

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 577.3:577.1:631.8
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-1-7-16>

Поступила в редакцию 03.06.2020
Received 03.06.2020

Н. Г. Аверина¹, И. А. Дремук¹, А. В. Усатов²

¹Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ И РЯДА БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СОЛЕУСТОЙЧИВОГО ПЛАСТОМНОГО МУТАНТА «SR-3» ГОРЧИЦЫ И ЕГО РОДИТЕЛЬСКОЙ ФОРМЫ «ДОНСКАЯ-5»

Аннотация. Показано, что пластомная мутация, индуцированная нитрозометилмочевинной, приводит к формированию солеустойчивости растений горчицы линии «SR3» по сравнению с родительским сортом «Донская-5», повышает количество проросших семян мутанта и его ростовые показатели как при выращивании на воде, так и при использовании NaCl. При низких и средних концентрациях соли (20, 50 и 100 мМ) наблюдались стимуляция ростовых процессов у обеих форм горчицы, более выраженная у растений мутанта, снижение уровня пролина по сравнению с таковым у растений, выращиваемых на воде, наиболее выраженное у растений линии «SR3», а также более низкое содержание активных форм кислорода у мутанта. Отмечено отрицательное действие более высоких концентраций соли (150, 200 и 250 мМ) на ростовые показатели обеих форм горчицы и меньший негативный эффект на рост растений линии «SR3» при использовании концентрации 150 мМ. Увеличение концентрации соли до 150, 200 и 250 мМ привело также к постепенному возрастанию содержания пролина, особенно у формы «SR3», что в конечном итоге максимально повысило уровень пролина в этом варианте (718 мкг/г свежего веса) и в растениях сорта «Донская-5» (404 мкг/г свежего веса) при использовании концентрации соли 250 мМ. В условиях засоления при 100 и 250 мМ соли способность растений горчицы линии «SR3» накапливать 5-аминолевулиновую кислоту (АЛК) была выше, чем у растений сорта «Донская-5», в 2,6 и 1,5 раза. Отмечена высокая способность растений солеустойчивого мутанта накапливать АЛК и при выращивании в нормальных условиях и в отсутствие NaCl (в 3,8 раза выше, чем у сорта «Донская-5»). Полученные результаты подтверждают выдвинутое ранее предположение о высокой способности растений синтезировать АЛК в нормальных условиях, что может служить показателем их большей стрессоустойчивости.

Ключевые слова: растения горчицы, сорт «Донская-5», пластомный мутант «SR3», солеустойчивость, рост, активные формы кислорода, пролин, 5-аминолевулиновая кислота

Для цитирования: Аверина, Н. Г. Изучение морфометрических и ряда биохимических показателей солеустойчивого пластомного мутанта «SR-3» горчицы и его родительской формы «Донская-5» / Н. Г. Аверина, И. А. Дремук, А. В. Усатов // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2021. – Т. 66, № 1. – С. 7–16. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-1-7-16>

Natalia G. Averina¹, Irina A. Dremuk¹, Alexandr V. Usatov²

¹Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences, Minsk, Republic of Belarus

²Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russian Federation

THE STUDY OF MORPHOMETRIC AND THE NUMBER OF BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE SALT-RESISTANT PLASTOMIC MUTANT “SR-3” OF MUSTARD PLANTS AND ITS PARENTAL VARIETY “DONSKAYA-5”

Abstract. It was shown that the plastome mutation induced by nitrosomethylurea and resulting in the formation of salt tolerant mustard plants of the “SR3” line improved the germination of the mutant seeds and seedlings growth both under water conditions and NaCl salinisation compared to the parent variety “Donskaya-5”. At low and medium salt concentrations (20, 50 and 100 mM) stimulation of seedling growth was noted in both forms of mustard, more pronounced in mutant plants which also contained a lower amount of reactive oxygen species compared to “Donskaya-5”. In this conditions in both forms of plants it was detected a significant decrease of proline content in comparison with seedlings grown on water with the most difference between control and experimental plants of the line SR3. It was noted a negative effect of higher salt concentrations (150, 200, and 250 mM) on the seedlings growth of both mustard forms with a lesser negative effect of 150 mM salt on the growth of mutant plants. An increase in the salt concentration to 150, 200 and 250 mM NaCl led also to a gradual increase in the proline content, which occurs at a faster rate in the plants of “SR3” line, and ultimately led to a maximum proline content in this variant (718 µg/g of fresh weight) and 404 µg/g of fresh weight in plants of the cultivar “Donskaya-5” at 250 mM NaCl. Under salinization with 100 and 250 mM salt, the ability of SR3 mustard plants to accumulate ALA was significantly higher

than in “Donskaya-5” plants by 2.6 and 1.5 times respectively. A high ability of the salt tolerant mutant plants to accumulate ALA was also noted when seedlings were grown under normal conditions in the absence of NaCl (3.8 times higher than in the case of the “Donskaya-5” variety). This supports our earlier assumption that high ability of plants to produce ALA under normal conditions may serve as an indicator of their high stress resistance when exposed to stress.

Keywords: mustard plants, variety “Donskaya-5”, plastome mutant “SR3”, salt tolerance, growth, reactive oxygen species, proline, 5-aminolevulinic acid

For citation: Averina N. G., Dremuk I. A., Usatov A. V. The study of morphometric and the number of biochemical characteristics of the salt-resistant plastomic mutant “SR-3” of mustard plants and its parental variety “Donskaya-5”. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 1, pp. 7–16 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-1-7-16>

Введение. Засоление является одним из факторов окружающей среды, который в значительной степени ограничивает рост и развитие растений, приводя в конечном итоге к снижению их продуктивности и даже к гибели. В последнее время в мире отмечается расширение масштабов почвенного засоления. Число генотипов хозяйственно полезных растений, способных расти на засоленных почвах, невелико. Генетические подходы к созданию высокоустойчивых к засолению сортов и гибридов сельскохозяйственных растений являются наиболее перспективными. Идентификация новых чувствительных к солевому стрессу генов и создание с их использованием трансгенных растений практикуется во многих лабораториях мира [1–3]. Многочисленные исследования привели к представлению о генетическом многообразии ответа организма на солевой стресс на уровне единичной клетки [4, 5], что потребовало освоения методов мультигенного переноса. В то же время манипуляции со многими генами возможны только после изучения специфичности сигнальных путей, которые отвечают за экспрессию генов, определяющих соле-толерантность растений.

Еще одним подходом к решению проблемы эффективного освоения засоленных земель является целенаправленная селекция с целью создания высокоустойчивых к засолению сортов и гибридов сельскохозяйственных культур. Первым шагом в этом направлении является получение солеустойчивых форм как исходного генетического материала для дальнейшей селекционной работы.

В настоящее время существует несколько способов получения солеустойчивых форм растений. Прежде всего это выделение галорезистентных экземпляров из сортовой популяции. Однако количество устойчивых растений в данном случае невелико, что отражает частоту спонтанной изменчивости. Неоднократно предпринимались попытки передать повышенную солеустойчивость диких форм культурным сортам при гибридизации, но в результате у полученных гибридов довольно часто ухудшался комплекс хозяйственно ценных признаков.

Устойчивые к засолению линии могут быть получены при помощи клеточной селекции. Однако до сих пор существуют определенные трудности в получении регенерантов из каллусной ткани ряда культур. Наряду с этим при регенерации растений из растущих в условиях засоления каллусов могут проявляться признаки химерности, что в свою очередь не гарантирует сохранения признака солеустойчивости в последующих поколениях.

Мощным инструментом, повышающим частоту наследственной изменчивости, является индуцированный мутагенез. В лаборатории генетики растений НИИ биологии Южного федерального университета (г. Ростов-на-Дону) с помощью индуцированного нитрозометилмочевинной мутагенеза получены не имеющие хлорофильных дефектов солеустойчивые формы пластомных мутантов горчицы, которые могут быть использованы в качестве исходного генетического материала для дальнейшей селекции, направленной на создание солеустойчивых форм. Повышенная солеустойчивость (Salt Resistance, “SR”) SR-линий проявилась в том, что в условиях 1 %-ного и 1,2 %-ного засоления NaCl они формируют более высокий урожай по сравнению с исходным сортом «Донская-5», выросшим на воде [6]. Масса семян одного растения у форм «SR2» и «SR3», выросших в условиях 1,2 %-ного засоления, достоверно превышала этот показатель у сортовых растений – на 30,4 и 63,4 % соответственно. В этих же условиях уровень первичных продуктов фотосинтеза – редуцирующих сахаров в солеустойчивых формах был выше (на 11 и 69 % соот-

ветственно), чем в листьях родительской формы, что, с одной стороны, характеризует активность фотосинтеза у мутантов, а с другой – выполнение ими защитных осмопротекторных функций. Были отмечены и изменения в пространственной организации хлоропластов «SR»-форм по сравнению с сортом «Донская-5» на ультраструктурном уровне – снижение числа тилакоидов в грани и их равномерное распределение по всей площади среза хлоропласта, а также большая стабильность структуры хлоропласта в условиях засоления. Проведенное исследование генотипов солеустойчивых линий горчицы «SR2», «SR3» и сорта «Донская-5» с помощью RAPD-анализа обнаружило также генетические различия между линиями и сортом, а также между самими солеустойчивыми линиями [7]. Эти исследования показали, что создание галорезистентных пластомных мутантов сельскохозяйственных культур, выявление механизмов, участвующих в формировании солеустойчивости таких растений, является актуальной и перспективной задачей.

Цель работы – изучить ряд морфометрических, а также важнейших биохимических показателей, характеризующих, в частности, общее содержание активных форм кислорода, способность растений к синтезу ключевого предшественника хлорофилла и гема, регулятора роста растений и антистрессора – 5-аминолевулиновой кислоты, а также универсального антистрессора пролина, содержание которых характеризует состояние защитной системы растений в условиях засоления, создаваемого разными концентрациями NaCl.

Материалы и методы исследования. Для изучения роли пластома в формировании растений, устойчивых к засолению почв, нами использованы родительский сорт горчицы «Донская-5» и наиболее устойчивый к засолению пластомный мутант «SR3». Семена растений горчицы проращивали в чашках Петри на смоченной водой или растворами NaCl фильтровальной бумаге и выращивали до 7-дневного возраста в режиме 14 ч света – 10 ч темноты. Для освещения применяли люминесцентные лампы Philips TD-36/765 (66,2 мкмоль фотонов/м²·с). Для анализа использовали семядольные листья.

Для определения активности системы синтеза 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) срезанные листья инкубировали 6 ч на свету на 0,05 М растворе АЛК в 0,1 М Трис-НСl буфере (pH 6,5), после чего фиксировали паром и извлекали из них АЛК. Для определения количества АЛК навеску листьев гомогенизировали в 2 мл 5 %-ной трихлоруксусной кислоты, затем гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 6000 g. Супернатант сливали, оставшийся осадок гомогенизировали в 2 мл ацетатного буфера (pH 4,6) и вновь центрифугировали 10 мин при 6000 g. Супернатанты объединяли, добавляли ацетилацетон (3 капли на 2 мл супернатанта), перемешивали и нагревали при $t = 100$ °С в течение 15 мин. После охлаждения раствора к нему приливали равный объем модифицированного реагента Эрлиха и через 15 мин определяли оптическую плотность раствора при 553 нм. Количество АЛК рассчитывали с помощью молярного коэффициента экстинкции $6 \cdot 10^4$ М⁻¹·см⁻¹ [8].

Для определения общего содержания АФК использовали флуоресцентный тест, в основе которого лежит образование дихлорфлуоресцеина (ДХФ) из нефлуоресцирующего ДХФ-диацетата в полученных с помощью 0,2 н HClO₄ экстрактах из листьев [9]. Флуоресценцию ДХФ регистрировали на спектрофлуориметре (Solar, Беларусь). Длины волн возбуждения и регистрации флуоресценции составляли 496 и 524 нм соответственно. Тест не является специфическим по отношению к какой-либо одной АФК. С его помощью, как правило, по количеству образовавшегося ДХФ определяют суммарное содержание АФК. Содержание ДХФ рассчитывали по калибровочной кривой.

Для определения содержания пролина навеску листьев горчицы (0,1 г) фиксировали жидким азотом, растирали в 1 мл 3 %-ной сульфосалициловой кислоты и центрифугировали 10 мин при 18 000 g. К супернатанту (0,25 мл) добавляли равные объемы ледяной уксусной кислоты и кислотоингибиторного реагента (0,25 г нингидрина в 10 мл раствора, содержащего ледяную уксусную кислоту, дистиллированную воду и 85 %-ную ортофосфорную кислоту в соотношении 6:3:1). Пробы инкубировали 1 ч при 90 °С, затем охлаждали до комнатной температуры и измеряли оптическую плотность при 515 нм [10]. Количество пролина рассчитывали в мкг/г сырой массы, используя калибровочную кривую.

Статистическая обработка экспериментальных данных состояла в определении средней квадратичной ошибки их среднего арифметического.

Результаты и их обсуждение. Прежде всего определяли количество проросших семян сорта «Донская-5» и мутанта «SR3» на 2-й и 3-й день их выращивания на воде. На рис. 1 видно, что количество проросших семян у солеустойчивой линии несколько больше, чем у сортовой горчицы. Так, на 2-й день замачивания семян у сорта «Донская-5» и линии «SR3» проросло 67 и 87 % семян соответственно, на 3-й день – 83 и 91 %. При засолении с использованием концентраций 170 и 200 мМ количество проросших семян снижалось у обоих типов растений, но оставалось более высоким у формы «SR3» по сравнению с сортом «Донская-5» – 85 и 68 % (на 3-й день прорастания – 78 и 61 % соответственно).

На рис. 2 видно, что при выращивании растений обеих форм на воде высота растений линии «SR3» превышает (в среднем на 22 %) высоту растений сорта «Донская-5». При засолении с использованием концентраций 20, 50 и 100 мМ NaCl наблюдали отчетливую стимуляцию ростовых процессов у растений обеих форм, наиболее выраженную у линии «SR3».

Наибольший эффект наблюдали при концентрации соли 20 мМ: у «Донской-5» и «SR3» – 152 и 170 % соответственно по сравнению с таковой у растений этих форм, выращенных на воде. Максимальную стимуляцию ростовых процессов наблюдали у линии «SR3». Высота растений этой формы была выше, чем у растений сорта «Донская-5», на 36, 24 и 13 % при концентрациях соли 20, 50 и 100 мМ соответственно. Незначительную стимуляцию роста растений мутанта (на 8 % по сравнению с горчицей сорта «Донская-5») наблюдали и при концентрации соли 200 мМ, хотя в отдельных опытах с этой концентрацией соли стимулирующее действие мутации проявлялось достаточно отчетливо (рис. 3). В этих случаях у растений «SR3» визуально была отмечена и более зеленая окраска листьев, чем у сорта «Донская -5».

Стимуляция роста растений в условиях низкого и среднего уровней засоления, по-видимому, связана с накоплением ионов Na^+ и Cl^- , которые, выступая в качестве питательных субстратов, способствуют росту клеток путем их растяжения [11], а также с функционированием защитных механизмов. Вместе с тем отрицательное действие высоких концентраций соли (150, 200 и 250 мМ) на ростовые показатели обеих форм горчицы может быть обусловлено ингибированием активности целого ряда ферментов [11].

Пролин является обязательным компонентом растительной клетки, и его содержание в ней зависит от стадии развития, вида и органа растения. В условиях стресса содержание свободного пролина многократно возрастает, и в настоящее время он рассматривается как универсальный

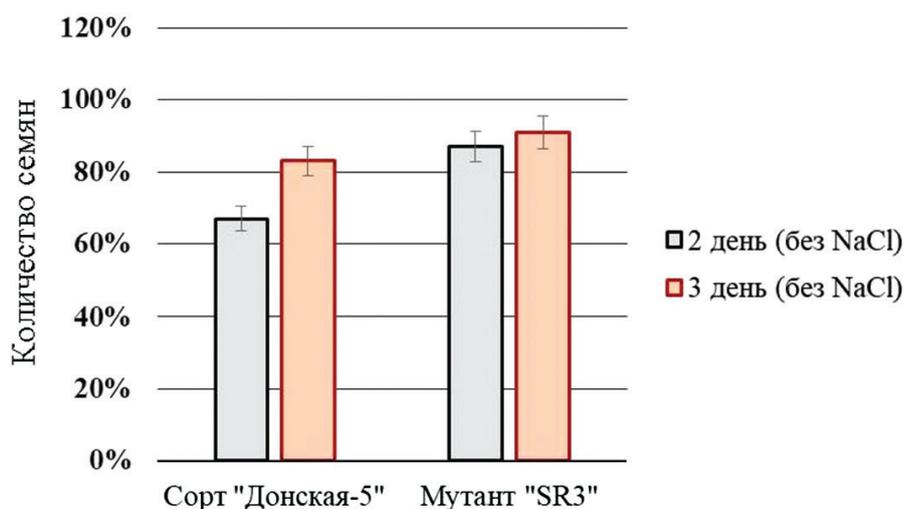


Рис. 1. Количество проросших семян растений горчицы сорта «Донская-5» и солеустойчивого пластомного мутанта «SR3» на 2-й и 3-й день при их выращивании на воде

Fig. 1. The germination of mustard plant seeds of the variety “Donskaya-5” and salt-tolerant plastome mutant “SR3” located on the water surface for 2 and 3 days

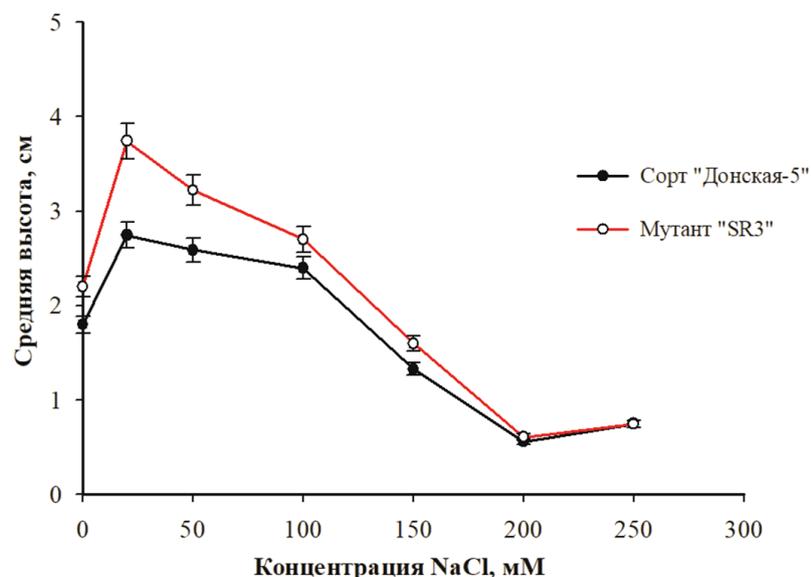


Рис. 2. Средняя высота 7-дневных растений сорта «Донская-5» и солеустойчивого пластового мутанта «SR3», выращенных на растворах NaCl разных концентраций
 Fig. 2. The average height of 7-day-old plants of the “Donskaya-5” variety and salt-tolerant plastome mutant “SR3” grown on NaCl solutions of different concentrations



Рис. 3. Внешний вид 7-дневных растений горчицы сорта «Донская-5» и солеустойчивого пластового мутанта линии «SR3» (на рисунке S-3), выращенных на 200 мМ растворе NaCl

Fig. 3. Appearance of 7-day-old mustard plants of the “Donskaya-5” variety and the salt tolerant plastome mutant of the “SR3” line (in Figure S-3) grown on 200 mM NaCl solution

антистрессор, выполняющий целый ряд защитных функций [12, 13]. Его накопление зарегистрировано в условиях засухи, засоления, экстремальных температур, УФ-радиации, вечной мерзлоты, а также при корневой гипоксии, затоплении, загрязнении тяжелыми металлами и гербицидами [12, 13]. Нами проанализирована динамика изменения содержания пролина в проростках горчицы сорта «Донская-5» и ее солеустойчивой линии «SR3» при их выращивании на растворах разных концентраций NaCl.

При выращивании растений на воде отмечено незначительно большее содержание пролина у солеустойчивой горчицы по сравнению с сортовой – 222 мкг/г сырой массы пролина у «SR3» и 194 мкг/г у растений сорта «Донская-5». При низких и средних концентрациях соли (20, 50 и 100 мМ) наблюдали падение уровня пролина в растениях обеих форм по сравнению с соответствующими контролями (рис. 4).

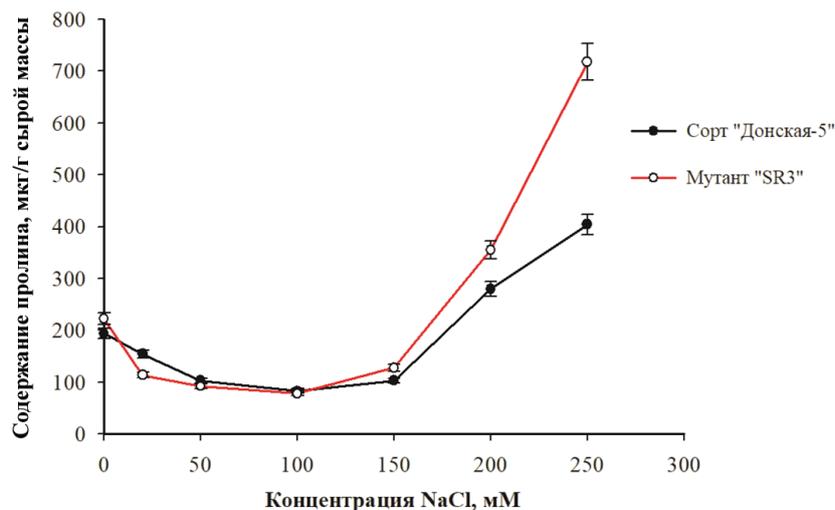


Рис. 4. Изменение содержания пролина в 7-дневных проростках горчицы сорта «Донская-5» и пластомного мутанта «SR3», выращенных при разных концентрациях NaCl

Fig. 4. Change in the content of proline in 7-day-old seedlings of mustard variety “Donskaya-5” and plastome mutant “SR3” grown at different concentrations of NaCl

Так, при концентрации NaCl 100 мМ отмечено самое низкое содержание пролина: у растений сорта «Донская-5» – в среднем 43 % от его содержания в растениях, выращенных на воде; у формы «SR3» – 35 %. Последующее увеличение концентрации соли (150, 200 и 250 мМ) способствовало постепенному нарастанию содержания пролина, наиболее выраженному у формы «SR3», что в конечном итоге привело к максимальному содержанию пролина при использовании 250 мМ соли (323 % от контроля и 177 % по сравнению содержанием пролина в растениях сорта «Донская-5», рис. 4). Следует отметить, что в условиях засоления периода снижения содержания антистрессорной аминокислоты соответствует период стимуляции роста растений, что может свидетельствовать о благополучном антистрессовом состоянии растений [11].

Процесс фотосинтеза в растительных организмах сопровождается образованием молекулярного кислорода (O_2), необходимого для нормального функционирования биологических систем, который, однако, несет потенциальную угрозу в виде развития в клетках фотодеструктивных процессов, вызываемых образованием АФК, таких как молекулярный синглетный кислород (1O_2), супероксидный анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$), пероксид водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал ($\cdot OH$) и др. [14]. В стрессовых условиях образование АФК усиливается, что в ряде случаев приводит к усилению деструктивных процессов в растениях и даже к гибели наиболее чувствительных видов. В частности, солевой стресс, как и другие абиотические факторы, приводит к многократному увеличению в клетках уровня АФК, таких как $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 и $\cdot OH$ [15, 16].

Нами был проанализирован общий уровень АФК как показатель степени окисленности растительных клеток в условиях засоления. На рис. 5 видно, что снижение содержания пролина (см. рис. 4) привело к росту содержания АФК как в сортовых растениях горчицы «Донская-5», так и в растениях линии «SR3». Максимальное (практически двукратное) содержание АФК наблюдали при использовании 50 и 100 мМ соли, что соответствовало самому низкому содержанию пролина в растениях (рис. 4). При концентрации NaCl 150 мМ, когда отмечалось возрастание содержания пролина, уровень АФК снижался примерно до уровня контрольных растений, а при последующем возрастании концентрации соли окислительный гомеостаз растений поддерживался примерно на одном и том же уровне, незначительно более высоком, чем в контрольных образцах, что может свидетельствовать об адаптации растений к данному уровню засоления.

В высших растениях синтез первого специфического предшественника тетрапирролов, АЛК, является наиболее чувствительным и лимитирующим звеном в образовании хлорофиллов и гема. Активность этого участка пути контролируется как эндогенными, так и экзогенными факторами. Использование экзогенной АЛК позволило выявить ее роль как регулятора роста растений,

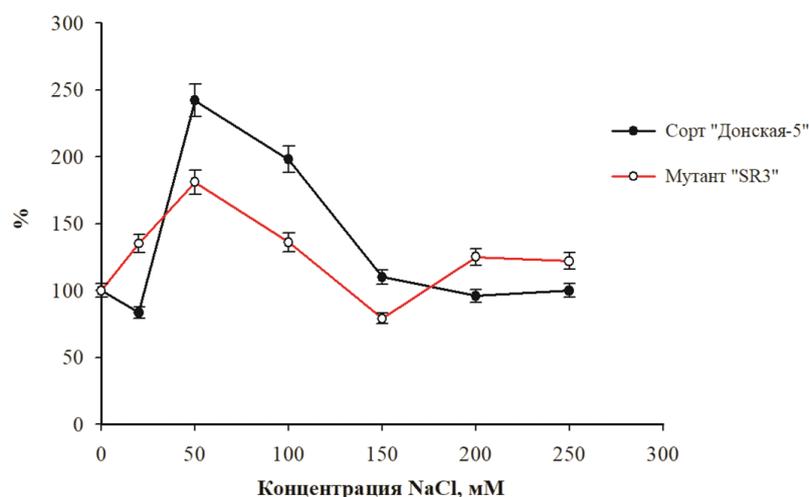


Рис. 5. Изменение содержания АФК в 7-дневных растениях горчицы сорта «Донская-5» и солеустойчивом пластомном мутанте «SR3», выращенных при разных концентрациях NaCl. За 100 % принято содержание АФК в растениях обоих вариантов, выращенных на воде

Fig. 5. Change in the content of reactive oxygen species (ROS) in 7-day-old mustard plants of the “Donskaya-5” variety and the salt-tolerant plasmome mutant “SR3” grown at different NaCl concentrations. The content of ROS in plants of both varieties grown on water is taken as 100 %

усиливающего накопление эндогенных цитокининов [17], а также как антистрессорного агента, повышающего устойчивость растений к целому ряду стрессоров [18]. В частности, экзогенная АЛК индуцировала солеустойчивость растений ячменя путем стимуляции накопления пролина и активации метаболизма азота через повышение активности нитратредуктазы и усиление экспрессии *Nar-1* гена фермента [19, 20].

Наряду с этим нами было показано, что у солеустойчивого сорта сорго (*Sorghum*) Ефремовская-2А, выращенного на воде, способность накапливать АЛК была более чем в 2 раза выше, чем у чувствительного к засолению сорта Сарваш [18]. Было выдвинуто предположение, что способность растений синтезировать АЛК в нормальных условиях может служить важным биохимическим показателем их стрессоустойчивости. С целью проверки этого предположения нами изучено накопление АЛК в устойчивых и чувствительных к засолению растениях горчицы при их выращивании на воде, а также на поверхности растворов при концентрациях соли 100 и 250 мМ.

Показано, что как при выращивании растений на воде, так и при использовании указанных концентраций соли способность растений горчицы линии «SR3» накапливать АЛК была выше, чем у растений сорта «Донская-5». Так, при выращивании на воде эта разница составила 280 %, а при использовании растворов соли в концентрации 100 и 250 мМ разница между растениями линии «SR3» и сортом «Донская-5» в способности накапливать АЛК составила 160 и 50 % соответственно. По-видимому, более низкий уровень активных форм кислорода и большая активность в растениях мутанта синтеза эндогенной АЛК, обладающей функциями регулятора роста растений и антистрессора, создают предпосылки для большей солеустойчивости таких растений, проявившейся в стимуляции ростовых процессов (см. рис. 2, 3). Ранее стимуляция накопления эндогенной АЛК была отмечена в этиолированных и зеленых проростках ячменя, этиолированных семядольных листьях огурца, а также в альбино-ткани выращенных на свету проростков ячменя, обработанных на стадии семян антибиотиком стрептомицином, при их выращивании с использованием низких и средних концентраций NaCl [18], что может быть первичной реакцией растений на стресс с целью защитить два важнейших энергетических процесса – фотосинтез и дыхание. В норме при выращивании растений на воде способность солеустойчивого мутанта «SR3» образовывать АЛК также значительно (в 3,8 раза) превышала таковую в растениях сортовой горчицы, что подтверждает предположение о способности растений синтезировать АЛК в нормальных условиях. Это может служить важным биохимическим показателем их стрессоустойчивости [18].

Поскольку и АЛК, и пролин синтезируются из общего предшественника – глутаминовой кислоты, их роль как антистрессоров может быть взаимозаменяемой в разные периоды вегетации и в разных условиях существования растений. В работе [21] показано, что при добавлении KNO_3 в раствор для выращивания проростков ячменя с целью повышения активности нитратредуктазы, способствующей ассимиляции неорганического азота и его усвоению в виде дополнительных количеств АЛК, пролина и белковых аминокислот, наблюдается увеличение содержания эндогенной АЛК, усиление роста растений и снижение уровня пролина за счет ингибирования активности пирролин-5-карбоксилазы. Чрезвычайно высокий уровень АЛК в растениях солеустойчивого мутанта при среднем уровне засоления (260 % по сравнению с сортовыми растениями при концентрации соли 100 мМ) соответствовали чрезвычайно низкому содержанию пролина у растений линии «SR3» (водного контроля) и стимуляции роста растений мутанта. При более высоких концентрациях соли, когда ингибируется активность многих ферментов [11], в том числе участвующих в синтезе АЛК и тетрапирролов [19], глутаминовая кислота начинает преимущественно усваиваться системой синтеза пролина, что приводит к его накоплению и повышению стрессоустойчивости растений (см. рис. 4) [18–20]. Стимуляция роста растений мутанта при выращивании на воде, а также при средних концентрациях соли (100 мМ), когда уровень АЛК значительно превышал таковой в растениях сорта «Донская-5», а содержание пролина, напротив, было либо практически одинаковым, либо значительно более низким, может указывать на большую активность АЛК как антистрессора растений по сравнению с пролином, что также требует дополнительных исследований.

Заключение. Таким образом, показано, что по сравнению с родительским сортом «Донская-5» пластовная мутация, индуцированная нитрозометилмочевинной, приводит к формированию солеустойчивости растений горчицы линии «SR3», повышает количество проросших семян мутанта, а также улучшает его ростовые характеристики как при выращивании на воде, так и при использовании NaCl. При низких и средних концентрациях соли (20, 50 и 100 мМ) отмечались стимуляция ростовых процессов у обеих форм горчицы, более выраженная у растений мутанта, снижение уровня пролина по сравнению с таковым у растений, выращиваемых на воде, особенно у растений линии «SR3», а также более низкое содержание АФК у мутанта. Выявлено отрицательное действие более высоких концентраций соли (150, 200 и 250 мМ) на ростовые показатели обеих форм горчицы и меньший негативный эффект на рост растений линии «SR3» при использовании концентрации 150 мМ. Увеличение концентрации соли до 150, 200 и 250 мМ привело также к постепенному возрастанию содержания пролина, наиболее выраженному у формы «SR3», что в конечном итоге максимально повысило уровень пролина по сравнению с водным контролем и растениями сорта «Донская-5». В условиях засоления при концентрации соли 100 и 250 мМ способность растений горчицы линии «SR3» накапливать АЛК была существенно выше, чем у растений сорта «Донская-5». Наряду с этим отмечалась высокая способность растений солеустойчивого мутанта накапливать АЛК и при выращивании в нормальных условиях на воде (в 3,8 раза выше, чем у сорта «Донская-5»). Полученные результаты подкрепляют выдвинутое ранее предположение о высокой способности растений производить АЛК в нормальных условиях. Это может служить важным биохимическим показателем их большей стрессоустойчивости и, несомненно, требует дополнительных исследований.

Список использованных источников

1. Expression studies in tetrapyrrole biosynthesis. Inverse maxima of magnesium chelatase and ferrochelatase activity during cyclic photoperiods / J. Papenbrock [et al.] // *Planta*. – 1999. – Vol. 208, N 2. – P. 264–273. <https://doi.org/10.1007/s004250050558>
2. Сопори, С. К. Влияние света и абиотических стрессовых факторов на экспрессию генов растений. Генетические подходы к созданию растений, устойчивых к засолению почвы / С. К. Сопори // *Фотобиология растений и фотосинтез* / отв. ред. И. Д. Волоотовский. – Минск, 2008. – С. 29–65. – (Годневские чтения ; 14).
3. Parida, A. K. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review / A. K. Parida, A. B. Das // *Ecotoxicol. Environ. Safety*. – 2005. – Vol. 60, N 3. – P. 324–349. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.010>
4. Ingram, J. The molecular basis of cellular dehydration tolerance in plants / J. Ingram, D. Bartels // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1996. – Vol. 47, N 1. – P. 377–403. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.377>

5. Bray, E. A. Plant responses to water deficit / E. A. Bray // *Trends Plant Sci.* – 1997. – Vol. 2, N 2. – P. 48–54. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(97\)82562-9](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(97)82562-9)
6. Ультраструктура хлоропластов горчицы *Brassica juncea* как показатель солерезистентности / А. И. Усатов [и др.] // *Цитология.* – 2004. – Т. 46, № 12. – С. 1035–1042.
7. Маркин, Н. В. RAPD-анализ генотипов солеустойчивых форм горчицы *Brassica juncea* L. / Н. В. Маркин, А. В. Усатов, Г. М. Федоренко // *Экол. вестн. науч. центров Черномор. экон. содружества.* – 2006. – № 3. – С. 99–192.
8. Shemin, D. Delta-aminolevulinic acid dehydrase from *Rhodospseudomonas spheroides* / D. Shemin // *Meth. Enzymol.* – 1962. – Vol. 5. – P. 883–884. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(62\)05333-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(62)05333-1)
9. Soliman, E. F. Manganese-induced oxidative stress as measured by a fluorescent probe: an *in vitro* study / E. F. Soliman, W. Jr. Slikker, S. F. Ali // *Neurosci. Res. Commun.* – 1995. – Vol. 17, N 3. – P. 185–193.
10. Misra, N. Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram / N. Misra, A. K. Gupta // *Plant Sci.* – 2005. – Vol. 169, N 2. – P. 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.02.013>
11. Землянухина, О. А. Рост и развитие растений вейгелы цветущей «Вариегата» в культуре *in vitro* в условиях солевого стресса / О. А. Землянухина, В. Н. Калаев, В. С. Воронина // *Современные проблемы науки и образования* [Электронный ресурс]. – 2016. – № 6. – Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=26019>. – Дата доступа: 31.03.2020.
12. Кузнецов, Вл. В. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция / Вл. В. Кузнецов, Н. И. Шевякова // *Физиология растений.* – 1999. – Т. 46. – С. 321–336.
13. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implication in plant growth and abiotic stress tolerance / P. V. K. Kishor [et al.] // *Curr. Sci.* – 2005. – Vol. 88. – P. 424–438.
14. Foyer, C. H. Photooxidative stress in plants // C. H. Foyer, M. Lelandais, K. J. Kunert // *Physiol. Plantarum.* – 1994. – Vol. 92, N 4. – P. 696–717. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1994.920422.x>
15. Meneguzzo, S. Antioxidative responses of shoots and roots of wheat to increasing NaCl concentrations / S. Meneguzzo, F. Navari-Izzo, R. Izzo // *J. Plant. Physiol.* – 1999. – Vol. 155. – P. 274–280. [https://doi.org/10.1016/s0176-1617\(99\)80019-4](https://doi.org/10.1016/s0176-1617(99)80019-4)
16. Полесская, О. Г. Влияние солевого стресса на антиоксидантную систему растений в зависимости от условий азотного питания / О. Г. Полесская, Е. К. Каширина, Н. Д. Алехина // *Физиология растений.* – 2006. – Т. 53. – С. 207–214.
17. Яронская, Е. Б. Содержание зеатина и его производных в проростках ячменя (*Hordeum vulgare* L.) с повышенным уровнем 5-аминолевулиновой кислоты / Е. Б. Яронская, И. В. Вершиловская, Н. Г. Аверина // *Вестн. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2004. – № 3. – С. 70–73.
18. Аверина, Н. Г. Биосинтез тетрапирролов в растениях / Н. Г. Аверина, Е. Б. Яронская. – Минск : Беларус. навука, 2012. – 413 с.
19. Аверина, Н. Г. Механизмы устойчивости растений ячменя к солевому стрессу под действием 5-аминолевулиновой кислоты / Н. Г. Аверина, Е. Р. Грицкевич // *Физиология растений.* – 2010. – Т. 57. – С. 849–846.
20. Аверина, Н. Г. Молекулярные механизмы регуляции нитратредуктазы экзогенной 5-аминолевулиновой кислотой в проростках ячменя, выращенных в условиях засоления хлоридом натрия / Н. Г. Аверина, З. Бейзаи, Р. А. Щербаков // *Докл. Нац. акад. наук Беларусі.* – 2015. – Т. 59, № 4. – С. 95–101.
21. Роль метаболизма азота в формировании солеустойчивости растений ячменя (*Hordeum vulgare* L.) и пшеницы (*Triticum aestivum*) / Н. Г. Аверина [и др.] // *Физиология растений.* – 2014. – Т. 61. – С. 106–113.

References

1. Papenbrock J., Mock H.-P., Kruse E., Grimm B. Expression studies in tetrapyrrole biosynthesis. Inverse maxima of magnesium chelatase and ferrochelatase activity during cyclic photoperiods. *Planta*, 1999, vol. 208, no. 2, pp. 264–273. <https://doi.org/10.1007/s004250050558>
2. Sopori S. K. The influence of light and abiotic stress factors on the expression of plant genes. Genetic approaches to creating plants resistant to soil salinization. *Fotobiologiya rastenii i fotosintez* [Plant photobiology and photosynthesis]. Minsk, 2004, pp. 29–65 (in Russian).
3. Parida A. K., Das A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, vol. 60, no. 3, pp. 324–349. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.010>
4. Ingram J., Bartels D. The molecular basis of cellular dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1996, vol. 47, no. 1, pp. 377–403. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.377>
5. Bray E. A. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, 1997, vol. 2, no. 2, pp. 48–54. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(97\)82562-9](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(97)82562-9)
6. Usatov A. I., Fedorenko G. M., Shcherbakova L. B., Mashkina E. V. Ultrastructure of chloroplasts of mustard *Brassica juncea* as an indicator of salt resistance. *Tsitologiya* [Cytology], 2004, vol. 46, no. 12, pp. 1035–1042 (in Russian).
7. Markin N. V., Usatov A. I., Fedorenko G. M. RAPD analysis of the genotypes of salt-resistant forms of mustard *Brassica juncea* L. *Ekologicheskii vestnik nauchnykh tsentrov Chernomorskogo ekonomicheskogo sotrudnichestva* [Ecological bulletin of scientific centers of the Black Sea Economic Commonwealth], 2006, no. 3, pp. 99–192 (in Russian).
8. Shemin D. Delta-aminolevulinic acid dehydrase from *Rhodospseudomonas spheroides*. *Methods in Enzymology*, 1962, vol. 5, pp. 883–884. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(62\)05333-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(62)05333-1)
9. Soliman E. F., W. Jr. Slikker, S. F. Ali. Manganese-induced oxidative stress as measured by a fluorescent probe: an *in vitro* study. *Neuroscience Research Communications*, 1995, vol. 17, no. 3, pp. 185–193.

10. Misra N., Gupta A. K. Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram. *Plant Science*, 2005, vol. 169, no. 2, pp. 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.02.013>
11. Zemlyanukhina O. A., Kalayev V. N., Voronina V. S. Growth and development of weigela plants of the blooming “Variegat” in an *in vitro* culture under conditions of salt stress. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern problems of science and education], 2016, no. 6. Available at: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=26019> (accessed 31.03.2020) (in Russian).
12. Kuznetsov V. I., Shevyakova N. I. Proline under stress: biological role, metabolism, regulation. *Fiziologiya rastenii* [Plant physiology], 1999, vol. 46, pp. 321–336 (in Russian).
13. Kishor P. V. K., Sangam S., Amrutha R. N., Laxmi P. S., Naidu K. R., Rao K. R. S. S., Rao S., Reddy K. J., Theriappan P., Sreenivasulu N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implication in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, 2005, vol. 88, pp. 424–438.
14. Foyer C. H., Lelandais M., Kunert K. J. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 1994, vol. 92, no. 4, pp. 696–717. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1994.920422.x>
15. Meneguzzo S., Navari-Izzo F., Izzo R. Antioxidative responses of shoots and roots of wheat to increasing NaCl concentrations. *Journal of Plant Physiology*, 1999, vol. 155, no. 2, pp. 274–280. [https://doi.org/10.1016/s0176-1617\(99\)80019-4](https://doi.org/10.1016/s0176-1617(99)80019-4)
16. Poleskaya O. G., Kashirina E. K., Alekhina N. D. The influence of salt stress on the antioxidant system of plants depending on the conditions of nitrogen nutrition. *Fiziologiya rastenii* [Plant physiology], 2006, vol. 53, pp. 207–214 (in Russian).
17. Yaronskaya E. B., Vershilovskaya I. V., Averina N. G. The content of zeatin and its derivatives in seedlings of barley (*Hordeum vulgare* L.) with an elevated level of 5-aminolevulinic acid. *Vestsi Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2004, no. 3, pp. 70–73 (in Russian).
18. Averina N. G., Yaronskaya E. B. *Biosynthesis of tetrapyrroles in plants*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2012. 413 p. (in Russian).
19. Averina N. G., Gritskevich E. R. Mechanisms of resistance of barley plants to salt stress under the action of 5-aminolevulinic acid. *Fiziologiya rastenii* [Plant physiology], 2010, vol. 57, pp. 849–846 (in Russian).
20. Averina N. G., Beizai Z., Shcherbakov R. A. Molecular mechanisms of nitrate reductase regulation by exogenous 5-aminolevulinic acid in barley seedlings grown under saline conditions with sodium chloride. *Doklady Natsyyanal'nei akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2015, vol. 59, no. 4, pp. 95–101 (in Russian).
21. Averina N. G., Beizai Z., Shcherbakov R. A., Usatov A. V. The role of nitrogen metabolism in the formation of salt tolerance of barley plants (*Hordeum vulgare* L.) and wheat (*Triticum aestivum*). *Fiziologiya rastenii* [Plant physiology], 2014, vol. 61, pp. 106–113 (in Russian).

Информация об авторах

Аверина Наталья Георгиевна – д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник, Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: averina_ng@tut.by

Дремук Ирина Александровна – канд. биол. наук, науч. сотрудник, Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: irinadremuk@yandex.ru

Усатов Александр Вячеславович – д-р биол. наук, профессор, Южный федеральный университет (ул. Большая Садовая, 105/42, 344006, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация). E-mail: usatova@mail.ru

Information about the authors

Natalia G. Averina – D. Sc. (Biol.), Professor, Chief Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: averina_ng@tut.by

Irina A. Dremuk – Ph. D. (Biol.), Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: irinadremuk@yandex.ru

Alexandr V. Usatov – D. Sc. (Biol.), Professor. Southern Federal University (105/42, Bolshaya Sadovaya Str., 344006, Rostov-on-Don, Russian Federation). E-mail: usatova@mail.ru