грегором уравнение Хендерсона-Хассельбаха (Gregor et al, 1954):

$$pH = pK_a + n \log_{10} \left(\frac{\alpha}{1 - \alpha} \right), \quad (1)$$

где pK_a - кажущаяся константа ионизации ионогенной группы полимера, α - степень диссоциации, n – константа, зависящая от строения полимерной матрицы и природы противоиона. Анализ экспериментальных данных показал, что во всех случаях между соответствующими величинами pH_i и $\log_{10} \left(\frac{\alpha_i}{1 - \alpha_i} \right)$ существует статистически значимая прямолинейная зависимость. С помощью метода регрессионного анализа по уравнению (1) рассчитаны значения pK_a^j и n^j для каждой ступени ионизации.

Адекватность примененного подхода к описанию кислотно-основного равновесия оценивали методом регрессионного анализа, определяя параметры уравнения:

$$S_{\text{расч.}} = B S_{\text{эксп}} + A, \quad (2)$$

где $S_{\text{эксп}}$ и $S_{\text{расч.}}$ – экспериментально полученная и рассчитанная ионообменная

способность при соответствующем значении рН, мкмоль/г сухой массы клеточных стенок; A и B - параметры регрессии. Расчеты показали, что выбранная модель полностью соответствует полученным в настоящей работе экспериментальным данным, о чем свидетельствуют величины коэффициентов корреляции (r^{corr}) зависимостей $S_{\text{расч}} = f(S_{\text{эксп}})$, а также значения коэффициентов A и B уравнения 2. Во всех вариантах $r^{\text{corr}} \rightarrow 1$, значение A не превышает погрешности эксперимента, а $B \rightarrow 1$.

Результаты настоящей работы свидетельствуют, что в структуре полимерного матрикса клеточных стенок всех исследуемых растений содержится 4 типа ионогенных групп, способных принимать участие в обменных реакциях с ионами внешней среды при соответствующих условиях (табл 1).

Таблица 1. Средние значения констант диссоциации (pK_a^j) функциональных групп полимерного матрикса клеточных стенок растений нута и вики. Определение всех значений pK_a^j проведено при ионной силе раствора 100 мМ. j – тип ионогенной группы; 1 – аминогруппы; 2 – карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты, 3 – карбоксильные группы оксикоричных кислот, 4 – фенольные группы

растение	pK_a^j			
	$j=1$	$j=2$	$j=3$	$j=4$
Нут ILC 482	~2	3,65±0,12	6,83±0,03	10,00±0,18
Нут Bivaniј	~2	3,76±0,17	6,71±0,36	9,86±0,14
Вика	~2	3,60±0,17	7,0±0,27	9,80±0,35

На основании рассчитанных значений pK_a^j , данных по химическому составу клеточных стенок (Buchanan, 2000), результатов потенциометрического титрования клеточных стенок корней растений (Мейчик и др., 1999; Meychik and Yermakov, 1999; 2001) можно полагать, что катионообменные свойства клеточных стенок обусловлены карбоксильными группами α -D-полигалактуроновой и оксикоричных кислот и фенольными группами, а анионообменные – аминогруппами.

Полимерный матрикс клеточных стенок всех органов исследуемых растений имеет одинаковый качественный состав функциональных групп, на который не оказывает влияние уровень засоления внешней среды: во всех вариантах имеются аминогруппы, два типа карбоксильных и фенольные группы.

В зависимости от концентрации NaCl в среде выращивания, в клеточных стенках нута (корни и листья нижнего яруса) и вики (стебли и листья нижнего яруса) изменяется количество карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты (ПГК) (рис. 3). С повышением концентрации NaCl в среде от 0,5 до 80 мМ в полимерном матриксе этих органов содержание последних увеличивается на 10 – 20 %. Изменения в количестве групп ПГК при увеличении концентрации соли в среде, вероятно, являются одной из ответных реакций этих растений на засоление.

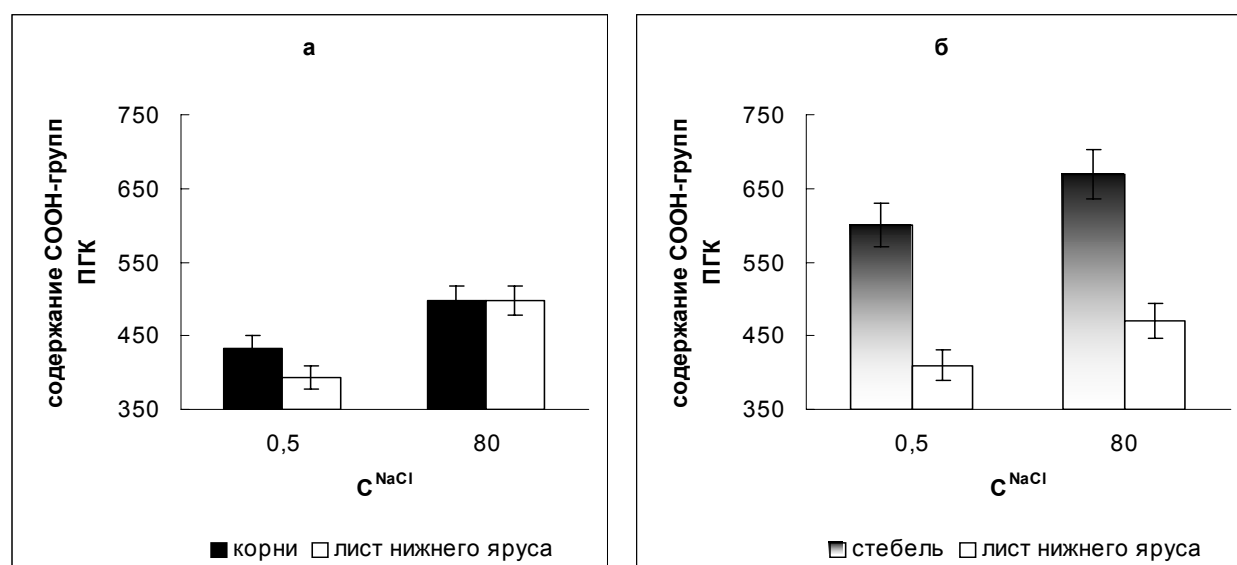


Рисунок 3. Влияние засоления (C^{NaCl} , мМ) на содержание карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты в полимерном матриксе клеточных стенок растений нута (*Bivanij*) (а) и вики (б)

Клеточные стенки стебля и корней исследуемых растений содержат больше карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты (рис. 4) по сравнению с этим показателем у других растений (Meuchik and Yermakov, 2001; 2003; Meuchik et al., 2005; Мейчик и др., 2006). Например, показано, что в корнях люпина, огурца, шпината содержание карбоксильных групп ПГК составляет от 350 до 450, в то время как в корнях нута сорта ILC 482 и вики достигает 680 и 620 мкмоль на 1 г сухой массы клеточных стенок.

У бобовых растений, независимо от концентрации соли в среде, наибольшее количество карбоксильных групп ПГК находится в полимерном матриксе стенок стебля, а фенольных групп – в матриксе листьев. Между собой стенки разных органов значительно различаются и по содержанию аминогрупп и карбоксильных

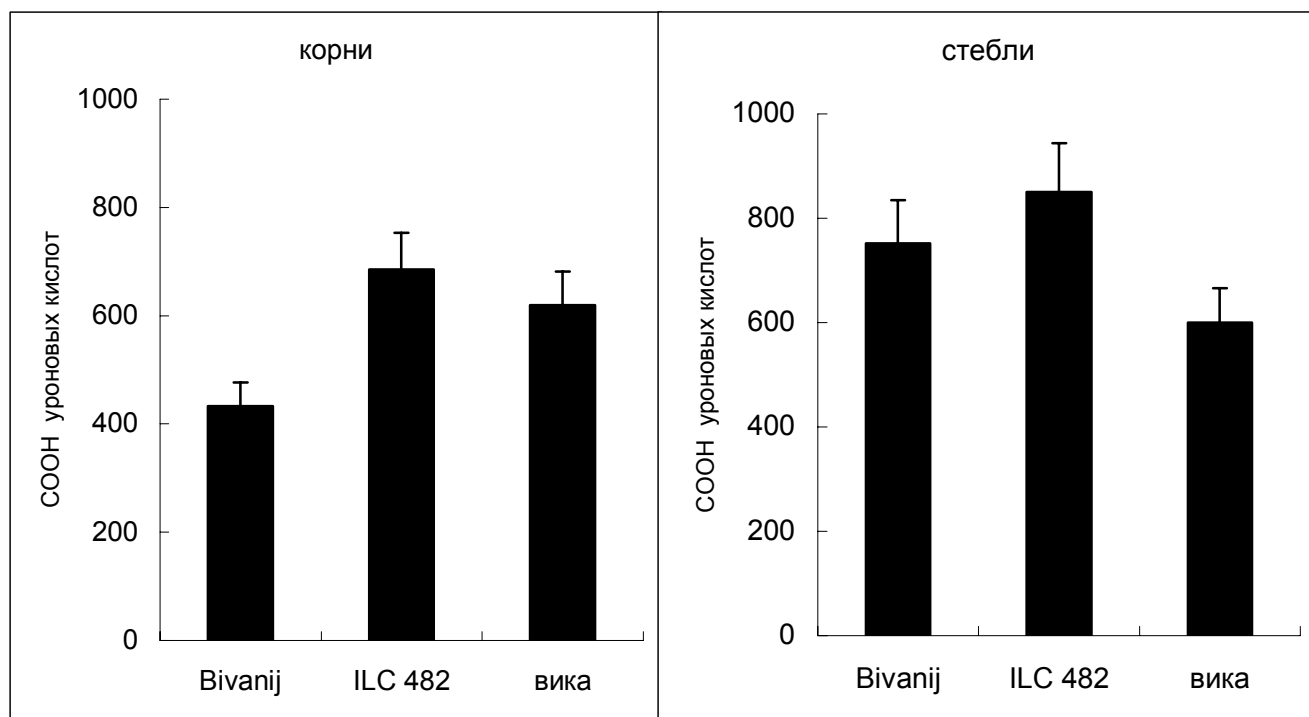


Рисунок 4. Содержание карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты в полимерном матриксе клеточных стенок растений нута (Bivanij и ILC 482) и вики

групп гидроксикоричных кислот: наибольшее количество и первых, и вторых находится в полимерном матриксе листьев. Все вышеизложенное позволяет говорить о том, что состав структурных полимеров в матриксе экстраклеточного компартмента у разных органов одного растения значительно различается.

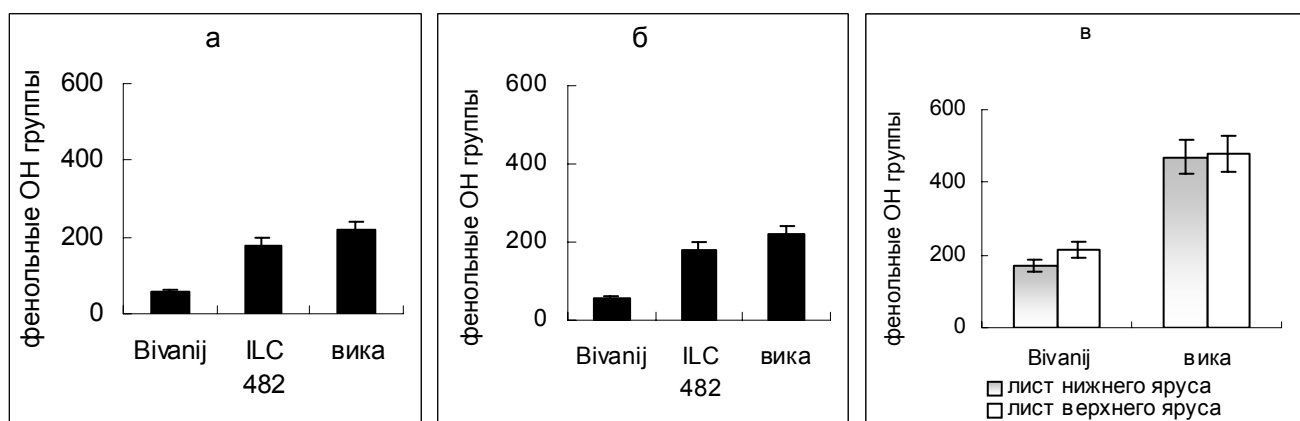


Рисунок 5. Содержание фенольных ОН-групп в клеточных стенках корней (а), стеблей (б) и листьев (в) растений нута (Bivanij и ILC 482) и вики

В ряду исследуемых растений клеточные оболочки самого солечувствительного сорта нута (Bivanij) имеют в своем составе наименьшее количество фенольных ОН-групп, что может свидетельствовать о сравнительно меньшей степени лигнификации его стенок по сравнению с *C. arietinum* (ILC 482) и *V. narbonesis*

(рис. 5). В соответствии с данными по относительной солеустойчивости исследуемые растения располагаются в ряд: *C. arietinum* (Bivanij) < *C. arietinum* (ILC 482) < *V. narbonensis*, и в той же последовательности происходит увеличение содержания фенольных ОН-групп в стенках всех органов. Можно полагать, что большая степень лигнификации корней у вики и нута сорта ILC 482 является одним из факторов, который определяет большую солеустойчивость растений *C. arietinum* (ILC 482) и *V. narbonensis* по сравнению с *C. arietinum* (Bivanij).

С увеличением концентрации соли в питательной среде у нута и вики изменяется константа ионизации карбоксильных групп ПГК, в то время как pK_a двух других групп мало зависят от этого фактора. Указанная закономерность соблюдается для клеточных оболочек, изолированных из корней, листьев и стеблей. С увеличением содержания NaCl в питательном растворе уменьшается константа ионизации карбоксильных групп ПГК или усиливаются их кислотные свойства. Таким образом, в ответ на засоление должно происходить увеличение ионообменной способности полимерного матрикса клеточных стенок.

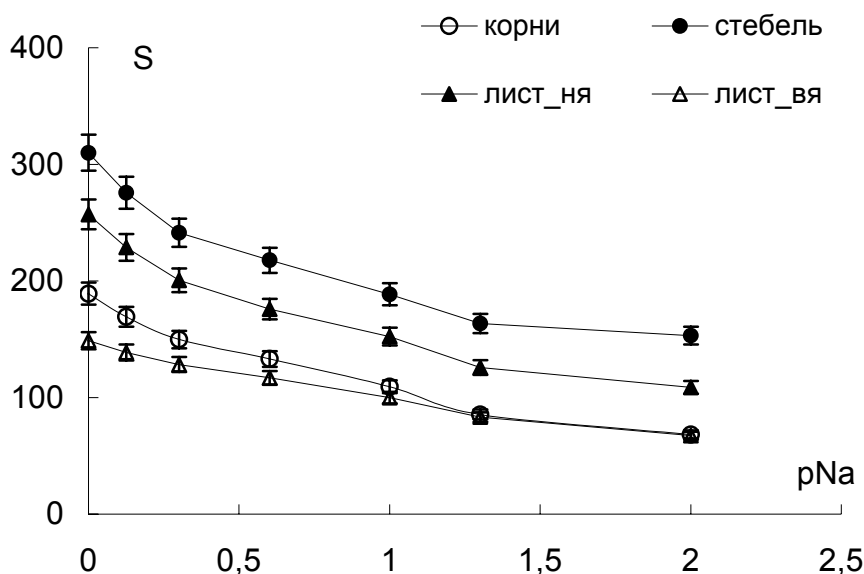


Рисунок 6. Влияние ионной силы раствора (pNa) на ионообменную способность (S , мкмоль/г сухой массы клеточных стенок) полимерного матрикса клеточных стенок, изолированных из разных органов нута (Bivanij), выращенного на питательном растворе с 0,5 мМ NaCl. Лист_ня – листья нижнего яруса, лист_вя – листья верхнего яруса. $pNa = -\log_{10}(C^{Na^+})$, где C^{Na^+} – концентрация NaCl в опытных растворах, М

Доказательством последнего утверждения могут служить зависимости ионообменной способности полимерного матрикса клеточных стенок нута и вики от

концентрации хлорида натрия (C^{NaCl}) во внешнем растворе (рис. 6). Во всех вариантах выращивания с увеличением C^{NaCl} у исследуемых растений резко возрастает ионообменная способность клеточных стенок, причем для корней, листьев и стеблей указанные зависимости имеют аналогичный характер. В зависимости от C^{NaCl} для корней нута и вики параметр S изменяется от 70 до 200-220, для стеблей – от 130 до 400, а для листьев – от 70 до 150 (листья верхнего яруса) – 300 (листья нижнего яруса) мкмоль на 1 г сухой массы клеточных стенок в интервале изменения ионной силы от 5 до 1000 мМ. Следует подчеркнуть, что при любых условиях способность к ионному обмену клеточных стенок стебля выше по сравнению с остальными органами (рис. 6).

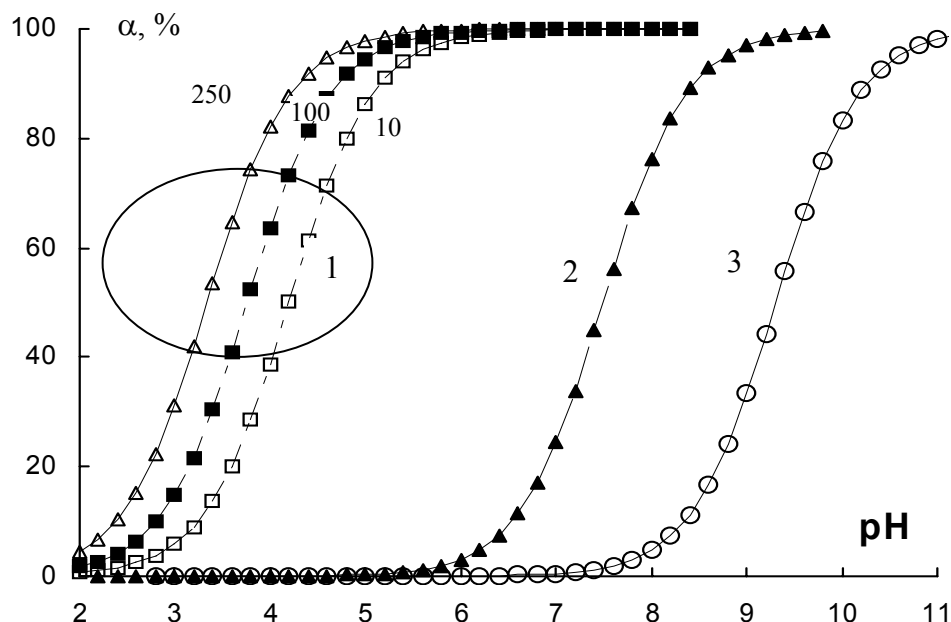


Рисунок 7. Зависимость степени диссоциации (α) функциональных групп полимерного матрикса клеточных стенок нута и вики от pH и ионной силы раствора. 1 – карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты; 2 – карбоксильные группы оксикоричных кислот; 3 – фенольные группы. 10, 100, 250 - значения ионной силы растворов, мМ

Степень ионизации (α) слабых кислот и оснований, к которым относятся и ионогенные группы в структуре полимерного матрикса клеточных стенок, зависит лишь от двух факторов: от значений pH и pK_a . Последний параметр, как известно, является постоянным для любой кислоты или основания. Следовательно, для фиксированного значения pH степень ионизации зависит только от химической природы кислоты или основания (Альберт и Сергент, 1964). На основании полу-

ченных в работе результатов можно рассчитать степень диссоциации каждой группы в зависимости от pH и ионной силы раствора. Уравнение для расчета α выглядит следующим образом:

$$\alpha = \left\{ 1 / \left[1 + 1 / 10^{[(\text{pH} - \text{pK}_a) / n]} \right] \right\}, \quad (3)$$

Так как качественный состав ионогенных групп клеточных стенок всех исследуемых растений из семейства бобовых идентичен, то представленные кривые (рис. 7) характеризуют состояние ионообменных групп полимерного матрикса клеточных стенок и нута, и вики при разной ионной силе внешнего раствора. Так, при pH=4,5 около 60% карбоксильных групп ПГК ионизировано в среде с 10 мМ NaCl, в то время как при 100 мМ NaCl величина α этих групп достигает 80%. В этих условиях все карбоксильные группы оксикоричных кислот не способны к реакциям обмена с ионами внешней среды. При pH=7 карбоксильные группы ПГК диссоциированы на 100%, тогда как карбоксильные группы оксикоричных кислот – на 20%. Следует отметить, что фенольные и аминогруппы всегда закрыты при физиологических условиях (pH 5,0-8,0) и, следовательно, не принимают участия в ионообменных реакциях (рис. 7).

Сравнительный анализ набухания клеточных стенок растений

Известно, что растительная клеточная стенка представляет собой природный слабосшитый ионообменник (Grignon and Sentenac, 1991). Одним из важных физико-химических показателей, характеризующих свойства полимера как ионообменника, является набухание. Количественной характеристикой этого процесса служит весовой коэффициент набухания (K^{cw}), равный количеству воды в полимере, отнесенному к грамму сухой массы клеточных стенок. Причиной набухания ионообменных материалов в водном растворе является наличие гидрофильных групп, причиной нерастворимости - существование поперечных связей. Степень набухания ионообменного материала зависит от свойств ионита и состава внешнего раствора. Известно, что способность к набуханию возрастает с уменьшением степени поперечной связанности, с увеличением общего количества ионогенных групп, с увеличением степени их диссоциации, с уменьшением концентрации рас-

твора и зависит от радиуса гидратированного иона, которым заполняется сорбент (Гельферих, 1962).

У исследуемых растений во всех органах коэффициент набухания полимерного матрикса клеточных стенок (K^{cw}), также как ионообменная способность, зависит от ионной силы внешнего раствора (рис. 8). Наши результаты показывают, что набухание клеточной стенки изменяется в соответствии с физико-химическими закономерностями, которые известны для синтетических слабоосновных катионообменников (Гельферих, 1962). Значение K^{cw} увеличивается с уменьшением ионной силы раствора и с увеличением pH (или степени диссоциации ионогенных групп). Во всех случаях набухание клеточной стенки минимально в кислой области. Это означает, что клеточные стенки сжимаются или уменьшаются в объеме с уменьшением pH в апопласте или во внешней среде.

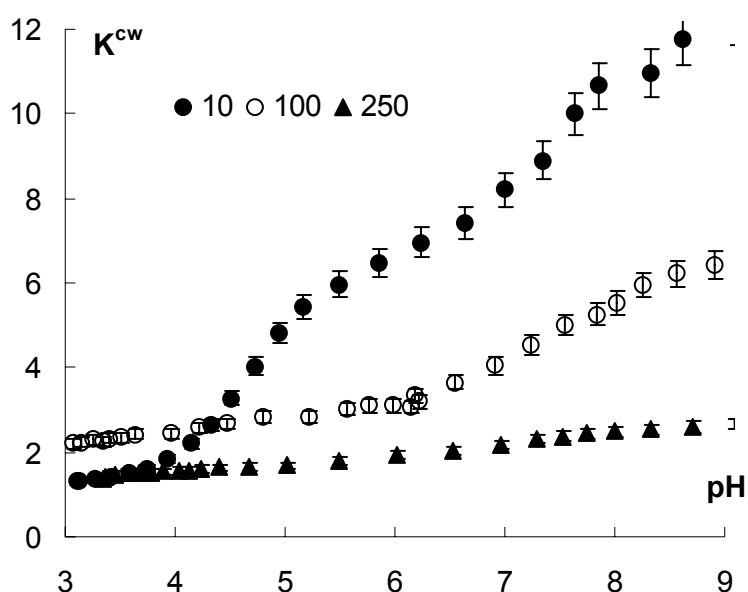


Рисунок 8. Способность к набуханию клеточных стенок (K^{CW} , г воды/г сухой массы клеточных стенок), изолированных из корней нута (сорт Bivani), выращенного в присутствии 0,5 мМ NaCl в питательном растворе. В легенде цифрами обозначена ионная сила растворов (мМ), при которой проводили определение K^{CW}

Аналогичные изменения в объеме клеточной стенки происходят при увеличении ионной силы внешнего раствора. Во всех случаях K^{cw} возрастает с увеличением pH. Полученные результаты отчетливо показывают, что объем клеточных стенок

не является постоянной величиной и зависит от ионных условий и рН в окружающей среде и внутри апопласта.

Поведение клеточных стенок растений при разных уровнях засоления среды

На основании результатов работы возможно оценить концентрацию протонов в водном пространстве апопласта, образующихся в результате реакций обмена между катионами внешней среды и протонами ионизированных карбоксильных групп клеточных стенок корней при изменении уровня засоления внешней среды. Иллюстрацией этого положения служит полученная экспериментальная зависимость $C^{H^+} = f(-\log_{10} C^{Na})$ (рис. 9). Расчеты показывают, что увеличение концентрации NaCl во внешнем растворе на 50 мМ, например, от 50 до 100 мМ приведет к увеличению концентрации протонов в водной фазе клеточных стенок на 12 мМ. Если концентрация соли увеличивается на 80-90 мМ (например, от 10 до 100 мМ), то рН в апопласте может снизиться до значений менее 3, что, в свою очередь, может привести к гибели клетки под воздействием высокой концентрации выделяющихся из клеточных стенок протонов.

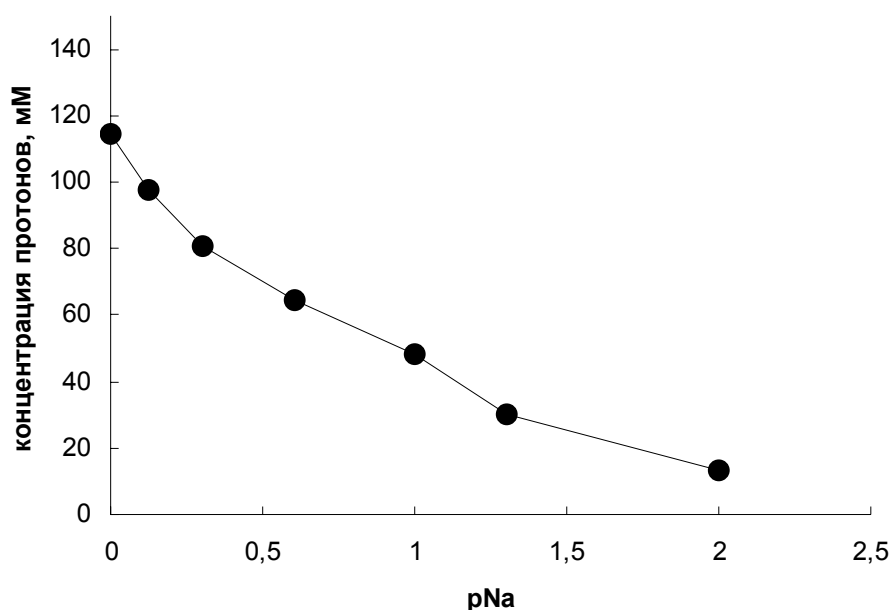


Рисунок 9. Концентрация протонов в водной фазе апопласта корней нута в зависимости от концентрации NaCl. $pNa = -\log_{10} C^{NaCl}$, где C^{NaCl} – концентрация NaCl в опытных растворах, М

Анализ данных литературы (Yan, 1998; Amtmann, 1999) свидетельствует, что снижение рН в апопласте за счет работы H^+ -АТФазы приводит к стимулированию различных транспортных процессов. С другой стороны, результаты исследования ионообменных свойств клеточных стенок показывают, что в условиях солевого стресса за счет реакций обмена между катионами внешнего раствора и протонами карбоксильных групп клеточных стенок образуется высокая концентрация протонов около плазмалеммы, которая, вероятно, влияет на процессы транспорта ионов в клетку.

В настоящее время установлено, что при высокой концентрации калия в среде в H^+ -сопряженном поглощении элементов минерального питания большую роль играет рН апопласта (Amtmann, 1999), при этом протоны внеклеточного компартамента являются не только субстратом для транспортных систем, но и воздействуют на электрические движущие силы этого процесса путем изменения мембранного потенциала. Методом patch-clamp на выделенных из корней ячменя протопластах показано, что активность K-селективных входящих каналов (KIRCs) плазматической мембраны зависит от рН апопласта: уменьшение рН внешнего раствора увеличивает проводимость KIRCs.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное сравнительно-физиологическое исследование показало, что растения из семейства Fabaceae, отличающиеся по устойчивости к действию засоления, проявляют сортовую и видовую специфичность структуры полимеров экстраклеточного матрикса, характеристикой которой является содержание функциональных групп в клеточных стенках.

В ряду исследованных растений у клеточных стенок во всех органах самого солечувствительного сорта нута Bivaniј содержание фенольных групп самое низкое, что может свидетельствовать о сравнительно меньшей степени лигнификации их стенок по сравнению с сортом ILC 482 и видом *V. narbonesis*. В соответствии с данными по относительной солеустойчивости исследуемые растения располагаются в ряд: *C. arietinum* (Bivaniј) < *C. arietinum* (ILC 482) < *V. narbonesis*, и в той же последовательности увеличивается содержание фенольных групп в стен-

ках.

Клеточные стенки всех исследуемых растений характеризуются высоким содержанием карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты, что свидетельствует о большой доле пектиновых веществ в них. Эти данные согласуются с результатами других авторов (Talbot and Ray, 1992). Показано, что у бобовых растений пектины составляют ~ 37% от массы клеточной стенки и представлены, главным образом, гомогалактуронанами.

С увеличением концентрации NaCl в среде у нута и вики снижается кажущаяся константа диссоциации карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты, следовательно, возрастает количество ионогенных групп, способных обменивать протон на катион внешней среды. В результате можно ожидать, что раствор в водном пространстве клеточной стенки будет содержать меньше ионов натрия и больше протонов, чем внешний раствор. Снижение pH в апопласте в этих условиях, вероятно, приведет к изменению транспортных функций плазматической мембраны.

Коэффициент набухания характеризует степень сшивки между цепями полимеров клеточных стенок и является важной количественной характеристикой проницаемости полимерного матрикса. Сравнение коэффициентов набухания клеточных стенок нута и вики, а также других представителей гликофитов показывает, что у изученных растений из сем. Fabaceae более низкая степень сшивки полимеров в матриксе клеточных стенок чем, например, у гликофита из семейства Chenopodiaceae (Мейчик и др., 2006). На основании этих результатов можно полагать, что в условиях засоления клеточные стенки бобовых с меньшей эффективностью защищают клетку от стрессового воздействия по сравнению, например, с устойчивым гликофитом (шпинат), так как в первом случае поток натрия из внешнего раствора к плазмалемме будет больше. Вполне вероятно, что выявленные особенности в свойствах полимерного матрикса клеточных стенок (низкое содержание фенольных полимеров, низкая степень сшивки) обуславливают малую устойчивость растений из сем. Fabaceae к засолению по сравнению, например, со злаковыми.

В соответствии с данными настоящего исследования у бобовых растений снижение рН раствора и/или увеличение ионной силы приводят к уменьшению степени набухания клеточной стенки. С другой стороны, известно, что закисление среды снижает гидравлическую проводимость стенок (Ктиторова и Скобелева, 1999). Кроме того, показано, что при низкой ионной силе внешнего раствора (высокой скорости транспирации) апопластный путь движения воды является определяющим, так как в этих условиях гидравлическое сопротивление корня низкое, что обеспечивает быстрое поглощение воды (Steudle and Peterson, 1998). На основании анализа указанных данных литературы и наших экспериментов можно заключить, что у нута и вики существует прямая связь между набуханием полимерного матрикса клеточных стенок корней и водным током, что указывает на важную физиологическую функцию клеточных стенок корня в регуляции движения воды по корневому апопласту. Способность полимерного матрикса клеточных стенок изменять гидравлическую проводимость под действием засоления особенно важна для корней, главной функцией которых является поглощение воды и растворенных веществ. Вполне вероятно, что уменьшение гидравлической проводимости клеточных стенок с увеличением уровня засоления среды является важным фактором в адаптации растений к этому абиотическому стрессору, так как поток концентрированного по соли раствора к цитоплазматическому содержимому клетки снижается.

Выводы

1. Ионообменные свойства полимерного матрикса клеточных стенок *C. arietinum* (Bivaniј и ILC 482) и *V. narbonensis* определяются наличием в их составе четырех типов функциональных групп, которые способны принимать участие в обменных реакциях с ионами окружающей среды при соответствующих условиях. Катионообменные свойства клеточных стенок обусловлены присутствием в них карбоксильных групп α -D-полигалактуроновой и оксикоричных кислот, а также фенольных групп, а анионообменные – аминокетонами.

2. Относительная солеустойчивость растений увеличивается в соответствии с содержанием фенольных полимеров в матриксе клеточных стенок в ряду: *C. arietinum* (Bivani) < *C. arietinum* (ILC 482) < *V. narbonensis*.
3. Показано, что в ответ на засоление питательного раствора у растений из сем. Fabaceae происходит снижение константы ионизации карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты в стенках всех органов, в то время как константы диссоциации карбоксильных групп оксикоричных кислот и фенольных ОН-групп мало зависят от ионной силы внешнего раствора.
4. Ионообменная способность полимерного матрикса клеточных стенок корня, стебля и листьев нижнего яруса *C. arietinum* и *V. narbonensis* увеличивается с уровнем засоления питательного раствора на 10-20%. При всех концентрациях хлористого натрия в среде способность к ионному обмену клеточных стенок стебля выше, чем у корней и листа, так как клеточные стенки стебля содержат значительно больше карбоксильных групп α -D-полигалактуроновой кислоты.
5. Степень набухания клеточных стенок *C. arietinum* и *V. narbonensis* изменяется в зависимости от ионных условий и pH во внешнем растворе и апопласте.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1. Чегамирза К., Хонарманд С., Бахраминежад С. Изучение реакции разных генотипов пшеницы на солевой стресс. The second International Iran and Russia Conference «Agricultural and Natural Resources», 13-14 February 2001, Moscow, Russia, С. 15-16.
2. Мейчик Н.Р., Хонарманд С., Ермаков И.П. Сравнительная оценка ионообменной способности полимерного матрикса клеточных стенок, изолированных из разных тканей растений сем. FABACEAE. IV Международная научная конференция «РЕГУЛЯЦИЯ РОСТА, РАЗВИТИЯ И ПРОДУКТИВНОСТИ РАСТЕНИЙ», 26-28 октября 2005, Минск, Беларусь, С. 148.

3. Honarmand S.J., Meychik N.R., Yermakov I.P. Salinity effects on the germination and seedling growth of chickpea varieties. 13th Multi-disciplinary Iranian Researchers Conference in Europe, 2 July 2005, Leeds, UK, <http://13th.irce.org>
4. Yermakov I.P., Honarmand S.J., Meychik N.R. Diffusion of the organic cation in root cell walls. In the book «Plant nutrition for food security, human health and environmental protection». Beijing, China, 2005, p. 568-569.
5. Meychik N.R., Honarmand S.J., Yermakov I.P. Diffusion of the organic cation in root cell walls of different plants. International scientific conference «Genetic and Physiological Fundamentals of Plant Growth and Productivity», 14-17 November 2006, Vilnius, Lithuania, p. 80-81.
6. Honarmand S.J., Meychik N.R., Yermakov I.P. Salinity effects on the growth and plant nutrition uptake of chickpea varieties. International scientific conference «Genetic and Physiological Fundamentals of Plant Growth and Productivity», 14-17 November 2006, Vilnius, Lithuania, p. 75-76.
7. Meychik N.R., Honarmand S.J., Yermakov I.P. Diffusion of the organic cation in root cell walls of different plants. *Biology*, 2007, №2, в печати.
8. Honarmand S.J., Meychik N.R., Yermakov I.P. Salinity effects on the growth and plant nutrition uptake of chickpea varieties. *Biologija*, 2007, №2, в печати.
9. Meychik N.R., Honarmand S.J., Nikolaeva J.I., Yermakov I.P. Ion exchange properties of cell walls of *Cicer arietinum L.* roots under different environmental salt conditions. *Biologija*, 2007, №2, в печати.