

ИЗПОЛЗВАНЕ НА ПЕГ-ТЕСТ ЗА ФИЗИОЛОГИЧНА ОЦЕНКА НА СУХОУСТОЙЧИВОСТТА НА ЕЧЕМИКА

Константина Кочева, Георги И. Георгиев
Институт по физиология на растенията БАН София

Резюме

Кочева, К., Г. Георгиев. 2007. Използване на ПЕГ-тест за физиологична оценка на сухоустойчивостта на ечемика

Засушаването е едно от основните въздействия на средата, които ограничават растежа, развитието и продуктивността на ечемика. Изясняването на физиологичните и биохимични механизми на адаптация към стрес е основен подход при изучаване на сухоустойчивостта на културните видове. Основни метаболитни реакции са осмотично приспособяване, регулация на водообмена, активност на фотосинтетичния апарат. Лабораторните скрининг методи за изследване на физиологичните механизми на устойчивост на растенията имат известни предимства пред полските опити поради своята експресност, възможност за повторения и надежност. Освен това, при тези тестове се избягва взаимодействието между стресовите фактори, което често пъти се наблюдава в природата. В предложената опитна постановка воден стрес се постига чрез третиране на корените на 10-дневни ечемични растения с разтвор на полиетиленгликол. Степента на водния дефицит се охарактеризира с величината относително водно съдържание. За оценка на физиологичното състояние са изследвани някои морфологични, биохимични и биофизични параметри на стресирания образци: биометрични показатели, количество натрупани осмолити, степен на увреждане на клетъчните мембрани. На базата на получените резултати се дискутира модел за оценка на физиологичното състояние на сорта ечемик и неговата приложимост в селекционната практика.

Ключови думи: Воден стрес – ПЕГ – осмотично приспособяване – пролин – клетъчна мембранна стабилност

Abstract

Kocheva, K.V. and G.I. Georgiev. 2007. The use of PEG-test for physiological evaluation of drought-tolerance in barley

Drought is a major abiotic factor which limits growth, development and productivity of crop plants and barley in particular. Clarification of physiological and biochemical mechanisms of stress adaptation is a basic approach towards selection for higher drought-tolerance. Metabolic reactions such as osmotic adjustment, cell membrane stability, water relations, and activity of the photosynthetic apparatus are of great importance. Laboratory screening techniques for evaluation of physiological mechanisms of plant resistance have certain advantages compared to field studies. They allow precise regulation of the degree of stress treatment and avoid interaction between stress factors, which often occurs in natural conditions. In the present study water stress was induced by treating the roots of 10-day-old barley seedlings with polyethylene glycol. This osmoticum simulates dehydra-

tion by reducing the osmotic potential of the medium and lowering water availability for the plant. The developing water deficit was characterized by the relative water content in the leaves. For assessment of the physiological status some morphological, biochemical and biophysical parameters of the stressed samples were measured: biometrics, accumulation of compatible solutes, cell membrane stability. On the basis of these results a model is proposed for the evaluation of the physiological status of different barley cultivars and its application for breeding practice.

Key words: Water stress – P.E.G. – osmotic adjustment - praline – cell membrane stability

Дефиниция за воден стрес

Съдържанието на вода в растителните тъкани представлява изключително изменчива и динамична величина. То силно се различава при различните видове и в различните части на растението, претърпявайки сезонни и денонощни колебания, които се обуславят освен от възрастта, също и от съотношението между поглъщането на вода и транспирацията. Когато разходът на вода при транспирация превишава постъпването ѝ през корените, в растението се развива воден дефицит. Неговото въздействие върху метаболитните процеси зависи до голяма степен от продължителността му. Според съвременната класификация всяко неблагоприятно условие или вещество, което потиска метаболизма на растението, неговия растеж или развитие, може да се разглежда като стрес [Lichtenthaler, 1996]. В зависимост от силата и продължителността си, най-общо се различават три вида стрес – слаб, умерен и силен. Умереният стрес може да активира клетъчните процеси и да увеличи физиологичната активност на растението, без да предизвика вредни ефекти дори при по-голяма продължителност (фиг. 1).



Фигура 1. Влияние на водния дефицит върху клетъчните процеси (по Bohnert et al., 1995 с модификации).

Различните растения имат различни генетично детерминирани граници на толерантност и способности за преодоляване на водния стрес. Водните растения (хидрофити) като правило не изпитват недостиг на вода. Сухоzemните растения, обаче, са се приспособили към този специфичен начин на живот, придобивайки способността да поддържат в тъканите си непрекъснат възходящ поток на водата. Той започва с погълната от корените вода, пронизва цялото растение и завършва с изпаряващите повърхности на надземните органи. За поддържането на положителен воден баланс, изпарената от листата вода трябва да се компенсира от погълнатата от корените [Steudle, 2000].

Индукция на воден дефицит в лабораторни условия посредством намаляване на осмотичния потенциал

Изследването на физиологичните процеси при растения в условия на стрес носи познания за пластичността на метаболитните пътища и границите на тяхното функциониране и допринася за изучаването на механизмите за преодоляване на неблагоприятните условия. В редица съвременни изследвания се индуцира воден стрес в лабораторни условия посредством третиране на корените или листата на растенията с разтвори на полиетиленгликол (ПЕГ). Това са група инертни, незаредени, дълговерижни полимери, чиято молекулна маса се определя от броя на мономерните единици $\text{HOCH}_2\text{-(CH}_2\text{-O-CH}_2\text{)}_n\text{-CH}_2\text{OH}$. Те ограничават постъпването на вода, без да влияят върху йонния състав на клетките [Mechal, 1975]. Като правило се приема, че големият размер на молекулите (молекулна маса над 3000-4000) пречат за преминаването им през клетъчните мембрани и навлизането им в протопласта [Krzizek, 1985]. Воден дефицит в растенията настъпва поради недостъпност на вода, дължащо се на намален осмотичен потенциал на средата, съдържаща разтворения ПЕГ. Осмотично-индуцираният воден дефицит дава възможност за постигане на прецизно и възпроизводимо обезводняване. Друго преимущество на контролираните условия е възможността да се изследва отделно конкретният лимитиращ фактор (например намалената достъпност на водата), което е неосъществимо в природата.

Осмолити и осмотично приспособяване

Продължителният воден недостиг повлиява всички метаболитни процеси в растенията и често предизвиква рязко намаляване на продуктивността им. В процеса на адаптация на растенията както към кратковременното, така и към продължителното действие на водния дефицит, а също и към ниски и високи температури, важна роля играят т.нар. съвместими осмолити. Това са неутрални, нискомолекулни органични съединения, които проявяват осмотично активни свойства. Те намаляват водния потенциал като позволяват навлизането на вода от обкръжаващата среда към вътрешността на клетката. По този начин те буферират непосредствения ефект от водния дефицит и участват в един процес, наречен осмотично приспособяване (osmotic adjustment). Клетъчни метаболити, които могат да участват в осмотичното приспособяване, са свободните аминокиселини, простите захари, някои нециклични (манитол) или циклични алкохоли (пинитол), метилирани инозитолни полиаминови (спермин, спермидин), четвъртични амониеви съединения (глицин-бетаин). Основната роля на осмолитите е поддържане на осмотичното равновесие, без да увреждат взаимодействието между макромолекулите и разтворителя. Освен това, високите концентрации на осмолити имат защитно действие срещу окислителни увреждания, посредством отстраняване на свободните радикали.

Аминокиселината пролин вероятно е най-разпространеният съвместим осмолит. Той се натрупва в много и разнообразни организми – от бактерии и морски безгръбначни до висши растения. В редица случаи увеличените му клетъчни нива корелират със способността за преживяване на воден дефицит, а също и за преодоляване на ефекта от висока засоленост на средата [Sudhakar et al., 1993]. В

растенията, синтезираният в условия на воден дефицит пролин може да служи като резерв от органичен азот, който да се използва по време на последващо възстановяване. Разграждането на пролина може да подобрява енергетичния статус на клетките, възстановяващи се след воден дефицит. Ясно е, че увеличеното му ниво в условията на засушаване представлява адаптивна реакция от страна на растението. Необходимо е, обаче, да се открият механизмите, чрез които натрупването на пролин допринася за способността на растенията да преживяват стресовите условия. Свободен пролин се натрупва при много растения в отговор на различни видове стрес [Tsai et al., 2003; Sanchez et al., 2001].

Относително водно съдържание

Известно е, че водообменът на растенията се характеризира с качествена (воден потенциал) и количествена (водно съдържание) страна [Георгиев, 2004]. Приема се, че относителното водно съдържание (ОВС) е по-подходящ индикатор за водния статус на растенията в сравнение с водния потенциал, тъй като корелира по-добре с нивото на стреса [Lawlor and Cornic, 2002; Turner, 1981]. Промените във водообмена на растенията могат да бъдат оценени достатъчно точно с помощта на ОВС на листата, което в много случаи по-точно съответства на нивото на стресовия отговор. Нашите резултати показват, че приложеният ПЕГ стрес води до постепенно намаление на ОВС на листата. Загубата на вода от листата е около 30%, което ни дава основание да разглеждаме така индуцирания воден стрес като мек или умерен по сила, макар и бързо развиващ се [Lawlor and Cornic, 2002].

Състояние на клетъчните мембрани при засушаване и воден стрес

Една от първите мишени на водния стрес и обезводняването са клетъчните мембани. Под влияние на различни видове стрес се наблюдават редица смущения в организацията на мембранните белтъци и липиди [Bandurska et al., 1997]. В зависимост от растителния вид, продължителността и интензивността на засушаването се наблюдават различни ефекти на водния стрес върху съдържанието на полярни липиди в листата [Monteiro de Paula et al., 1990]. Увеличаването на течливостта на мембраните способства за поддържането на нормалното обкръжение за биохимичната активност на мембранно-свързаните белтъци. Физичните особености на липидите в бислоя до голяма степен оказват влияние върху активността на мембранните белтъци – H⁺-АТФ-ази, преносители, каналобразуващи белтъци, регулиращи транспорта на йони и други вещества [Palmgren, 2001]. Колкото по-малък е флуидитета на мембраната, толкова по-увредена е функцията на белтъчния й компонент. С увеличаване количеството на наситените мастни киселини мембраната губи флуидитета си и преминава от течнокристална в гелна фаза. При нарушения в организацията и състава на мембраните, се наблюдава повишено изтичане на електролити, което може да бъде установено чрез кондуктометрични измервания [Saneoka et al., 2004].

Кондуктометричен метод за оценка на мембранните увреждания при воден дефицит

Изтичането на вещества от растителните тъкани отдавна широко се използва като мярка за мембранната стабилност при изследване на различни стресови състояния [Murray et al., 1989; Leopold et al., 1981]. Обикновено то се определя с помощта на кондуктометрични техники за анализ на проводимостта на разтвора, в който тъканите се оставят да престоят за различен период от време [Bajji et al., 2001]. Така дестилираната вода, в която първоначално се поставят образците, постепенно повишава проводимостта си, поради навлизането в нея на йони от вътреклетъчното пространство под действие на концентрационния градиент при нарушена нормална мембранна проницаемост. Кондуктометричното измерване на йонното съдържание в течни среди предлага редица удобства като: евтина и лесна за обслужване

апаратура, възможности за експресна рутинна оценка, работа в извънлабораторни условия. Същевременно, кондуктометрията е достатъчно чувствителна и прецизна, с много добра повтаряемост на резултатите. Въпреки, че е изминало доста време от първите докладвани работи в тази насока, методът не е изгубил своята актуалност. Това се вижда от литературата, в която се наблюдават тенденции към усъвършенстване с използването на по-прецизни методики, отчитащи особеностите на конкретното изследване [Saneoka et al., 2004; Premachandra et al., 1992]. Известни са емпиричните зависимости, свързващи проводимостта на външния разтвор с концентрацията на основните видове йони (най-вече K^+), изтичащи от образците [Palta and Li, 1980]. Тази връзка се получава от независимо определяне на въпросните концентрации с допълнителни методи (като напр. атомно-емисионна спектроскопия). Кондуктометричното определяне на йонните изтичания от растителни тъкани предлага ценна информация за мембранните изменения, дължащи се на различни въздействия на околната среда, стареене, или третиране в лабораторни условия [Rizza et al., 2001; van Rensburg et al., 1993]. В редица проучвания тази информация съществено допълва общата картина на физиологичното състояние на растенията [Saneoka et al., 2004; Gavuzzi et al., 1997].

Наред със специфичната електропроводност, получавана директно от измерванията, в кондуктометричния анализ се срещат и други производни величини за описание на отклоненията от нормалната мембранна функционалност. Един от най-често използваните е т.нар. индекс на увреждане I_v (в %), въведен с цел да отчита относителните изменения в стресирани тъкани в сравнение с нетретиран образци. Някои автори отбелязват по-голямата изчерпателност на резултати, съдържащи кинетиката на проводимостта и посочват предимството им пред еднократни измервания, направени след определена инкубация в дестилирана вода [Murray et al., 1989]. Наистина, времевата зависимост на йонните изтичания дава възможност да се пресметне електролитния поток, и оттам да се получат повече данни за движещите сили на процеса и за състоянието на тъканите [Kocheva et al., 2005]. Разработен е дифузионен модел, обясняващ кинетиката на процесите, свързани с различната пропускливост за йони на плазмалемата и клетъчната стена. Анализът на тази кинетика показва наличието на две относително самостоятелни фази (бърза и бавна), описващи процесите на обмен с външната среда. Параметрите на модела, получени от апроксимация с експерименталните данни, демонстрират пряка зависимост между условията на средата и промените в растителните тъкани.

ЛИТЕРАТУРА

- Георгиев, Г. 2004.** Екологична физиология на растенията, София.
- Bajji, M., Kinet, J.M., and Lutts, S., 2001.** The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat, *Plant Growth Regul.* 36: 61-70.
- Bandurska, H., Stroinski, A., and Zielezinska, M., 1997.** Effects of water deficit stress on membrane properties, lipid peroxidation and hydrogen peroxide metabolism in the leaves of barley genotypes, *Acta Soc. Bot. Poloniae* 66: 177-183.
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E., Jensen, R.G., 1995.** Adaptation to environmental stresses, *Plant Cell* 7: 1099-1111.
- Gavuzzi, P., Rizza, F., Palumbo, M., Campanile, R.G., Ricciardi, G.L., and Borghi, B., 1997.** Evaluation of field and laboratory predictors of drought and heat tolerance in winter cereals, *Can. J. Plant Sci.* 77: 523-531.
- Kocheva, K.V., Georgiev, G.I., and Kochev, V.K., 2005.** A diffusion approach to the electrolyte leakage from plant tissues, *Physiol. Plant.* 125: 1-9.
- Krizek, D.T., 1985.** Methods for inducing water stress in plants, *HortSci.* 20: 1028-1038.
- Lawlor, D.W., and Cornic, G., 2002.** Photosynthesis carbon assimilation and associated

- metabolism in relation to water deficit in higher plants, *Plant Cell Environment* 25: 275-294.
- Leopold, A.C., Musgrave, M.E., and Williams, K.M., 1981.** Solute leakage resulting from leaf desiccation, *Plant Physiol.* 68: 1222-1225.
- Lichtenthaler, H.K., 1996.** Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants, *J. Plant Physiol.* 148: 4-14.
- Mexal, J., Fisher, J.T., Osteryoung, J., and Patric Reid, C.P., 1975.** Oxygen availability in PEG solutions and its implications in plant - water relations, *Plant Physiol.* 55: 20-24.
- Monteiro de Paula, F., Pham Thi, A.T., Vieira da Silva, J., Justin, A.M., Demandre, C., and Mazliak, P., 1990.** Effects of osmotic stress on the molecular species composition of polar lipids from *Vigna* leaves, *Plant Sci.* 66: 185-193
- Murray, M.B., Cape, J.N., and Fowler, D., 1989.** Quantification of frost damage in plants by rate of electrolyte leakage, *New Phytol.* 113: 307-311.
- Palmgren, M.G., 2001.** Plasma membrane H⁺-ATP-ases: powerhouses for nutrient uptake, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 817-845.
- Palta, J.P., and Li, P.H., 1980.** Alternations in membrane transport properties by freezing injury in herbaceous plants: Evidence against rupture theory, *Physiol. Plant.* 50:169-175.
- Premachandra, G.S., Saneoka, H., Fujita, K., and Ogata, S., 1992.** Leaf water relations, osmotic adjustment, cell membrane stability, epicuticular wax load and growth as affected by increasing water deficits in sorghum, *J. Exp. Bot.* 43: 1569-1576.
- Rizza, F., Pagani, D., Stanca, A.M., and Cattivelli, L., 2001.** Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the cold acclimation and freezing tolerance of winter and spring oats, *Plant Breeding*, 120: 389-396.
- Saneoka, H., Moghaieb, R.E.A., Premechandra, G.S., and Fujita, K., 2004.** Nitrogen nutrition and water stress effects on cell membrane stability and leaf water relations in *Agrostis palustris* Huds., *Env. Exp. Bot.* 52: 131-138.
- Sanchez, E., Lopez-Lefebvre, L., Garcia, P.C., Rivero, R.M., Ruiz, J.M., and Romero, L., 2001.** Proline metabolism in response to highest nitrogen dosages in green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike), *J. Plant Physiol.* 158: 593-598.
- Steudle, E., 2000.** Water uptake by roots: effects of water deficits, *J. Exp. Bot.* 51: 1513-1542.
- Sudhakar, C., Reddy, P.S., and Veeravjaneyulu, K., 1993.** Effect of salt stress on the enzymes of proline synthesis and oxidation in green gram (*Phaseolus aureus* Roxb.) seedlings, *J. Plant Physiol.* 141: 621-623.
- Tsai, Y.-C., Hsu, Y.T., and Kao, C.H., 2003.** Proline accumulation induced by phosphinothircin in rice leaves, *Biol. Plant.* 46: 317-320.
- Turner, N.C., 1981.** Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status, *Plant and Soil* 58: 339-366.
- van Rensburg, L., Kruger, G.H., and Kruger, H., 1993.** Proline accumulation as drought tolerance selection criterion: its relationship to membrane integrity and chloroplast ultrastructure in *Nicotiana tabacum* L., *J. Plant Physiol.* 141: 188-194.

Статията е представена по време на дискусия на тема: "Проблеми, постижения и перспективи в селекцията по сухоустойчивост и студоустойчивост при ечемика", 5 юни 2007 г., Институт по земеделие – Карнобат